

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Vliv vybraného kandidátního genu na výskyt
androstenu u vykrmovaných kanečků**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eva Pospíšilová

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Stupka, CSc.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv vybraného kandidátního genu na výskyt androstenonu u vykrmovaných kanečků" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. dubna 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Romanovi Stupkovi, CSc a Ing. Kateřině Zadinové za odborné vedení, poskytnuté rady, informace, zkušenosti a vřelé ochoty při přípravě a zpracování diplomové práce.

Vliv vybraného kandidátního genu na výskyt androstenonu u vykrmovaných kanečků

Souhrn

Cílem práce bylo stanovení významné SNP mutace v genu *CYP17A1*. Dále ověřit výskyt této SNP v genotypu kříženců Danbred. A rovněž stanovení hladiny androstenonu a skatolu v tukové tkáni testovaných zvířat. Izolace DNA z krve testovaných zvířat byla provedena pomocí izolačního kitu Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell). Po každé izolaci byla DNA kontrolována na elektroforéze na 1 % agarozovém gelu. Pro zjištění genotypu bylo využito štěpení restriční enzymem BshNI. Hladina androstenonu a skatolu byla stanovena ze vzorku tukové a svalové tkáně prasat pomocí kapalinové chromatografie dle metodiky Hansena-Møllera (1994). Androstenon, skatol a indol byli derivatizováni pomocí dansylhydrazinu v autosampleru a následně nastříknuty do kolony. Nejvyšší hladina kančího pachu byla zjištěna u kanců. Pohlaví statisticky významně ($P < 0,05$) ovlivňuje hladinu androstenonu u prasat. Vliv genotypu nelze jednoznačně potvrdit. U testované populace kříženců Danbred se vyskytli pouze 2 jedinci s genotypem T/T v testované SNP a proto není možné s jistotou potvrdit ani vyvrátit vliv této SNP v genu *CYP17A1* na výskyt androstenonu u testované populace. Ostatní zvířata měla genotyp A/A, v testovaném souboru se nevyskytl žádný heterozyt A/T. Podobné výsledky byly zjištěny i v populaci čistokrevných zvířat, která byla zařazena pro ověření četnosti genotypů testované mutace.

Klíčová slova: *CYP17A1*, kanec, kančí pach, geny

Influence of selected candidate gene for the presence of androstenone in male pigs fattened

Summary

The aim of this study was to determine the significant SNP mutations in the CYP17A1 gene and occurrence of this SNP in hybrid pig Danbred. And also androstenone and skatole levels were determined in the fat tissue of tested animals. Isolation of DNA from blood of the test animals was performed using Genomic DNA isolation kit Mini Kit (Blood / Cultured Cell). Isolated DNA was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel. Genotype was detected by restriction enzyme BshNI. The level of androstenone and skatole was determined from a sample of adipose and muscle tissue of pigs and androstenone levels have been determined by liquid chromatography according to the methodology of Hansen-Møller (1994). Androstenone, indole and skatole were derivatised using dansylhydrazine in the autosampler, and then it was injected into the column. The highest level of boar taint was detected in boars. Sex significantly influenced ($P < 0.05$) by the level of androstenone in pigs. Genotype can not be unambiguously confirmed. For the population tested hybrid Danbred there were only 2 individuals with genotype T / T in the test gene and therefore can not be confidently confirm or refute the effect of this SNP in the gene CYP17A1 the occurrence of androstenone at the tested population. Other animals are dominant homozygote A / A. Any heterozygote A / T was detected in this population. Similar results were obtained in a population of pure-bred animals, which was included to verify the frequency of genotypes.

Keywords: *CYP17A1*, boar, boar taint, genes

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíl práce a hypotéza.....	2
3.	Literární rešerše	3
3.1	Výkrm kanečků v praxi.....	3
3.2	Vliv pohlaví na kvalitu masa	4
3.3	Kančí zápach.....	5
3.3.1	Androstenon.....	5
3.3.2	Skatol a indol	6
3.4	Eliminace výskytu kančího pachu	8
3.4.1	Imunokastrace	8
3.4.2	Improvac	8
3.5	Metody ke stanovení kančího pachu.....	10
3.5.1	Plynová chromatografie	10
3.5.2	Kapalinová chromatografie.....	10
3.5.3	Hmotnostní spektrometrie.....	11
3.5.4	Spekrofotometrie	11
3.5.5	Alternativní metoda – elektronický nos.....	12
3.6	Vnější faktory ovlivňující výskyt kančího pachu	12
3.6.1	Výživa	12
3.6.2	Prostředí (environmentální vlivy).....	13
3.7	Vnitřní faktory ovlivňující výskyt kančího pachu	14
3.7.1	Mapování genomu	14
3.7.1.2	Cytogenetické (chromozomové) mapování	14
3.7.1.3	Komparativní mapování	15
3.8	Genetické markery	15
3.9	Kandidátní gen.....	16
3.11.2	CYB5A	18
3.11.3	HSD3B1	19
3.11.4	SULT2A1.....	20
3.12	Geny ovlivňující výskyt skatolu	21
3.12.1	CYP2E1	21
3.12.2	CYP2A6.....	21
4.	Metodika	23
4.1	Stanovení hladiny androstenonu a skatolu.....	23
4.2	Určení genotypu testovaných zvířat	23
4.3	Primery A,B	24
4.4	Statistické vyhodnocení	25
5.	Výsledky	26

6.	Diskuze	32
7.	Závěr.....	34
8.	Seznam literatury	35
9.	Seznam obrázků	43
10.	Seznam tabulek.....	43
11.	Seznam zkratek	44

1. Úvod

Kančí feromony androstenon a androstenol patří mezi faktory, které navozují sexuální chování u prasnic. Feromony se tvoří u pohlavně dospělých samců. Androstenon způsobující kančí pach je steroidní povahy, syntetizovaný ve varlatech a metabolizován v játrech, vznikající z testosteronu. Další látkou způsobující kančí zápach je skatol. Odbourání kančího pachu se provádí metodou kastrace. Kastrací u kanců dosahujeme dvou cílů – zklidnění agresivních jedinců vůči ostatním chovaným kancům a minimalizace vzniku kančího pachu, který může znehodnotit chuť masa nekastrovaných kanců. Od roku 2018 bude EU upřednostňovat chovy bez chirurgické kastrace. Některé chovy budou provádět kastraci imunologickou cestou. Tato metoda je považovaná za šetrnou a nebolestivou a splňuje požadavky na welfare zvířat. Ovšem výkrm kanečků díky lepší konverzi, nižší mortalitě a vyšší zmasilosti vylepšuje ekonomiku chovu. Spotřebitelům roste možnost konzumovat vepřové maso z nekastrovaných zvířat. Existuje řada studií, které se zabývají možnostmi ovlivnění a odstranění kančího pachu. Problematiku kančího pachu se vědci snažili ovlivnit přes výživu, environmentální vlivy až po genotyp. Ve šlechtění prasat se v současné době využívají molekulárně – genetické metody odhalující genetickou podstatu sledovaných vlastností. Mapování lokusů kvalitativních vlastností je důležitý krok pro zjištění genetického základu produkčních znaků u hospodářských zvířat. Mapování se provádí pomocí genomického scanu, nebo s využitím kandidátních genů. Ovšem řada genetiků dává přednost mapování QTL s využitím kandidátních genů a vyhledání mutací v genech.

2. Cíl práce a hypotéza

Cíl:

Cílem diplomové práce je ověřit vliv vybraného kandidátního genů na výskyt a hladinu kančího pachu (androstenonu a skatolu).

Hypotéza:

Lze předpokládat, že jednotlivé genotypy u vybraných genů mají vliv na hladinu výskytu androstenonu a skatolu v tuku a mase u prasat.

3. Literární rešerše

3.1 Výkrm kanečků v praxi

Ekonomika produkce vepřového masa a welfare v chovech hospodářských zvířat jsou v současné době dvě stěžejní problematiky diskutované mezi chovatelskou veřejností. Jedním z možných způsobů, jak snížit výrobní náklady a zároveň zlepšit welfare je výkrm mladých kanečků (Dostálová et al., 2008).

Výkrm kanečků je jedna z možností, jak využít biologické rezervy ke zvýšení efektivity produkce vepřového masa. Kanečci dosahují v porovnání s kastráty lepší užitkovost a při dodržení důležitých zásad v chovu může znamenat výrazný ekonomický efekt. Výkrm kanečků je jedna z cest k vylepšení ekonomiky díky lepší konverzi, nižší mortalitě a vyšší zmasilosti hmotnostně vyrovnaných skupin zvířat (Grauer, 2011). Například při zlepšení konverze o 0,2 kg ušetříme 18 kg krmné směsi, při snížené spotřebě krmné směsi o 0,4 kg na kilogram přírůstku se jedná o 36 kg. Pokud budeme počítat s průměrem ušetřeného krmiva na úrovni 27 kg, což v přepočtu k nákladům představuje úsporu 169 Kč, a připočteme 12,6 Kč za každé procento snižující mortalitu, v průměru tedy vychází 182 Kč na vykrmený kus. V chovu s pěti sty prasnicemi s užitkovostí 27 odstavených selat a při uvažovaném polovičním podílu pohlaví (6750 kanečků z celkového počtu 13500 selat) lze očekávat příjem 1 190 700 Kč (Fred de Cocq, 2012). Ovšem v některých zemích jatky o mladá zvířata s hmotností kolem devadesáti kilogramů nemají zájem. V Nizozemsku, kde chirurgickou kastraci přestala využívat více než polovina chovů, jatky respektují kance vykrmené ve speciálním programu. Na jatkách je pracovník, který hodnotí kvalitu jatečných zvířat podle pachu. Spotřebitelé budou mít na pultech vepřové maso z nekastrovaných zvířat. Vzhledem k velkému objemu nizozemského exportu budou muset chovatelé v další fázi jednat také s představiteli řetězců i v dalších zemích, zejména pak v Německu, kam jeho podstatná část také směřuje. (Jedlička, 2012).

Poznatky a zkušenosti s výkrmem kanečků se liší podle geografického určení. Ve Velké Británii disponují kanečci s vyšší intenzitou růstu a produkcí libového masa až o 30% vyšší efektivností ve srovnání s vepří. V Nizozemí kanečci produkují o 37% méně tuku a o 7,5% lépe zhodnocují krmivo. Itálie uvádí nejrentabilnější produkci masa při výkrmu kanečků do 180 dní stáří. Kančí maso z Kanady obsahuje více bílkovin a méně tuku než maso vepřů a

výskyt kančího pachu je podlimitní do hmotnosti 110kg živé hmotnosti (Dostálová et al., 2008), (Koucký, 2000).

3.2 Vliv pohlaví na kvalitu masa

EU a Anglie považuje chov kastrátů z hlediska welfare za nevhodný, ovšem z hlediska zmasilosti za žádáný. Snížení obsahu tuku v jatečně upraveném těle zvířat je problematika řešená už přes 20 let. Z kulinářského hlediska je často kritizována kvalita masa kanců z pohledu pachu a tuhosti. Dalším problémem jsou podstatné odchylky ve složení jatečných partií (Šprysl et al., 2009). Wood et al. (1994) a MLC (1989) uvádí, že kanečci mají měkčí tuk než vepřici a tuk prasniček obsahuje více vody, více nenasycených vyšších mastných kyselin a méně lipidů než u kanečků a vepřiků. Pohlaví neovlivňuje chuť a jemnost masa, avšak vůni a pach u kanců. V EU je živá porážková hmotnost prasat kolem 95kg, a v tomto případě se může vyskytnout v mase různých genotypů kančí pach. Kančí pach je výsledkem přítomnosti skatolu a androstenonu (Šprysl et al., 2009). Motrensen et al. (1986) a Patterson et al. (1990) udávají korelaci skatolu a androstenonu, která je 0,73 a prahová hodnota skatolu činí 0,25 ppm. Dále udávají existenci velkých rozdílů ve vůni a chuti mezi kanečky, přičemž 3% masa kanečků obsahuje více jak 0,25 ppm skatolu v tuku. Plemeno LW projevuje nižší prahové hladiny kančího zápachu než ostatní plemena a možnost eliminace kančího zápachu vyšší teplotou při kulinářském zpracování (Motrensen et al., 1986, Patterson et al., 1990).

Tab. 1 Vliv pohlaví na kvalitu masa (panel – test – 1 – 8 bodů) (Šprysl et al., 2009)

Ukazatel	kanečci	vepřici	prasničky
jemnost	5,00	4,96	4,94
šťavnatost	4,35	4,41	4,26
chuť	4,59	4,55	4,50
vůně	3,69	3,78	3,84
významný pach	3,80	3,51	3,30

Ingr uvádí (2003, 1996), že vliv pohlaví se nejvýrazněji prosazuje v rozdílné tvorbě a ukládání tuku u zvířat samčího a samičího pohlaví a v tvorbě pohlavního pachu u samců některých druhů zvířat. Tvorba tuku a jeho ukládání, je ovlivněno rozdílností metabolických procesů v organismu samic a samců. Samice metabolizují úsporněji a ukládají část energie jako rezervní tuk pro budoucí vývoj plodu, proto maso samic obsahuje obecně více tuku než maso samců. Ukládaný tuk ovlivňuje senzorickou a technologickou jakost masa (Ingr, 1996,

Pipek, 1995). Dle Pipka (1995) mají nekastrovaní kanečci oproti vepříkům a prasničkám i vyšší podíl libového masa, a to až o 30 %.

3.3 Kančí zápach

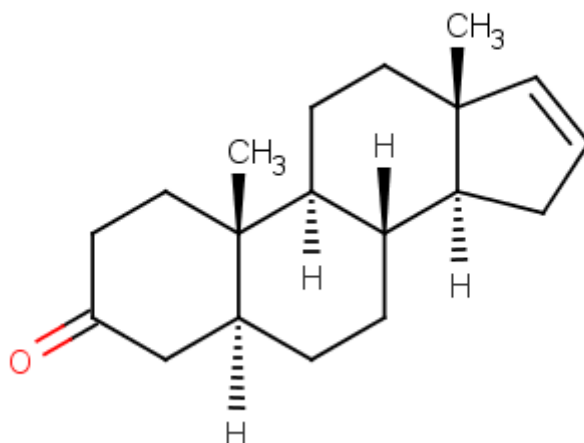
Je způsoben nahromaděním určitých přírodních látek v tuku kanců v průběhu jejich sexuálního dospívání. V závislosti na plemeni, věku a krmení zvířat může být zasaženo maso 10% až 75% všech sexuálně zralých jedinců. Maso, které je zasažené kančím pachem, je spotřebiteli považováno za nevhodné (Kratochvíl, 2010).

3.3.1 Androstenon

Androstenon (5 α -androst-16-en-3-on) je steroidní feromon syntetizovaný ve varlatech. Nadměrné hromadění androstenonu spolu se skatolem (3-methyl-indol) a indolem v tukové tkáni některých kanců vede ke vzniku kančího zápachu. Androstenon se řadí do skupiny přirozených samčích pohlavních hormonů, které vznikají z testosteronu a mají anabolický (biosyntéza bílkovin, retence dusíku) a urogenitální účinek (zrání spermií, činnost přídatných pohlavních žláz). Androstenon se může vyskytovat i v mase bachyň a kastrátů (Velíšek et Hajšlová, 2009). Některé metabolity androstenonu jsou vylučovány močí a část androstenonu je odváděna do podčelistní žlázy, odkud přechází do slin, a slouží jako feromon pro stimulaci sexuálního chování prasnic. Po ukončení pohlavního dospívání a v průběhu stárnutí zvířete se androstenon kumuluje v tukové tkáni a proto je zápach u starších jedinců silnější a častější než u mladších (Zamaratskaia et al., 2009). Limitní hladina látky pro konzumenty je koncentrace $1 \cdot 10^6$ $\mu\text{g/g}$ v mase (Bernardy 2010). Podle studií je citlivost na androstenon vyšší u žen než u mužů, ale hrají zde roli ale i jiné faktory, jako je věk a zeměpisný původ. Existuje i procento lidí, kteří jsou na tento pach rezistentní, trpí tzv. anosmií. Anosmie je nedostatečné vnímání zápachu. Tato zvláštní ztráta čichu se projevuje částečnou (nebo celkovou) ztrátou schopnosti vnímat pach určité látky, přičemž schopnost vnímat pach jiných látek zůstává v normálu (Amoore, 1968). Také řada studií uvádí, že do porážkové hmotnosti 90–105 kg, je kančí maso využitelné pro konzum, pokud koncentrace androstenonu v mase nepřesáhne hodnotu 1 ppm. V izolovaných prasečích hepatocytech, androstenon potlačuje expresi cytochromu P450IIE1 (CYP2E1), což je enzym hlavně zodpovědný za skatol v metabolismu. Androstenon metabolizuje v jaterních mikrosomech. Má lipofilní vlastnosti v tukové tkáni a nadměrné hromadění androstenonu ve hřbetním sádle je jednou z charakteristik kančího zápachu (Doran, 2004). Ukládání androstenonu je závislá na rychlosti syntézy androstenonu ve

varlatech a degradaci androstenonu v játrech. Ze studie (Moe, 2007) vyplývá, že u různých plemen prasat existuje různá hladina androstenonu v těle prasat. Tato studie se zabývala expresí 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy, cytochromem P450 – c17 a sulfotransferázami 2B1 proteinů v játrech a varlatech. Byla provedena na plemenech Norská Landrase a Duroc. Landrase kanci vykazovali průměrnou hodnotu androstenonu $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{g}$ a $7,58 \pm 0,68 \mu\text{g} / \text{g}$ pro Norská Landrase. Duroc kanci $0,22 \pm 0,04 \mu\text{g} / \text{g}$ a $13,55 \pm 1,14 \mu\text{g} / \text{g}$. Studie byly prováděny v rámci jednoho chovu. Hlavní enzymy zapojené do procesu syntézy androstenonu jsou 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (3 β -HSD) a andien- β syntázový komplex, který se skládá z cytochromu P450-C17 (CYP17) a cytochrom B5.

Degradace androstenonu probíhá hlavně v játrech a zahrnuje 2 fáze: *oxidační*, která je katalyzována 3 β -HSD a *konjugativní*, který zahrnuje řadu enzymů, včetně sulfotransferáz (Zamaratskaia et al., 2009).

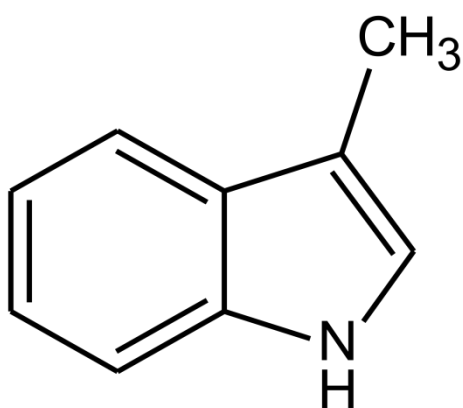


Obr. 1 – Androstenon (<http://akademon.cz/search.asp?searchtext=androstenon>, 2007)

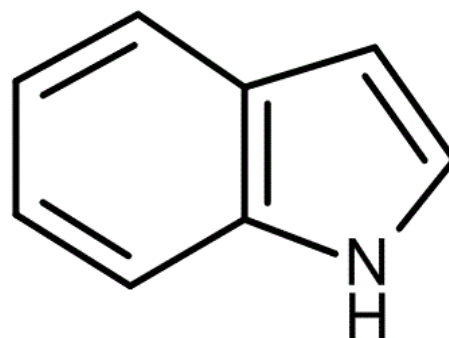
3.3.2 Skatol a indol

Skatol (3-methylindol) a indol vznikají bakteriální degradací L-tryptofanu v tlustém střevě, který je v závislosti na pH degradován buď na indol bez detekovatelných meziproductů, nebo na 3-methylindol pomocí indol-3-acetátu. Více než 80 % tryptofanu je přeměněno na skatol při pH 5,0; při pH 8,0 je 85 % tryptofanu převedeno na indol. Biosyntéza skatolu probíhá ve dvou krocích, nejprve *Escherichia coli* a *Clostridium* spp. rozloží L-tryptofan na indol-3-octovou kyselinu, ze které následně *Lactobacillus* a *Clostridium* syntetizují skatol (Jensen et

al., 1995). Množství vytvořeného skatolu se řídí podle dostupnosti tryptofanu, který je dodáván výživou, dále činností a složením střevních bakterií. Část syntetizovaného skatolu odchází stolicí a část je absorbována přes střevní stěnu do krve a následně do jater. V játrech je skatol metabolizován jaterními enzymy cytochromu P450 a sulfotransferázami ve dvou fázích a dochází ke zvýšení hydrofilnosti metabolitu a jeho následném vyloučení močí nebo žlučí. Nemetabolizovaná část se hromadí v tukové tkáni a způsobuje zápach po fekáliích. Dále byl tento zápach také popisován jako sladký, ovocný, teplý a naftalenový. Vysoká aktivita metabolismu enzymů cytochromu P450 a sulfotransferáz má u dospělých kanců za následek nízkou akumulaci skatolu v tuku. Claus et al. (1993) usuzuje, že změny koncentrace skatolu a indolu ve fekáliích korelují s koncentrací těchto látek v krevní plazmě.



3-Methylindol - (Skatol)



Indol

Obr. 2 – (3-Methylindol - <http://www.biosite.dk/leksikon/skatol.htm>)

Obr. 3 – (Indol - <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indol2.svg>)

3.4 Eliminace výskytu kančího pachu

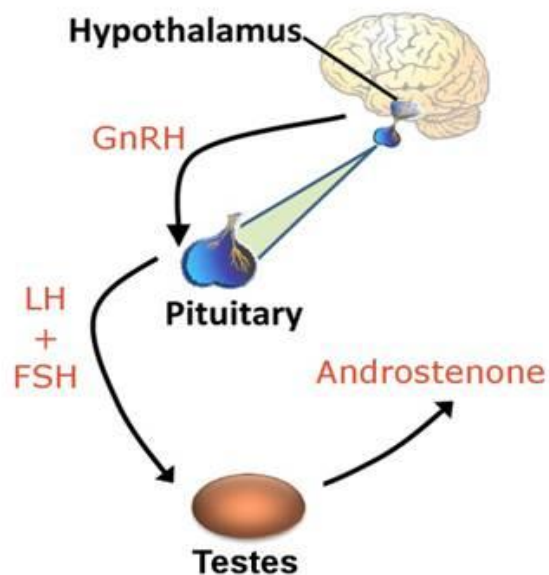
3.4.1 Imunokastrace

Je aktivní imunizace proti gonadotropnímu hormonu (GnRH). Bolest způsobená chirurgickou kastrací je u imunokastrace minimální. A také snižuje agresivní chování u nekastrovaných kanečků. Imunokastrace snižuje produkci androstenonu, velikost reprodukčních orgánů a počet spermií. Úrovně skatolu a indolu jsou také omezeny. Očkování je podáním modifikované formy GnRH, které provokuje vývoj anti-GnRH protilátky, která se váže na GnRH, a zabraňuje stimulaci sekrece luteinizačního hormonu (LH) hypofýzou. Snížení úrovně skatolu a indolu na nízkou až nedetekovatelnou úroveň u imunokastrovaných prasat je s největší pravděpodobností v důsledku zvýšeného metabolického odbourání v játrech, po potlačení steroidní produkce. Z tohoto důvodu umožňuje imunokastrace porážku kanců při vyšších hmotnostech s vyšší zmasilostí. Imunokastrace účinně eliminuje kančí zápach, je v souladu s welfare zvířat, která jsou méně agresivní. Aby byla imunizace účinná, musí být prováděna nejméně čtyři týdny od sebe ve dvou dávkách, což má za následek narušení hypotalamus-hypofýza-gonádní osy, a tím i zadržení syntézy steroidů v Leydigových buňkách varlat. Úroveň steroidů ve varlatech prudce poklesne během týdne po očkování, ale k odstranění kančího zápachu dochází se čtyř až šestitýdenním zpožděním, jak uvádí výrobce vakcíny (Kubale et al., 2013). Imunokastrace nahradila klasickou chirurgickou kastrací, jelikož komise EU pod tlakem veřejnosti pokládá chirurgickou kastraci kanečků, prováděnou bez znecitlivění za hluboké narušení welfare zvířat. Chovatelským opatřením je změna způsobu odchovu výkrmových prasat do nižší porážkové váhy (80 kg), což se v našich podmínkách zdá jako nerentabilní řešení (Bernardy, 2010). Vhodný prostředek pro imunokastraci je přípravek Improvac (Bilskis et al., 2012).

3.4.2 Improvac

Improvac je imunologický přípravek určený pro kance, který obsahuje látku, konjugát analogu hormonu uvolňujícího gonadotropin (GnRF) a proteinu (Bilskis et al., 2012). Bílkovinný nosič se získává z bakterie *Corynebacterium diphtheriae*. Je k dispozici ve formě injekčního roztoku. Používá se ke snížení kančího zápachu v mase, jako alternativa k fyzické kastraci (odstranění varlat), a tak i k omezení zápachu. Podává se mladým kancům ve 2 dávkách v rozmezí alespoň 4 týdnů. První dávka se aplikuje v 8 týdnech života a druhá 4-6 týdnů před porážkou. Přípravek se podává injekčně do krku, do oblasti těsně za uchem.

Působení přípravku Improvac je na způsob vakcíny. Stimuluje imunitní systém k vytváření protilátek. GnRF udržuje aktivitu varlat u kanců. Imunitní systém kance, jemuž byl přípravek Improvac podán, rozpozná syntetický GnRF jako cizí prvek a vytvoří protilátky, které jsou schopny navázat se na přirozený GnRF a zabrání jeho účinku. Přípravek tak snižuje tvorbu pohlavních hormonů ve varlatech včetně adrenostenonu. Nejčastější vedlejší účinek přípravku je otok v místě vpichu. Zákaz používání platí pro prasnice a kance určené na chov. Evropská komise udělila rozhodnutí o registraci přípravku Improvac platné v celé Evropské unii dne 11. května 2009 (European Medicines Agency, 2013).



Obr. 4 – Působení improvacu (http://qpc.adm.slu.se/5_Entire_Male_Pigs/page_10.htm).

3.5 Metody ke stanovení kančího pachu

Nejčastější metody stanovující kančí pach jsou chemické, kam řadíme chromatografii. Ta se dále rozděluje na plynovou a kapalinovou. Dále sem patří metody hmotnostní spektrometrie a spektrofotometrie. A jako alternativní metoda existuje elektronický nos (Lundström et al., 2009).

3.5.1 Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Okamžitá přeměna vzorku na plyn je podmínka pro jeho transportování. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek. Plynová chromatografie se používá k separaci plynů, nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul. Naopak není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí (Klouda, 2003). Plynová chromatografie byla první použitá technika pro určení koncentrace androstenonu v tukové tkáni prasat. V současnosti bylo vyvinuto několik GC (Gas Chromatography – mobilní fázi je plyn) metod pro současné měření androstenonu a skatolu. Ačkoliv androstenon může být analyzován bez derivatizace, derivatizace silylací nebo halogenovaných sloučenin je účinná, pokud použijeme otevřenou křemennou kapiláru GC s detektorem elektronového záchyty (Haugen et al., 2012).

3.5.2 Kapalinová chromatografie

Mobilní fázi je kapalina. Je zde důležitá interakce se stacionární fázi a použití mobilní fáze. V průběhu separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace, jako je adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii. Je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, protože není nutnost převádět vzorek na plyn. Obvykle se pracuje eluční metodou. Srovnání plynové a kapalinové chromatografie z hlediska účinnosti je takový, že kapalinová

chromatografie má nižší příspěvek molekulární difuze složky, protože kapalina má podstatně vyšší viskozitu než plyn. V plynové chromatografii je zanedbatelný příspěvek odporu převodu hmoty v mobilní fázi (Klouda, 2003). Na rozdíl od indolových sloučenin nemá androstenon nativní fluorescenci. Aby byla zvýšena citlivost pro detekci fluorescence, je potřeba derivatizace (Hansen-Møller, 1994).

3.5.3 Hmotnostní spektrometrie

Používá se v kombinaci se separačními technikami jako LC (Liquid Chromatography – mobilní fázi je kapalina) a GC ke kvantifikaci androstenonu, skatolu a indolu současně. Byla vyvinuta a ve vybraném monitorovacím režimu úspěšně použita kapilární plynová chromatografie (CGC) s hmotnostní spektrometrií pro stanovení hladiny androstenonu v tuku. Tyto metody kombinují účinnost separace chromatografie s detekcí síly MS. LC-MS/MS představuje další úroveň specificity monitorováním dceřiných iontů ze sekundární fragmentace mateřských iontů, čímž se rovněž snižuje potřeba chromatografické separace (Haugen et al., 2012). Jsou používány kvadrupólové filtry, lapače iontů a nejnověji nástroje času letu (TOF) (Marsili, 2002).

3.5.4 Spektrofotometrie

Mortensen (1986) vyvinul kolorimetrickou metodu pro kvantifikaci skatolu v tukové tkáni. Po přidání Ehrlichova barvicího činidla (dimethylaminobenzaldehydu) do extraktu se měří spektrofotometrická absorbance. Jednoduchost této metody a relativně krátká doba analýzy (15-20 min) vedla k vývoji automatizovaného systému pro detekci jatečně upravených těl s kančím pachem na porážkové lince, která byla v provozu na dánských jatkách od roku 1990. Nevýhodou této metody je především její nespecifičnost. Zbarvení činidla nerozlišuje mezi indolovými sloučeninami, proto tato metoda není specifická pro skatol, ale měří celkovou koncentraci indolových sloučenin v tukové tkáni. Byla vyvinuta i kolorimetrická metoda pro stanovení androstenonu v tuku (Squires, 1990). Tato metoda je založena na extrakci methanolem z homogenizované tukové tkáně, s následným přidáním barvicího činidla resorcyaldehydu. Analyzuje se skupina látek specifická pro androstenové sloučeniny, která ale odpovídá celkovému množství 16-androstenonových steroidů. Spektrofotometrické metody nejsou přijatelné pro výzkumné účely, pro svá nespecifika pro analýzu jednotlivých

látek způsobujících kančí pach, nejsou tedy schopné změřit přesné údaje o jejich koncentraci (Haugen et al., 2012).

3.5.5 Alternativní metoda – elektronický nos

Analytický přístroj využíván pro testování kvality v potravinářském průmyslu. Využívá řadu slabě specifických chemických senzorů. Sensory v elektronickém nose nejsou specifické pro jednu chemickou látku. Je vytvořen tak, aby napodoboval lidský čichový systém. Přestože lidské čichové sensory nejsou specifické, jsou velmi citlivé na některé pachy. Elektronický nos má stejný základní typ systému senzorů, způsob převádění signálů senzorů, a složku pro analýzu těchto signálů. Existují čtyři základní komponenty pro e - nos: mechanismus aplikace chuťových nebo aromatických těkavých látek na senzory, pole senzorů, způsob převodu signálů senzorů na údaje, které mohou být analyzovány pomocí počítače a softwaru Analýza výstupu ze senzorů. Přístroj e - nos je vhodný na posuzování chemické integrity vzorku, tj. určení, zda vzorek je stejný nebo odlišný, než se očekávalo (Marsili, 2002). Princip metody je založen na základě iontové mobilní spektrometrie. Elektronický nos analyzuje komplexní výpary pomocí sensorových polí, převodu signálu senzoru a analytický software vytváří jednoduchý výstup (Hodgins et. Simmonds, 1995).

3.6 Vnější faktory ovlivňující výskyt kančího pachu

3.6.1 Výživa

Krmnou dávkou se ovlivňuje především tvorba skatolu. Množství skatolu uloženého v tukové tkáni závisí na rychlosti kumulace skatolu, délce časového intervalu ve střevech, střevním vstřebávání a jaterním metabolismu. Budoucí nadějnou možností ke snížení tvorby skatolu v tlustém střevě je přidání snadno zkvasitelných sacharidů do krmné dávky kanečkům před porážkou. Vhodné přísady do KS jsou surové bramborové škroby, čekankové inuliny, nebo sušené kořeny čekanky, upřednostňují tvorbu butyrátu a snižují tvorbu skatolu v tlustém střevě (Hansen et al., 2006). Právě butyrát v tlustém střevě inhibuje apoptózu sliznice, a tím i snižuje dostupnost endogenního tryptofanu pro výrobu skatolu. Dalším možným souvisejícím mechanismem může být modifikace mikrobiální aktivity v zažívacím traktu, která mění rychlost syntézy skatolu a snižuje dobu střevního transportu. Dvacet procent syrového bramborového škrobu po dobu 14 dní před porážkou v denní krmné dávce kanců má blahodárný vliv na snížení hladiny skatolu v tlustém střevě (Qverland et al., 2011). Norští

vědci zkoumali možnost redukce hladiny skatolu v mase kanců zkrmováním artyčoků a topinamburů. Pokusná zvířata krmili týden před porážkou sušenými artyčoky a topinambury. Zkrmování artyčoků nemělo žádný vliv na přírůstky, ale bylo prokázáno mírné zhoršení konverze krmiva. Zkrmování topinamburů týden před porážkou zredukovali obsah skatolu pod kritickou hranici (Koubová, 2013).

3.6.2 Prostředí (environmentální vlivy)

Tento faktor je pro chovatele snadno ovlivnitelný. Znečištěná podestýlka, vysoká hustota osazení prasat v kotci a vysoká teplota zvyšují riziko výskytu kančího pachu. Měli bychom si uvědomit, že v letním období je výskyt kančího pachu vyšší, kvůli vysokým letním teplotám. Možností ovlivnění výskytu kančího pachu je ale daleko více např. způsobem ustájení. Přítomnost prasniček urychluje u kanečků nástup puberty, proto je vhodné oddělené ustájení podle pohlaví (Stupka, 2003). Šprysl et al. (2009) uvádí, že použití celoroštových ustájení prasat oproti jiným systémům snižuje výskyt kančího pachu v mase a tuku. To se týká i ustájení prasat dle pohlaví, jakož i prodlužování dne.



Obr. 5 - (<http://www.farmtec.cz/reference-prasata-169/staj-pro-vykrm-prasat-svidnice-i150.html>)

3.7 Vnitřní faktory ovlivňující výskyt kančího pachu

Mezi vnitřní faktory, které se podílejí na vzniku a akumulaci kančího pachu, řadíme především geny. Genotyp výrazně ovlivňuje výskyt kančího pachu v těle. Byla prokázána velká variabilita mezi jednotlivými plemeny či liniemi a u zušlechtěných plemen byla vysledována nižší tvorba kančího pachu. (Dostálová et al., 2008).

3.7.1 Mapování genomu

Slouží nám k identifikaci jednotlivých genů a markerů. A následnému zjištění jejich polohy na chromozomech. Rozlišujeme vazbové (genetické) mapování (Rohrer et al., 1996) a cytogenetické (chromozomové) mapování (Yerle et al., 1996, 1998). V obou případech se využívají poznatky z lépe prostudovaných druhů, jako je člověk nebo myš (komparativní - mapování) (Chowdhary, 1998).

3.7.1.1 Vazbové (genetické) mapování

Zjišťuje vzájemné polohy genů (lokusů) ve vazbové skupině. Proto je důležité mít k dispozici nejlépe třígenerační rodiny a dostatečný počet polymorfních lokusů (genetických markerů). Genetické markery musí být rovnoměrně rozloženy na chromozomech, musí být snadno testovatelné a vysoce polymorfní. První vazbové mapy prasete byly vytvořeny na základě imunogenetických a biochemických markerů (krevní skupiny) (Rohrer et al., 1996). Podle Echarda je stanoveno sedm vazbových skupin. Současná mapa prasete zahrnuje více než 2000 lokusů (Archibald et al., 1995).

3.7.1.2 Cytogenetické (chromozomové) mapování

Udává polohu genu na chromozomu. Využívá se homologní nebo heterologní DNA sondy. Také se v poslední době začaly využívat somatické hybridní a radiační hybridní panely v kombinaci s PCR (Yerle et al., 1996, 1998). Za účelem identifikace je možno určitým způsobem upravené a obarvené chromozomy pružovat a porovnávat se standardními ideogramy. Poloha genu na cytogenetické mapě je udávána číslem chromozomu, písmenem označujícím raménko a čísly jednotlivých oblastí dle pruhů. U druhů, které mají dobře definovaný karyotyp (např. prase), se ke konstrukci cytogenetických map používá hybridizace *in situ*. Lokalizace genu je prováděna pomocí hybridizace určitého značeného úseku DNA (sonda) s denaturovanou DNA chromozomu. Značení se provádí radioaktivně a dnes převážně fluorescenčně – FISH (Urban, 2008).

3.7.1.3 Komparativní mapování

Srovnávací mapy, na kterých jsou vyznačeny homologní úseky s geny u různých druhů. Geny jsou konzervovány u různých druhů ve stejném chromozomovém úseku. Geny, mezi nimiž je těsná genetická vazba u jednoho druhu, mají tendenci mít tuto vazbu u jiných druhů. Konzervace vzájemného umístění genů je výsledkem společné evoluce (Knoll, 2003). Existují předpoklady, že gen, který je identifikován u člověka, má homologa v genomu dalších savců. Důležitým přínosem je využití mezidruhového barvení chromozomu (Chowdhary, 1998).

3.8 Genetické markery

V dnešní době je molekulární genetika schopna odhalit a identifikovat genetické markery. Mohou zlepšit odhad genetického potenciálu hospodářských zvířat. Genetické markery jsou spojeny s oblastí genů na chromozomech, které způsobují genetickou proměnlivost (Jakubec, 2002). Marker můžeme označit jako dobře charakteristický znak, který je stabilní a na němž můžou být lokalizovány příslušné geny v chromozomech, stejně tak může být i sledován biochemický účinek. Genetické markery musí být zjištěitelné v každém věku jedince, včetně embryí a to u obou pohlaví. Zjištěitelné jsou i heterozygotní genotypy díky kodominantnímu vztahu v rámci alelického páru (Kuciel, 2004). Vlivem záměrného výběru rodičů můžeme provádět plemenitbu, ve které uplatníme znalost již zmíněného genotypu markerů. Jsou popsány tři typy markerů a to markery I. až III. typu.

I. typu – Nejsou často použitelné pro studium diverzity rodin. Kódují exprimované geny s nízkou hladinou polymorfizmu (O'Brien, 1992).

II. typu – Tandemové repetice, které jsou krátké a vysoce variabilní. Mají nekódující sekvence. Studium rodokmenů, diverzity plemen (Kuciel, 2004).

III. typu – Markery v kódujících i v nekódujících sekvencích, nejčastěji v intronech a integrovaných genových oblastech. Studium rodin, linií i populací (Kuciel, 2004).

Markerové typy nám zabezpečují mnohostranné využití. Jako je porovnání odlišných plemen a linií hospodářských zvířat, konstrukce chromozomových map, kontrola rodičovství hospodářských zvířat (Kuciel, 2004).

3.9 Kandidátní gen

Označení kandidátní gen je možné pouze v případě, pokud se v oblasti QTL nalezne gen výrazně ovlivňující určitou vlastnost a jehož produkt se projeví ve výsledném fenotypu a podílí se na fenotypové variabilitě. Takový gen má obrovský účinek na užitkový znak. Kandidátní geny mohou být identifikovány dle databáze pro modelová zvířata, kde již byl výskyt podobného fenotypu studován. Může být zkoumán sekvenováním, a je-li nalezena mutace, provede se asociační analýza (Berg, 2006). Výběr kandidátního genu je na základě známé fyziologické a biochemické funkce genu. Je-li znám účinek genu jednoho savčího druhu, lze s využitím komparativního mapování předpokládat podobný účinek u jiného druhu (Knoll, 1998). Podle Sollera et al., (1998) je počet všech možných kandidátních genů pro danou užitkovost vlastnost řádově 100 a více. Ovšem pouze malá část těchto genů bude asociovaná s kvantitativním efektem v konkrétní populaci (Soller et al., 1998).

3.10 Vybrané geny

Několik kandidátních genů bylo navrženo s cílem ovlivnit úroveň androstenonu. Biosyntéza androstenonu z pregnenolonu je řízena andien- β -syntázovým enzymatickým systémem, který se skládá z cytochromu P450-C17 (*CYP17*) a cytochromu b5 (*CYB5*). I když *CYP17* byl navržen jako velmi silný kandidátní gen ovlivňující úroveň androstenonu, studie dosud nezjistily významné účinky SNPs v *CYP17* genu a androstenonu. Stejně tak nebylo možné najít významné korelace mezi úrovní *CYP17* a úrovní androstenonu v tuku. *CYB5* byl zjištěn v pozitivní korelaci k výskytu androstenonu. Další významné rodiny kandidátních genů jsou sulfotransferazy (*SULT*). Hydroxysteroid sulfotransferaza (*SULT2A*) je zodpovědná za sulfokonjugaci androstenonu v játrech a varlatech. Podle Sinclair et al., (2006) by snížení schopnosti sulfokonjugace androstenonu ve varlatech, mělo za následek zvýšení hladiny androstenonu v plazmě, umožňující akumulaci androstenonu v tuku. Sinclair et al., (2006) prokázali, že činnost enzymů varlat (*SULT2A*) je v negativní korelaci s hladinou androstenonu v tuku kanců plemene Yorkshire. Očekávané umístění genu (*SSC6*, v blízkosti 80 cM) je příliš vzdálené od androsteronu. QTL pro hladinu androstenonu se vyznačuje na tomto chromozomu. Existuje domněnka, že úroveň androstenonu se liší i mezi plemeny. Vyšší úroveň androstenonu je u plemene Duroc a Hampshire ve srovnání s plemeny Landrase a Yorkshire (Robic et al., 2008). Proto je obrovský zájem studovat geny u jedinců s vysokou nebo nízkou úrovní androstenonu u různých plemen. Podle Robic et al. (2008) první QTL analýza na hladinu androstenonu v tuku byla provedena na třígeneračním kříženci mezi

plemeny Large White a Meishan. První čtyři hlavní QTL byly zjištěny na prasečích chromozomech SSC3, SSC7, SSC13, SSC14 a jednoznačně vykazovaly vysoké hladiny androstenonu alela plemene Meishan (Quintanilla et al., 2003). Ovšem Lee et al. (2005), se domníval na základě panelových zkoušek, že hlavní QTL vykazující vysoké hladiny androstenonu na chromozomech SSC13 a SSC14 spíše souvisí s vysokou hladinou skatolu a indolu. Plemeno LW projevuje nižší prahové hladiny kančího zápachu než ostatní plemena a možnost eliminace kančího zápachu vyšší teplotou při kulinářském zpracování (Motrensen et al., 1986, Patterson et al., 1990). V další genomové studii, která porovnávala tři plemena prasat a to Duroc, Dánská Landrase a Yorkshire. U plemene Duroc byly zjištěny nejvyšší hodnoty androstenonu a skatolu (Gregersen et al., 2012).

Vybrané geny ovlivňující výskyt androstenonu u prasat (Robic et al., 2008)

- CYP17A1
- CYB5A
- HSD3B1
- SULT2A1

Vybrané geny ovlivňující výskyt skatolu u prasat (Diaz et Squires, 2000)

- CYP2A6
- CYP2E1

3.11 Geny ovlivňující výskyt androsteronu

3.11.1 CYP17A1

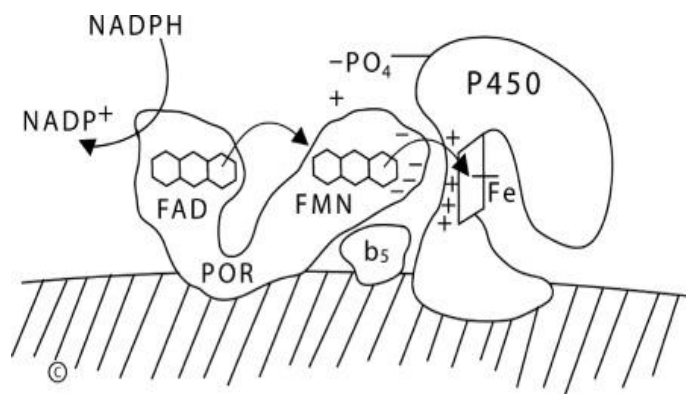
P450c17 je mikrozomální P450 enzym, který katalyzuje 17 α -hydroxylázy a 17, 20 lyázy v nadledvinách a pohlavních žlázách. Usiluje se o utvrzení myšlenky, že rozdíl mezi 17 α -hydroxylázy a 17, 20 lyázy je funkční, a negenetického nebo strukturálního původu. P450c17 je kódován jedním genem na chromozomu 10q24.3. Ovšem původní myšlenka byla taková, že se jednalo o dva specifické tkáňové izoenzymy. Tento gen, formálně nazýván *CYP17A1* je strukturálně příbuzný genu *P450-c21* (21 – hydroxylázy) (Walter et al., 2010). Cytochrom P450-C17 (CYP17) kooperuje s cytochromem B5 biosyntézou androstenových steroidů a pohlavních steroidů z pregnenolonu. Aminokyselinové substituce v CYP17 mohou ovlivnit

schopnost tohoto enzymu katalyzovat reakce vedoucí k produkci androstenonu a pohlavních steroidů. Analýza (SSCP) je jednou z nejjednodušších, nejspolehlivějších a nejcitlivějších metod pro detekci mutací založených na PCR (Orita et al., 1989, Sheffield et al., 1993). Molekulární hmotnost CYP17 proteinu je přibližně 57 kDa (Payne et al., 2004). Imunoexprese z P450c17 byla zkoumána na vaječnicích březích prasnic a varlat kanců. U prasnic byl P450c17 detekován v malých buňkách žlutého tělíska a u kanců v Leydigových buňkách (Knapczyk-Stwora et al., 2011). Nedostatek 17 α -hydroxylázy (17OHD) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené genovou mutací CYP17A1 projevující se hypertenzí a hypokalemií. Poruchy v 17 α -hydroxylázy a 17, 20 lyázy vedou ke snížení glukokortikoidů a produkci steroidů s mineralokortikoidním přebytkem (Hwang et al., 2011). Katagiri (1982) se domnívá, že cytochrom b5 zvyšuje reakci 17, 20 lyázy CYP17A1 a reakce je závislá na koncentraci cytochromu b5. Tuto domněnku potvrzuje i Onoda et al., (1982). Přítomnost cytochromu b5 zvyšuje přeměnu 17 – hydroxypregnenolonu (17 OHPREG) na dehydroepiandrosteron (DHEA) (Katagiri et al., 1995). Nebyly zjištěny žádné výrazné změny u hydroxylace progesteronu v přítomnosti cytochromu b5, ovšem hydroxylace u pregnenolonu byla zaznamenána 2 - krát větší v přítomnosti cytochromu b5 (Katagiri et al., 1995). Meadus et al. (1993) uvádí, že biosyntéza androstenonu je katalyzována β – syntézou enzymového komplexu, který se skládá z cytochromu P450 – c17 (CYP17) a cytochrom b5 (CYB5). Proto je možné, že mutace v CYP17 můžou mít vliv na výskyt kančího zápachu u prasat.

3.11.2 CYB5A

Cytochrom b5 (CYB5) je hlavní složkou andien – β syntázy enzymového systému (Meadus et al., 1993). CYB5 je protein vázaný na membránu a tím zapojen do biologických procesů (Schenkman et Jansson, 2003). Vysoké hladiny CYB5 byly označeny za jednu z příčin zvýšeného výskytu androstenonu ve varlatech prasat (Babol et al, 1998, Davis et Squires 1999). Z tohoto důvodu změny v genu *CYB5* by mohly být využity jako genetické markery pro androstenon. Interakce mezi *CYB5A* a FTL (ferritin, light polypeptide) může ovlivnit hladinu androstenonu prostřednictvím přenosu CYB5A/CYP 450 elektronů (Bonfils et al., 1981). V jedné studii zkoumali vzorek *CYB5* mRNA v různých tkáních prasat. Technika PCR – SSCP sloužila jako obrazovka pro polymorfismy cDNA *CYB5A*. Identifikovali substituční mutace G \rightarrow T na 5' UTR (nepřekládaná oblast). UTR začíná na prvním nukleotidu mRNA a končí na posledním nukleotidu před počátkem translace. 5'UTR často nese regulační oblasti a u prokaryot většinou obsahuje vazebné místo pro ribozom, takzvanou Shine-Delgarnova

sekvence (Kochetov et al., 1998). Prováděním studií bylo potvrzeno, že kapacita cytochromu B5 ovlivňuje aktivitu cytochromu P450. Apo – b5 zlepšuje činnost *CYP3A4*, *CYP2A6*, *CYP2C19* a *CYP17A1*, ale nikoli *CYP2E1* nebo *CYP2D6*, což naznačuje, že interakce cytochromu b5 se pohybuje mezi P450s. CYB5 aminokyselinové zbytky E48 a E49 efektivně stimulují aktivitu 17,20 – lyázy *CYP17A1*. CYB5 aminokyselinové zbytky D58 a D65 efektivně stimulují aktivitu *CYP2E1* a *CYP2C19*. Složení fosfolipidů významně ovlivňuje interakce cytochromů B5-P450 (Hwei-Ming Peng et al., 2012). Rozpustná cytochromu B5 se nachází v erytrocytech, zatímco forma vázaná na membránu se nachází v endoplazmatickém retikulu v mnoha tkáních, jako jsou játra. CYB5 protein má hemo protetickou skupinu se dvěma atomy dusíku histidin, které stabilně koordinují hemo železo (Hwei-Ming Peng et al., 2012).



Obr. 6 - Huang et al., (2008)

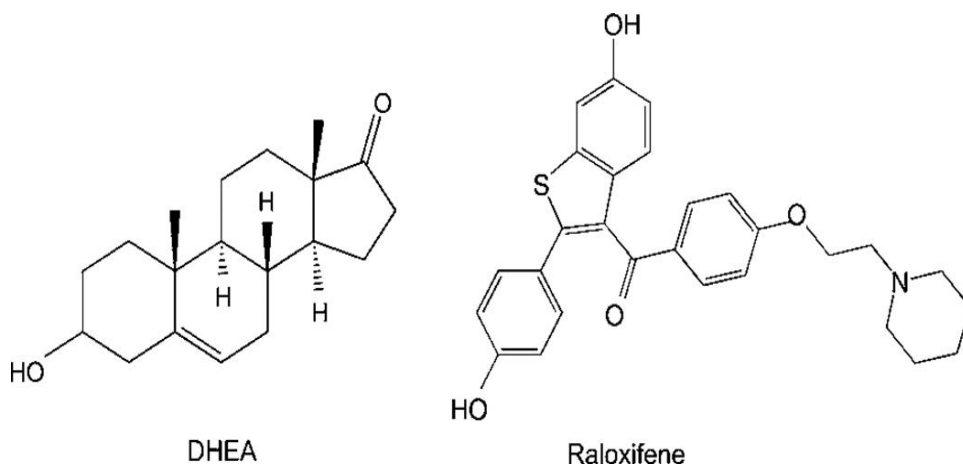
3.11.3 HSD3B1

3 β hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β – HSD) je popsána jako jeden z enzymů ovlivňující výskyt androstenonu v játrech prasat (Moe et al., 2007). Je často spojována se steroidogenezí, ale její funkce v metabolismu steroidů je nejasná. 3 β -HSD se podílí na syntéze řady přírodních steroidních hormonů, včetně progesteronu a testosteronu. Také se podílí na jaterní degradaci androstenonu. HSD3B je zařazen do kandidátních genů vlivem příslušné funkce v produkci androstenonu (Doran et al., 2004). Enzymová aktivita 3 β -HSD je ovlivněna vnějšími faktory, jako je složení potravy. Je potvrzen vliv estrogenního mykotoxinu zearalenonu na expresi a aktivitu jater. Zearalenin se do těla dostává po požití napadené kukuřice nebo obilovin. Tato sloučenina má při vysokých koncentracích hyper estrogenické účinky. Bylo dokázáno, že část požitého zearalenonu se převede na metabolit 3 β –

hydroxysteroid dehydrogenázy v játrech prasat. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza je vázána na membránu a byla poprvé popsána Samuelsem et al. v roce 1951. Patří do skupiny oxidoreduktázy, které působí na skupinu CH-OH s NAD + nebo NADP. Nachází se jak v endoplazmatickém retikulu, tak i v mitochondriích. 3 β -HSD je nutný pro biosyntézu všech tříd steroidních hormonů, jako jsou glukokortikoidy, mineralokortikoidy, progesteron, androgeny a estrogeny. Nové studie dokazují, že jednonukleotidové polymorfismy u plné délky genu ovlivňují hromadění androstenonu u prasat plemene Duroc. 3 β -HSD má dvojí funkci a to podle lokalizace – v Leydigových buňkách nebo v hepatocytech. Vznik androstenonu závisí na rovnováze mezi biosyntézou androstenonu ve varlatech a činnosti 3 β -HSD v játrech (Rasmussen et al., 2013).

3.11.4 SULT2A1

Hydroxysteroidní sulfotransferáza (SULT2A1) je klíčový enzym jaterního metabolismu. Sulfotransferáza enzymy jsou cytosolické proteiny zapojené do katalýzy steroidů a žlučových kyselin. Jedním z hlavních steroidních sulfotranferáz je hydroxysteroidní sulfotransferáza, která má velice širokou substrátovou specifitu. Primární substrát je dehydroepiandrosteron (DHEA), a proto i původní název byl DHEA – sulfotransefáza (Comer et al., 1993). Raloxifen disponuje benzo - fenolovou skupinou. Struktura DHEA a raloxifenu naznačuje významné rozdíly ve vazebných vlastnostech a kinetice aktivního místa *SULT2A1* (Cook, 2010). Podle Sainiho et al. (2004) gen *SULT2A1* může být řízen různými nukleárními receptory, včetně androstenového receptoru (CAR). *SULT2A1* obsahuje 22 substrátů, z nichž 14 je dobře známo (Cook, 2013). Analýza myšského genomu indikuje přítomnost 7 *SULT2A* genů seskupených na chromozomu 7 (Kočárek et al., 2008), u prasat je seskupení na chromozomu 6 (Duijvesteijn et al., 2010). Bio – signální molekuly, včetně neurotransmiterů a hydroxysteroidů jsou upraveny sulfonací. Sulfonace obvykle vede k inaktivaci biologických signálních molekul, které jsou schopny se vázat na receptory. Sulfonace xenobiotik obvykle vede k detoxikaci a jsou snadno vylučovány. SULT2A1 není přítomen pouze v játrech, ale také v tenkém střevu, mozku a nadledvinkách (Alnouti et al., 2006, Nowell et al., 2006, Richard et al., 2001). SULT2A1 je jedním z hlavních SULT2 enzymů (Fang et al., 2007, Liu et al., 2006). Sulfonace SULT2A1 a SULT1E1 slouží ke snížení koncentrace aktivního ligandu (Falany, 1997).



Obr. 7, 8 - Struktura DHEA a raloxifenu (Cook, 2010).

3.12 Geny ovlivňující výskyt skatolu

3.12.1 CYP2E1

CYP2E1 je jaterní enzym, který se podílí na metabolismu látek s nízkou molekulovou hmotností xenobiotik (etanol, pyridin, aceton). Bylo potvrzeno, že nízké hladiny skatolu v tuku prasat způsobuje vysoká exprese CYP2E1 (Skinner et al., 2005). Rovněž bylo vypořádováno, že v období dospívání dochází k vzestupu hladiny skatolu, který způsobuje inhibice CYP2E1 zapříčiněná androstenonem (Moe et al., 2008). U skatolu je větší důraz kladen na úroveň činnosti *CYP2E1*, než na úroveň činnosti *CYP2A* (Turner et al., 2006). Tambyrajah et al. (2004) uvádějí, že promotor CYP2E1 je aktivován transkripčními faktory COUP – TF1 a HNF – 1 v játrech.

3.12.2 CYP2A6

CYP2A6 byl charakterizován u několika savčích druhů, včetně myši a člověka. U každého druhu byly prokázány rozdíly v regulaci a v katalytické aktivitě (Salguero et al., 1995). Proteiny cytochromu P450 se u savců nachází především v mikrozomech hepatocytů a jiných typů buněk, které oxidují steroidy a mastné kyseliny. Jsou důležité pro detoxikaci různých

sloučenin (Munro, 2007). Genomové místo CYP2A6 je na chromozomu 19. Byla provedena studie, při které se došlo k závěru, že stimulace choriogonadotropinem (hCG) má pozitivní vliv na potlačení jaterní činnosti CYP2E1 a CYP2A v důsledku zvýšení hladiny steroidů ve varlatech kanců. Studie byla provedena u kanců plemene Duroc a Landrase (Zamaratskaia, 2008).

Inhibitory CYP2A snížily produkci všech známých metabolitů skatolu, zatímco inhibitory CYP2E1 snížily produkci z pěti ze sedmi metabolitů skatolu (Draper et al., 1997).

4. Metodika

Do testu bylo zařazeno 45 prasat hybridní genetiky DanBred. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin podle pohlaví – vepřici 1v (n=10); prasničky 2p (n=10); kanečky 3k (n=15); imunokastráti 4i (n=10). Všechna zvířata byla vykrmena na testáčnické stanici v Ploskově u Lán. Výkrm probíhal za podmínek běžných v užitkových chovech v ČR. Zvířata byla porážena ve věku 136 dnů a v průměrné živé hmotnosti 115 kg. Při porážce byla od všech zvířat odebrána krev, svalová a tuková tkáň pro laboratorní analýzy.

Pro porovnání frekvence genotypů bylo otestováno 50 vzorků DNA čistokrevných jedinců (Bílé ušlechtilé n=8; Divoké prase n=9; Pietrain n=6; Meishain n=7; Přestické černostrakaté n=7; Landrase n=4; Duroc n=2; Hampshire n=4; České výrazně masné n=3) z databáze Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v Liběchově.

4.1 Stanovení hladiny androstenonu a skatolu

Ze vzorku tukové a svalové tkáně prasat bylo provedeno určení hladiny androstenonu pomocí kapalinové chromatografie dle metodiky Hansena-Møllera (1994) – HPLC Jasco řady 2000, Tokio, Japonsko. Androstenon, skatol a indol byli derivatizováni pomocí dansylhydrazinu v autosampleru Jasco AS 2059 Plus (Tokio, Japonsko) a následně nastříknuty do kolony Kinetex (Torrance, USA) 5 μ C18 100 A (50 x 4,60 mm). Záznamy byly vyhodnoceny v programu ChromNAV (Tokio, Japonsko) a kvantifikovány na základě retenčních časů známých ze standardů androstenonu a skatolu.

4.2 Určení genotypu testovaných zvířat

V této práci byl testován SNP v genu CYP17A1. Tento polymorfismus byl již dříve detekován v práci Lin et al. (2005) na 1317 nukleotidu. Zde dochází k substituci thyminu za adenin (T \rightarrow A). Tato mutace následně mění aminokyselinu v syntetizovaném proteinu z Leu⁴³⁹ na His⁴³⁹. Z krve testovaných zvířat byla izolována DNA pomocí izolačního kitu Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell). Po každé izolaci byla DNA kontrolována elektroforézou na 1 % agarozovém gelu. Primery pro tvorbu PCR produktů byly navrženy pomocí programu Oligo 6. Sekvence pro tvorbu těchto primerů byla převzata z databáze Ensembl (Sscrofa10.2).

CYP17A1 - Exon 7 (testovaný SNP je vyznačen zeleně)

**CATTGGCGAATTTACCATTGACAAGGACACAGATGTTCGTCAATCTGTGG
GCACTGCATCACAATGAGAAGGAGTGGCA****C****CGGCCCGACCTGTTTCATGCCT
G**

4.3 Primery A,B

CYP17A1-A: 5'- GCT GCC ACC CAC TGA CTA AT - 3'

CYP17A1-B: 5'- GCT GCA AAG AAT CTG GGT AAG T - 3'

Délka PCR fragmentu je 659bp. Podmínky pro tvorbu PCR produktu uvádí tabulka. Tento PCR produkt byl kontrolován na 1,5% agarozovém gelu a dále štěpen restriční enzymem **BshNI (BanI)** - G/GCA - G/GCT a opět kontrolován na 1,5% agarozovém gelu – délka štěpených fragmentů: 216bp a 443bp.

Tab. 2 Optimalizace primerů a tvorba PCR produktů (4 vzorky)

PCR H ₂ O	65,2μl
LA pufr	10,0 μl
MgCl ₂ -1,5mM	6,0 μl
dNTP	2,0 μl
DMSO	2,0 μl
Primer A	4,0 μl
Primer B	4,0 μl
LA-polymeraza	0,8 μl

Teplotní program pro tvorbu PCR produktů

- | | | |
|----|---------|-------|
| 1. | 95°C | 2min |
| 2. | 55°C | 30sec |
| 3. | 68°C | 45sec |
| 4. | 95°C | 30sec |
| 5. | Go to 2 | 29x |
| 6. | 55°C | 30sec |
| 7. | 68°C | 5min |
| 8. | 4 °C | |

4.4 Statistické vyhodnocení

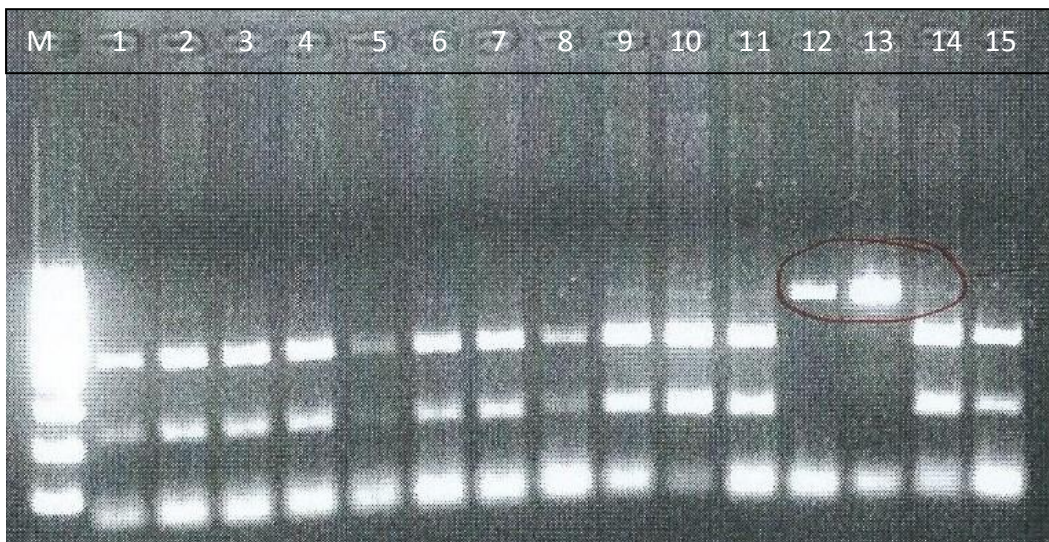
Získaná data byla statisticky vyhodnocena programem SAS 9.2 – procedurami Means a GML na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Hodnocen byl vliv testovaného polymorfismu a vliv pohlaví na hladinu androstenonu v tukové tkáni prasat.

5. Výsledky

Alela T na 1317 nukleotidu v genu *CYP17* byla v hybridní populaci detekována u 2 jedinců. A to v kategorii prasniček (čp. 362) a v kategorii kanečků (čp. 251). Obě zvířata byla identifikována jako dominantní homozygoti. Ostatní testovaná zvířata byla identifikována jako homozygoti recesivní A/A, kdy docházelo ke štěpení restrikčním enzymem. V testované populaci se nenachází ani jeden heterozygot A/T. Zastoupení jednotlivých genotypů podle pohlaví znázorňuje tabulka 3.

Tab. 3 Frekvence zkoumaného genotypu u kříženců

Pohlaví	Počet zvířat	A/A	T/T	A/T
prasničky	10	10	1	0
vepřici	10	10	0	0
imunokastráti	10	10	0	0
kanečci	15	14	1	0
Celkem	45	43	2	0



Obr. 9 – Elektroforéza: CYP17A1 – restrikce vzorky (1 – 11, 14 – 15 – A/A, vzorky 12, 13 – T/T)

Z 50-ti vzorků od čistokrevných jedinců různých plemen uvedených v tabulce 4, byl identifikován jeden vzorek jako dominantní homozygot T/T. Dominantní homozygot byl nalezen u plemene Pietrain. Ostatní jedinci jsou homozygoti recesivní A/A. Ani u této testované skupiny zvířat nebyl nalezen žádný heterozygot A/T.

Tab. 4 Frekvence zkoumaného genotypu u čistokrevných jedinců

Plemeno	počet zvířat	A/A	T/T	A/T
Bílé ušlechtilé	8	8	0	0
České výrazné masné	3	3	0	0
Divoké prase	9	9	0	0
Duroc	2	2	0	0
Hampshire	4	4	0	0
Landrase	4	4	0	0
Meishan	7	5	0	0
Pietrain	6	5	1	0
Přeštické černostrakaté	7	7	0	0
Celkem	50	49	1	0

Genotyp (T/T) v genu *CYP17A1* byl detekována u prasničky číslo 362. Tabulka 5 dokládá hodnoty androstenonu a skatolu u prasniček. Nejnižší hodnota androstenonu byla stanovena u prasničky číslo 362. Naopak nejvyšší hodnota androstenonu byla u prasničky číslo 281. Nejnižší hladina skatolu byla u prasničky číslo 332 a nejvyšší hladina skatolu u prasničky číslo 352. U prasniček nebyly zjištěny hodnoty přesahující spotřebiteli tolerované hladiny androstenonu a skatolu, přesto jsou mezi jednotlivými hladinami androstenonu a skatolu značné rozdíly.

Tab. 5 Hladina androstenonu a skatolu u prasniček

číslo prasničky	Androstenon (µg/g)	Skatol (µg/g)
281	0,635	0,046
291	0,119	0,041
301	0,117	0,034
302	0,275	0,064
312	0,119	0,058
332	0,093	0,006
341	0,133	0,041
342	0,140	0,050
352	0,200	0,109
362	0,047	0,013

Hodnoty androstenonu a skatolu u vepříků nám dokládá tabulka 6, kde nejvyšší hodnoty androstenonu a skatolu mají zvířata číslo 42 (androstenon – 0,523 µg/g) a 82 (skatol – 0,100 µg/g). Nejnižší hodnoty androstenonu a skatolu jsou u zvířat číslo 92 (androstenon – 0,031 µg/g) a 81 (skatol – 0,025 µg/g). U vepříků nebyly zjištěny hodnoty přesahující spotřebiteli tolerované hladiny androstenonu a skatolu, ale i zde pozorujeme rozdíly mezi jednotlivými zvířaty.

Tab. 6 Hladina androstenonu a skatolu u vepříků

číslo vepřika	Androstenon (µg/g)	Skatol (µg/g)
11	0,163	0,037
21	0,219	0,067
31	0,285	0,040
32	0,180	0,052
42	0,523	0,048
62	0,063	0,049
71	0,150	0,049
81	0,084	0,025
82	0,148	0,100
92	0,031	0,036

Tabulka 7 dokládá hodnoty androstenonu a skatolu u imunokastrátů. Hodnoty v tabulce nám dokládají obrovské rozdíly mezi imunokastrovanými zvířaty. U dvou imunokastrátů přesáhla hladina androstenonu prahové hodnoty. Nejvyšší hodnota androstenonu byla zjištěna u zvířete číslo 181 a nejvyšší hodnota skatolu u zvířete číslo 162, zatímco nejnižší hodnoty androstenonu a skatolu byli zjištěny u zvířat číslo 121 a 152.

Tab. 7 Hladina androstenonu a skatolu u imunokastrátů

číslo imunokastráta	Androstenon (µg/g)	Skatol (µg/g)
101	0,735	0,059
111	0,087	0,020
121	0,030	0,022
122	0,147	0,135
132	1,466*	0,087
152	0,284	0,019
161	0,194	0,023
162	0,180	0,150
172	0,106	0,090
181	2,105*	0,037

*Hodnoty přesahující spotřebiteli tolerované hladiny androstenonu a skatolu

Genotyp (T/T) v genu *CYP17A1* byl detekována u kanečka číslo 251. V kategorii kanečků téměř všechna testovaná zvířata přesahovala přijatelné hladiny androstenonu 0,5 – 1,0 µg/g a třetina jedinců (n=5) i přijatelné hladiny skatolu 0,2 – 0,25 µg/g. Nejvyšší hodnotu androstenonu měl kaneček číslo 57, kdy tato hodnota přesahovala 14,483 µg/g. A nejvyšší hodnota skatolu byla zjištěna kanečka s číslem 221 (0,316 µg/g). Nejnižší hodnota androstenonu i skatolu byla stanovena u kanečka číslo 84.

Tab. 8 Hladina androstenonu a skatolu u kanečků

číslo kanečka	Androstenon (µg/g)	Skatol (µg/g)
43	4,161*	0,246
57	14,483*	0,165
79	4,467*	0,265*
84	0,911	0,106
88	5,346*	0,147
191	1,390*	0,225
192	2,453*	0,158
202	1,575*	0,263*
211	2,108*	0,185
221	2,860*	0,316*
231	3,043*	0,291*
251	2,397*	0,254*
252	2,689*	0,152
262	1,816*	0,131
272	3,476*	0,237

*Hodnoty přesahující spotřebiteli tolerované hladiny androstenonu a skatolu

Tabulky 9 a 10 ukazují, že pohlaví má na hladinu androstenonu a skatolu statisticky průkazný vliv. Ze 4 sledovaných pohlaví byl statisticky průkazný vliv ($P < 0,05$) prokázán pouze u kanečků a to jak na hladinu androstenonu, tak na hladinu skatolu. Průměrná hodnota androstenonu u zmiňovaných kanečků je 3, 82164 µg/g. Druhá nejvyšší hodnota je u imunokastrátů a poté u prasniček a vepřků v případě androstenonu. V případě skatolu je nejvyšší průměrná hladina naměřena u kanečků, pak u imunokastrátů, vepřků a prasniček.

Tab. 9 Vliv pohlaví na hladinu androstenonu v tukové tkáni prasat

pohlaví	n	\bar{x}	s	P<0,05
1v	10	0,45432	0,61662	0,4659
2p	10	0,74867	0,7534	0,3268
3k	15	3,82164	0,55535	<.0001
4i	10	0,83177	0,65381	0,2112

1v – vepřici; 2p – prasničky; 3k – kanečci; 4i - imunokastráti

Tab. 10 Vliv pohlaví na hladinu skatolu v tukové tkáni prasat

pohlaví	n	\bar{x}	s	P<0,05
1v	10	0,045	0,01441	0,0035
2p	10	0,03256	0,0176	0,0723
3k	15	0,2126	0,01297	<.0001
4i	10	0,05747	0,01527	0,0006

1v – vepřici; 2p – prasničky; 3k – kanečci; 4i – imunokastráti

6. Diskuze

Gen *CYP17A1* byl navržen jako velmi silný kandidátní gen ovlivňující úroveň androstenonu (Moe, 2007), ale zatím nebyl nalezen významný vliv SNP mutací v genu *CYP17* a stejně tak nebyla nalezena významná korelace mezi úrovní *CYP17* a úrovní androstenonu v tuku (Davis et al., 1999).

Meadus et al. (1993) zjistil vliv genu *CYP17* na metabolismus androstenonu u prasat. Davis et Squires (1999) uvádí, že nezjistil žádné významné účinky cytochromu P450 – c17 na hladinu androstenonu v těle prasat.

Lin et al., (2005) klonoval a sekvenoval kodující oblast prasečího genu *CYP17* a zjistil polymorfismus, vyskytující se na 1317 nukleotidu, jedná se o substituci (T → A) (thymin → adenin), což způsobí změnu aminokyseliny leucin - Leu⁴³⁹ na histidin - His⁴³⁹. Tato studie se zabývala identifikací jednonukleotidového polymorfismu v prasečích varlatech a jeho vliv na steroidogenezi – cytochrom P450 – c17 (*CYP17*). Ačkoliv předpokládal vliv mutací v tomto genu na změnu enzymatické aktivity ovlivňující biosyntézu androstenonu nebo pohlavních hormonů, nic takového se nepotvrdilo. U prasat nebyly pozorovány ani další polymorfismy, které jsou velice důležité pro správné interakce mezi *CYP17* a *CYP5*. Proto autoři tvrdí, že syntéza androstenonu ve varlatech prasat není přímo ovlivněna polymorfismem v kodující oblasti *CYP17*.

Ani v této diplomové práci nebyl prokázán vliv této konkrétní SNP na hladinu androstenonu. Moe et al., (2007) uvádí, že geny kodující prasečí enzym *CYP17* jsou odlišně exprimovány u zvířat s vysokými a nízkými koncentracemi androstenonu. Jelikož existuje možnost, že projevy jednotlivých genů se mohou lišit podle plemene, provedl Moe et al. (2007b) studii na plemenech Landrase a Duroc. Ani u jednoho z testovaných plemen však nebyl prokázán významný rozdíl mezi projevem *CYP17* u zvířat s nízkou a vysokou hladinou androstenonu.

Lin et al., (2005) testoval 69 kanců 4 plemen (Pietrain, Duroc, Yorkshire, Landrase a jejich kříženců). Testované populaci předpokládal vliv alely A na vyšší hladinu androstenonu. Tento vliv nemohl jednoznačně posoudit, pro velmi nízkou četnost této alely (n=7). V naší testované populaci hybridní kombinace Danbred byla tato alela resp. kombinace T/T nalezena jen ve dvou případech a ostatní jedinci měli genotyp A/A.

Pro porovnání byla přidána ještě data o genotypu od zvířat z čistokrevných populací. Byl zjištěn jeden jedinec s genotypem (T/T) u plemene Pietrain. Ani v hybridní populaci ani mezi

čistokrevnými plemeny nebyl nalezen heterozygot (A/T). Ani v diplomové práci ani v práci Lin et al., (2005).

Vzhledem k velice nízkému výskytu alely T nelze tvrdit, že má nějaký vliv na hladinu androstenonu v těle prasat. Naopak můžeme tvrdit, že alela A resp. genotyp A/A nemá průkazný vliv na hladinu androstenonu u této testované populace, jelikož se tento genotyp vyskytuje u 43 ze 45 testovaných jedinců.

Velíšek et Hajšlová (2009) uvádí, že androstenon se může vyskytovat i v mase bachyň a kastrátů. V této diplomové práci byli zahrnuti vepřici, kanečci, imunokastráti a prasničky. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny u kanečků. Ovšem i u imunokastrátů byly naměřeny dvě hodnoty přesahující 1,0 µg/g androstenonu - Kameník et al. (2012) uvádí prahovou hodnotu androstenonu 0,5 – 1,0 µg/g a u skatolu 0,2 – 0,25 µg/g stejně jako Motrensenovi et al. (1986) a Pattersonovi et al. (1990). U kanečků byl vliv pohlaví i statisticky průkazný $P < 0,05$. Ačkoliv u ostatních kategorií nepřesáhla hladina androstenonu spotřebiteli tolerované hodnoty, můžeme i tady pozorovat rozdíly mezi jednotlivými zvířaty: prasničky (č. 281 – 0,635 µg/g a č. 362 – 0,047 µg/g) a vepřici (č. 42 – 0,523 µg/g a č. 92 – 0,031 µg/g).

7. Závěr

Tato práce se zabývala vlivem vybraného kandidátního genu *CYP17A1* a jeho polymorfismu na výskyt androstenonu u vykrmovaných kanečků. Nejvyšší hladina kančího pachu byla zjištěna u kanců. U testované populace kříženců DanBred se vyskytovaly pouze dva jedinci s testovanou SNP. Vzhledem k nízké četnosti alely T v testovaném genu, není možné s jistotou potvrdit ani vyvrátit vliv genu *CYP17A1* na výskyt androstenonu u testované hybridní populace Danbred. V případě tohoto genu nelze ani potvrdit hypotézu práce, že jednotlivé genotypy vybraných genů mají vliv na hladinu androstenonu a skatolu. Je třeba provést testování na větším počtu jedinců. Jednoznačně lze potvrdit jen vliv kančího pohlaví.

8. Seznam literatury

Amoore, J.E., Venstron, D., Davis, A.R. 1968. Measurement of speciál anosmia 1. Albany, California, Southern Universities. cit. 2014 – 02 – 16

Archibald, A.L., Haley, C.S., Brown, J.F., CouperWhite, S., McQueen, H.A., Nicholsson, D., Coppieters, W., Vandewegle, A., Stratil, A., Wintero, A.K. 1995. The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*), mammalian genome. Biomed central. 6. 157 – 175

Babol, J., Squires, E.J., Lundstrom, K. 1998. Hepatic metabolism of skatole in pigs by cytochrome P4502E1. J. Animal Science. 76. 822 – 828

Babol, J., Squires, E.J., Lundstrom, K. 1998. Relationship between oxidation and conjugation metabolism of skatole in pig liver and concentrations of skatole in fat J. Animal Science. 76. 829 – 838

Berg, F. 2006. Genetic analysis of fat metabolism in domestic pigs and their wild ancestor. Acta Universitatis Upsaliensis Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations. 164. ISBN 91 – 554 – 6623. 40 pp

Bernardy, J. 2010. Kastrace prasat jako evropské dilema. Veterinářství . 60. 372 – 374

Bilskis, R., Sutkeviciene, N., Riskeviciene, V., Januskauskas, A., Zilinskas, H. 2012. Effect of active imunization against GnRH on testosterone concentration, libido and sperm quality in mature AI boars. Biomed Central. 54(1). 33

Bonfils, C., Balny, C., Maurel, P. 1981. Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. Biomed central.

Claus, R., Dehnhard, M., Herzog, A., Bernal – Barragan, H, Gimenez ,T. 1993. Parallel measurements of indol and skatole in feces and blood plasma of pigs by HPLC. Livestock Science. 34(1-2). 115 – 126

Cook, I.T., Leyh, T.S., Kadlubar, S.A., Falany, Ch.N. 2010. Lack of substrate inhibition in a monomeric form of human cytosolic SULT2A1. Horm Mol Biol Clin Investig. 1. 357 – 366

Cook, I.T., Wang, T., Falany, Ch.N., Leyh, T. S. 2013. High Accuracy in Silico Sulfotransferase Models. Biomed central. 48. 34494 – 34501

Comer, K.A, Falany, J.L, Falany, C.N. 1993. Cloning and expression of human liver dehydroepiandrosterone sulphotransferase. *biochem.* 289. 233 – 240

Davis, S.M., Squires, E.J. 1999. Association of cytochrome b5 with 16-androstene steroid synthesis in the testis and accumulation in the fat of male pigs. *J. Animal Science.* 77. 1230 – 1235

Diaz, G.J., Squires, E.J. 2000. Metabolism of 3-methylindole by porcine liver microsomes: responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicol. Science.* 55. 284 – 292

Doran, E., Whittington, F., Wood, J., McGivan, J. 2014. Characterisation of androstenone metabolism in pig liver microsomes. 141 – 149

Dostálová, A., Koucký, M. 2008. Výkrm kanečků v podmínkách ekologického zemědělství. *Metodika.* ISBN 978-80-7403-023-9

Draper, A.J., Madan, A., Latham, J., Parkinson, A. 1997. Development of a Non-High Pressure Liquid Chromatography Assay to Determine Chlorzoxazone 6-Hydroxylase (CYP2E1) Activity in Human Liver Microsomes. *DMD.* 305 – 312

Duijvesteijn, N., Knol, E.F., Merks, J.W., Crooijmans, R.P., Groenen, M. A., Bovenhuis, H., Harlizius, B. 2010. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics.* 10.1186/1471-2156-11-42
European medicines agency. 2013. Improvac. Science medicines health. www.ema.europa.eu

Falany, C.N. 1997. Enzymology of human cytosolic sulfotransferase. *Biomed central.* 11(4): 206 - 216

Grauer, T. 2011. Výživa a management výkrmu kanečků. Svaz chovatelů prasat v Čechách a na Moravě [online]. Dostupné z: <http://www.schpcm.cz/aktuality/3vezicky/grauer.pdf>

Gregersen, V.R., Conley, L.N., Sørensen, K.K, Guldbrandtsen, B., Velandar, I.H., Bendixen, Ch. 2012. Genome-wide association scan and posed haplotype construction for quantitative trait loci affecting boar taint in three pig breeds. *Biomed central.* 1471-2164/13/22

Hansen, L. 2006. Influence of chicory roots on boar taint in entire male and female pigs. *Animal Science.* 82, 1, s. 1 – 11

Hansen-Møller, J. 1994. Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs. *Journal of Chromatography*. 661. 219–230

Haugen, J.E., Brunius, C., Zamaratskaia, G. 2012. Review of analytical methods to measure boar taint compounds in porcine adipose tissue: The need for harmonised methods. *Meat Science*. 90 (1). 9 – 19

Hodgins, D., Simmonds, D. 1995. The electronic NOSE and its application to the manufacture of food products. *Journal of Automatic Chemistry*. 17 (5). 179 – 185

Hwei-Ming Peng, Richard, J., Auchus, R.J. 2012. The Action of Cytochrome b5 on CYP2E1 and CYP2C19 Activities Requires Anionic Residues D58 and D65. *Biochemistry*, s. 210 – 220

Chowdhary, B.P. 1998. Cytogenetics and physical chromosome maps. In Rothschild, M.F., Ruvinsky, R. *The Genetic of the Pig*. CAB. International. Wallingford. UK. s. 199 – 264

INGR, I. 2003. *Produkce a zpracování masa*. MZLU, Brno. s. 202

INGR, I. 1996. *Technologie masa*. MZLU, Brno. s. 290

Jakubec, V. 2002a. Molekulární genetik a ve šlechtění II – úloha markerů ve šlechtění. *Náš chov*. č. 8. s. 39 – 41

Jakubec, V. 2002b. Molekulární genetik a ve šlechtění III – využití markerů ve šlechtění. *Náš chov*. č. 9. s. 45 – 46

Jedlička, M. 6/2012. Výkrm kanců pro lepší ziskovost v sektoru. *Náš chov*. s. 38 – 39

Jensen, M.T., Cox, R.P., Jensen, B.B. 1995. 3-methyl indole (skatole) and indole production by mixed populations of pig fecal bacteria. *Applied and Environmental microbiology*. 61(8). 3180 – 3184

Kameník, J., Kratochvíl, J. 2012. Boar taint. Department of Meat Hygiene and Technology Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. www.maso-international.cz

- Katagiri, M., Kagawa, N., Waterman, M.R. 1995. The Role of Cytochrome b5 in the Biosynthesis of Androgens by Human P450c17. *Biomed central.* s. 343 – 347
- Katagiri, M., Suhara, K., Shiroo, M., Fujimura, Y. 18982. Role of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-mediated C21-steroid 17,20-lyase reaction. *Biomed central.* s. 379 – 384
- Knapczyk – Stwora, K., Sternak, M., Durlej, M., Slomczynska, M. 2011. Immunolocalization of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase in the ovary of pregnant pigs and fetal gonads. *Biomed central.* s. 71 – 82
- Knoll, A. 1998. Detekce polymorfismu DNA ve vztahu k mapování QTL u prasat. *Dizertační práce, MZLU Brno.* 117
- Klouda, P. 2003. *Moderní analytické metody.* Ostrava. ISBN 80 – 86369 – 07 – 2
- Kocarek, T.A., Duanmu, Z., Fang, H.L., Morris, M.R. 2008. Age - and sex-dependent expression of multiple murine hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A) genes. *Biochemical Pharmacology.* s. 1036 – 1046
- Kochetov, A.V., Ischenko, I.V, Vorobiev, D.G. 1998. Eukaryotic mRNAs encoding mundant and scare proteins are statistically disimilar in many structural features. *Biomed central.* s. 351 – 355. PMID 9872401
- Koubová, D. 2013. Artyčoky nebo topinambury proti kančímu zápachu. *Agronavigátor.* č. 4. 10
- Koucký, M. 2000. Hodnocení masa kanečků a kastrátů. *Czech J. Anim. Sci.* 2000. 45. s. 539 – 544
- Kratochvíl, J. 2010. *Maso.* 4. s. 24 – 26
- Kuballe, V., Batorek, N., Škrlep, N., Prunier, A., Bonneau, M., Fazarinc, G., Čandek-Potokar, M. 2013. Steroid hormones boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter. *Theriogenology.* 79 (1).69 – 80
- Kuciel, J., Bednář, J., Urban, T. 2004. *Genetika zemědělských produktů.* Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. s. 137

Lee, G.J., Archibald, A.L., Law, A.S., Lloyd, S., Wood, J., Haley, C.S. 2005. Detection of quantitative trait loci for androstenone, skatole and boar taint in a cross between LargeWhite and Meishan pigs. *Animal Genetic*. 36. 14 – 22

Lin, Z., Lou, Y., Squires, E.J, 2005. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism in Porcine Testis Cytochrome P450-c17 (CYP17) and Its Effect on Steroidogenesis. *Biochemical Genetics*, Vol. 43, Nos. 9/10

Liu, Y., Apak, T.I, Lehmler, H.J, Robertson, L.W., Duffel, M.W. 2006. Hydroxylated polychlorinated biphenyls are substrates and inhibitor sof human hydroxysteroid sulfotransferaze SULT2A1. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1420 - 1425

Lundstrom, K., Matthews, K.R., Haugen, J.E. 2009. Pig meat quality from entire males. *Animal*. 3(11). 1497 – 1507

Marsili, R. (ed.). 2002. Flavor, fragrance and odor analysis. Marcel Dekker AG. USA. s. 425. ISBN: 0 – 8247 – 0627 – 7

Meadus, W.J., Mason, J.I., Squires, E.J. 1993. Cytochrome P450c17 from porcine and bovine adrenal catalyses the formation of 5,16-androstadien – 3-ol from pregnenolonein the presence of cytochrome b5. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46. 565 – 572

Miller, W.L., Auchus, R.J. 2010. The Molecular Biology, Biochemistry and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Biomed central*. 32(1): 81 - 151

MLC, A. 1989. Blueprint for lean and tender Meat.

Moe, M., Lien, S., Bendixen, Ch., Hedegaard, J., Hornshøj, H., Berget, I., Meuwissen, T. H., Grindflek, E. 2008. Gene expression profiles in liver of pigs with extreme high and low levels of androsterone. *Biomed central*. 10.1186/1746-6148-4-29

Moe , M., Meuwissen, T., Lien, S., Bendixen, Ch., Wang, X., Conley, L., Berget, I., Tajet, H., Grindflek, E. 2007. Gene expressian profiles in testi sof pigs with extreme high and low levels of androstenone, [www. biomed central.com. /47/- 2164/8/405](http://www.biomedcentral.com/47/-2164/8/405)

Moe, M., Grindflek, E., Doran, O. 2007. Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450-c17, and sulfotransferase 2B1 proteins in liver and testis of pigs of two breeds: Relationship with adipose tissue androstenone concentration. *Journal of animal science*. 85. 2924-2931

Morris, M.R., Kocarek, T.A. Falany, Ch.N. 2013. Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors. *Drug Metab Rev*. 45. 1: 10.3109/03602532.2012.748794

Motrensen, A.B., Bejerholm, C., Pedersen, J.K. 1986. *Proc. 32th EAAP*. Ghett. 23 – 26

Munro, A.W., Girvan, H.M., McLean, K.J. 2007. Variations on a heme – mechanism, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily

O'Brien, S.J. 1991. *Mammalian genome mapping: Current Opinion in Genetics and Development*. s. 105 – 111. ISBN 0959 – 437X

Onoda, M., Hall, P.F. 1982. Cytochrome b5 stimulates purified testicular microsomal cytochrome P-450 (C21 side-chain cleavage). *Biomed central*. s. 454 – 460

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5. 874 – 879

Patterson, R.L.S, Elks, P.K., Love, D.B., Kempster, A.J. 1990. *Anim. Prod*. 50. 551

Payne, A.H, Hales, D.B. 2004. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews*. 6. 947 – 970

PIPEK, P. 1995. *Technologie masa I. VŠCHT, Praha*. s. 334

Qverland, M., Kjos, N.K, Fauske, A.K., Teige, J., Sørum, H. 2011. Easily fermentable carbohydrates reduce butyrate formation in the distal intestine of entire male pigs. *Livestock Science*. 140 (3). 206 – 217

Quintanilla, R., Demeure, O., Bidanel, J.P., Milan, D., Iannuccelli, N., Amigues, Y., Gruand, J., Renard, C., Chevalet, C., Bonneau, M. 2003. Detection of quantitative trait loci for fat androstenone levels in pigs. *J. Animal Science*. 81. s. 385 – 394

- Rasmussen, M.K., Ekstrand, B., Zamaratskaia, G. 2013. Regulation of 3β – hydroxysteroid dehydrogenase Isomerase. *Biomed central*. 9. 17926 – 17942. PMID 3794760
- Richard, K., Hume, R., Kaptein, E., Stanley, E.M., Visser, T.J., Coughtrie, M.W.H. 2001. Sulfation of Thyroid Hormone and Dopamine during Human Development: Ontogeny of Phenol Sulfotransferases and Arylsulfatase in Liver, Lung, and Brain. *Endocrine Society*. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.6.7569>
- Robic, A., Larzul, L., Bonneau, M. 2008. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue. A review (Open Access publication, *Genet. Sel. Evol.* 40. 129 – 143
- Rohrer, G.A., Alexander, L.J., Hu, Z., Smith, T.P., Keele, J.W., Beattie, C.W. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research*. 6. 371 – 391
- Saini, S. P., J. Sonoda, L. Xu, D. Toma, H. Uppal, Y. Mu, S. Ren, D. D. Moore, R. M. Evans, and W. Xie. 2004. A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol. Pharmacol.* 65:292-300.
- Salguero, F., Gonzales, F.J. 1995. The CYP2A gene subfamily: species differences, regulation, catalytic activities and role in chemici carcinogenesis. *Biomed central*
- Samuels, L.T., Helmreich, M.L., Lasater, M.B., Reich, H. 1951. An enzyme in endocrine tissues which oxidizes 3- hydroxy steroids to α,β unsaturated ketones. *Science*. s. 490 – 491
- Sheffield, V.C., Beck, J. S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 16. 325 – 332
- Schenkman, J.B., Jansson, I. 2003. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* 97. 139 – 152
- Sinclair, P.A., Gilmore, W.J., Lin, Z., Lou, Y., Squires, E.J. 2006. Molecular cloning and regulativ of porcine SULT2AI: relationship between SULT2AI expression and sulfoconjugation of androsterone. s. 301 – 311. 0952 – 5041/06/036

Skinner, T.M, Doran, E., McGivan, J.D, Haley, C.S, Archibald, A.L. 2005. Cloning and mapping of the porcine cytochrome – P450 2E1 gene and its association with batole levels in the domestic pig. *Animal Genetic*. 36. s. 417 – 422

Soller, M., Andersson, L. 1998. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. *Revue scientifique et technique*. 17. 329 - 345

Stupka, R. 2003. Současné problémy v zajištění kvality vepřového masa. Jihočeská universita v Českých Budějovicích. Doplňkový materiál k přednáškám předmětu Chov prasat. (cit. 2011 – 04 – 05)

Šprysl, M., Čítek, J., Stupka, R. 2009. Problematika kvality masa a kančího pachu. Praha, powerpoint s.r.o. s. 165 – 173. ISBN 978 – 80 – 213 – 1974 – 5

Tambyrajah, W.S., Doran, E., Wood, J.D., McGivan, J.D. 2004. The pig CYP 2E1 promoter is activated by COUP – TF1 and HNF – 1 and is inhibited by androstenone. *Arch. Biochem. Biophys*. 431. s. 252 – 260

Terner, M.A., Gimore, W.J., Lou, Y., Squires, E.J. 2006. The role of CYP2A and CYP2E1 in the metabolism of 3- methylindole in primary cultured porcine hepatocytes. *Biomed central*. 5. 848 – 54

Urban, T. 2008. QTL MAS – mapování QTL. *Genetika populací a kvantitativních znaků*

Velišek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin II*. 3. vydání OSS/S. Tábor s. 644. ISBN: 978 – 80 – 86659 – 16 – 9

Wood, D.J., Wiseman J., Cole, D.J.A. 1994. *Principles of Pig Sci.*, Nottingham univ. Press, 433 – 456

Yerle, M. 1996. A static cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*. 73: 194 - 202

Zamaratskaia, G., Oskam, I.C., Ropstad, E., Tajet, H., Dahl, E., Andresen, O. 2008. Effect of hCG stimulation on hepatic activities of cytochromes P450 2E1 and P450 2A in pubertal male pigs. *Biomed central*. 43 (2). s. 147 – 52

Zamaratskaia, G., Squires, E.J. 2009. Biochemical, nutritional and genetic effect on taint in entire male pigs. *Animal* . 3(11). 1508 - 1521

9. Seznam obrázků

- Obr. 1- Androstenon
- Obr. 2 – Skatol
- Obr. 3 – Indol
- Obr. 4 – Působení improvacu
- Obr. 5 – Roštové ustájení prasat
- Obr. 6 – CYB5A
- Obr. 7 – Struktura DHEA
- Obr. 8 – Struktura raloxifenu
- Obr. 9 – Elektroforéza: CYP17A1 - restrikce

10. Seznam tabulek

- Tab. 1 – Vliv pohlaví na kvalitu masa
- Tab. 2 – Optimalizace primerů
- Tab. 3 – Frekvence zkoumaného genotypu u kříženců
- Tab. 4 – Frekvence zkoumaného genotypu u čistých jedinců
- Tab. 5 – Hladina androstenonu a skatolu u prasniček
- Tab. 6 – Hladina androstenonu a skatolu u vepříků
- Tab. 7 – Hladina androsteronu a skatolu u imunokastrátů
- Tab. 8 – Hladina androstenonu a skatolu u kanečků
- Tab. 9 – Vliv pohlaví na hladinu androstenonu v tukové tkáni prasat
- Tab. 10 – Vliv pohlaví na hladinu skatolu v tukové tkáni prasat

11. Seznam zkratek

- A/A – Recesivní homozygot
A/T – Heterozygot
T/T – Dominantní homozygot
CYB5A – Cytochrom b5, typ A
CYP17A1 - Cytochrom P450, rodiny 17, podčeleď A, polypeptid 1
CYP2A6 – Cytochrom P450, rodiny 2, podčeleď A, polypeptid 6
CYP2E1 – Cytochrom P450, rodiny 2, podčeleď E, polypeptid 1
DHEA – Dehydroepiandrosteron
EU – Evropská unie
FISH – Fluorescenční in situ hybridizace
GC – Gas Chromatography - mobilní fázi je plyn
GnRF – Gonadotropin uvolňující hormon
GnRH – Gonadotropní hormon
HSD3B1 – Hydroxy - steroid dehydrogenáza, 3beta steroid – izomerázy 1
LC – Liquid Chromatography – mobilní fázi je kapalina
LH – Luteinizační hormon
NADP - Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NM - Nanometr
OHPREG – Hydroxypregnenolon
PCR – Polymerázová řetězová reakce
PCR – SSCP – Polymerázová řetězová reakce jednořetězcové konformace polymorfismu
Plemeno LW – Large white
QTL – Lokus pro kvantitativní znak
SULT2A1 – sulfotransferáza, rodiny 2, podčeleď A, polypeptid 1
5' UTR – Nepřekládaná oblast