

Varijacije koncentracije hormona 17 beta - estradiola i testosterona u teladi različitog spola i pasmine

Gulić, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:511409>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Ines Gulić

VARIJACIJE KONCENTRACIJE HORMONA 17β -ESTRADIOLA I TESTOSTERONA U
TELADI RAZLIČITOG SPOLA I PASMINE

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Rad je izrađen na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u suradnji s Hrvatskim veterinarskim institutom u Zagrebu.

Predstojnik klinike: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori : prof. dr. sc. Marko Samardžija

izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić
2. prof. dr. sc. Marko Samardžija
3. izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin
4. doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

ZAHVALA

Hvala mojim mentorima, prof. dr. sc. Marku Samardžiji i izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin na srdačnosti, strpljenju, savjetima, potrebnoj literaturi i pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Draženu Đuričiću, te dr. sc. Nini Kudumija, na velikoj i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Nadalje, zahvaljujem i doc. dr. sc. Miroslavu Beniću na brznoj i stručnoj statističkoj obradi podataka.

Veliko hvala mojim kolegicama i prijateljicama: Barbari Jagec, Luciji Hlebić, Luciji Jurišić te Ivi Kilvain što su mi uvijek uskočile i bile dio mog studentskog života.

Također, posebno hvala i mojim najvažnijim curama, Mariji i Luciji, što su me oslobodile svih obaveza te mi davale punu podršku i mir kad sam se morala pripremati za ispite.

I na kraju, najveće hvala dugujem svojoj mami, najhrabrijoj i najsnažnijoj ženi, koja je uvijek tu za mene.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE.....	4
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Princip određivanja razine 17 β -estradiola	8
3.2. Princip određivanja razine testosterona	11
3.3. Statistička analiza rezultata	15
4. REZULTATI	16
4.1. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola u plazmi teladi.....	19
4.1. 1. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola obzirom na spol.....	19
4.1. 2. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola obzirom na farmu.....	19
4.1. 3. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola obzirom na pasminu.....	20
4.1.4. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola obzirom na dob.....	21
4.2. Varijacije u koncentracijama testosterona u plazmi teladi	22
4. 2. 1. Varijacije u koncentracijama testosterona obzirom na spol	22
4. 2. 2. Varijacije u koncentracijama testosterona obzirom na farmu.....	22
4. 2. 3. Varijacije u koncentracijama obzirom na pasminu	23
4. 2. 4. Varijacije u koncentracijama obzirom na dob.....	24
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	28
7. SAŽETAK	29

8. SUMMARY	30
9. LITERATURA	31
10. ŽIVOTOPIS	34

1. UVOD

Današnje vrijeme postavlja izrazito zahtjevne uvjete u proizvodnji namirnica animalnog podrijetla. Istovremeno, proizvod mora biti vrhunske kakvoće, prepoznatljiv, ekonomski isplativ, higijenski i zdravstveno ispravan te proizveden u što kraćem vremenu. S obzirom na sve navedeno, nije neuobičajeno što se u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji poseže za korištenjem različitih stimulatora apetita, dodataka prehrani, vitaminima ili mineralima, različitim lijekovima za prevenciju i suzbijanje bolesti, ali i tvarima koje posjeduju anabolički učinak. Tvari koje djeluju anabolički na organizam su: stilbeni te njegovi derivati, antitireoidne tvari, prirodni i sintetski steroidni hormoni, laktoni rezorcilne kiseline te beta agonisti (HEITZMAN, 1993.). Ove tvari imaju sposobnost većeg zadržavanja dušika u organizmu pa zbog toga povećavaju sintezu proteina i istovremeno razgrađuju masti, a bez obzira na mehanizam djelovanja njihov krajnji rezultat je brži i veći rast uzgajanih životinja, smanjena količina masnog tkiva u organizmu, poboljšana konverzija i iskoristivost hrane te bolja organoleptička svojstva mesa.

Napretkom tehnologije, danas je moguće sintetizirati sintetički estradiol dietilstilbestrol (DES), ali i ostale preparate koji imaju gotovo istu strukturu te jednak biološki učinak u organizmu kao i prirodni estrogen ili testosteron. Primjena DES-a započela je 50-tih godina prošloga stoljeća na području Sjedinjenih američkih država te Ujedinjenog kraljevstva, u obliku implantanta ili kao dodatak prehrani za telad. Dnevni prirast teladi bio je veći za 10-15 % u odnosu na telad koja nije dobivala DES, čime se ostvario značajno veći prinos u proizvodnji mesa. Tablica 1 prikazuje najčešće korištene tvari sa anaboličkim učinkom tijekom prošlog stoljeća.

Godine 1973. dolazi do buđenja svijesti ljudi oko uporabe hormona u prehrani te se postavljaju pitanja o štetnosti konzumiranja namirnica animalnog podrijetla proizvedenim od životinja koje su tijekom toga bile izložene ovim tvarima. Nekoliko istraživanja je potvrdilo da DES može izazvati brojne toksične učinke u ljudi i životinja. Toksikološka istraživanja uz oralnu i parenteralnu primjenu 17β -estradiola, u ovisnosti i trajnju izloženosti, ukazala su na povećanu pojavljivost tumora u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, dojka), dok je kronična izloženost životinja anaboličkoj dozi izazvala mutagene i karcinogene promjene (ZIMMERMAN, 1998.).

Tablica 1. Najčešće korištene hormonalno aktivne supstance u farmских životinja
(<http://www.fao.org/docrep/004/x6533e/x6533e01.htm>)

SUPSTANCA	DOZA	OBLIK	ŽIVOTINJSKA VRSTA
ESTROGENI			
DES	10-20 mg/dan	dodatak prehrani	volovi, junice
DES	30-60 mg/dan	implatant	volovi
DES		Ulje	telad
Heksoestrol	12-60 mg	implatant	volovi, krave, ovce, perad
Zeranol	12-36 mg	implatant	volovi, ovce
GESTAGENI			
Melengestrol acetat	0,25-0,50 mg/dan		junice
ANDROGENI			
TBA	300 mg	implatant	junice, krave
KOMBINIRANI PREPARATI			
DES + testosteron	25 mg + 120 mg	implatant	krave
DES + metil-testosteron		dodatak prehrani	svinje
Heksoestrol+ TBA	30-45 mg + 300 mg	implatant	volovi
Zeranol+TBA	36 mg + 300 mg	implatant	volovi
Estradiol 17 β + TBA	20 mg + 140 mg	implatant	bikovi, volovi, krave, ovce
Estradiol 17 β benzoat + testosteron proprionat	20 mg + 200 mg	implatant	junice, krave
Estradiol 17 β benzoat + progesteron	20 mg + 200 mg	implatant	volovi

DES je zabranjen za uporabu u veterinarskoj medicini već nekoliko desetljeća zbog dokazanog kancerogenog djelovanja (SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

Zbog mogućeg štetnog djelovanja od 1989. godine je u Europskoj uniji zabranjeno korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak u cilju njihovog anaboličkog djelovanja u farmских životinja, a uporaba 17β -estradiola u terapijske svrhe je ograničena na slučajeve poremećaja u reprodukciji, odnosno tijekom graviditeta (Direktiva 1996/22/EC; Direktiva 2003/74/EC). U Republici Hrvatskoj uporaba anabolika je također zabranjena, a važeća je Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmским životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista (NN 82/210) te Pravilnik o farmakološkim djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (NN 21/2011) (PLEADIN i sur., 2013.).

S obzirom da su steroidni hormoni dio endokrinog sustava i ovise o mnogim procesima unutar organizma, varijacija u fiziološkim koncentracijama je moguća te stoga svako povišenje razine spolnih hormona ne može se odmah smatrati ilegalnom anaboličkom uporabom u svrhu promotora rasta, već se treba sagledati cijeli niz podataka o životinji, njezinoj dobi i spolu, spolnoj zrelosti i ciklusu, načinu držanja i uvjetima uzgoja te mogućim bolestima. Također, od velikog značaja su podatci o okolišnim čimbenicima, stresu te načinu prehrane životinja kojima prosuđujemo razinu hormona u krvi.

2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE

Važnost estrogena i njegovih učinaka otkrivena je početkom prve polovice prošloga stoljeća. Odgovorni su za rast i razvoj ženskih spolnih organa, sazrijevanje ženskih spolnih stanica, te utječu na sekundarne spolne karakteristike. Djeluju zajedno s progesteronom tijekom graviditeta, a osim toga povoljno djeluju i na gustoću kostiju (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). Estrogeni su skupina prirodnih steroidnih hormona u koju ubrajamo 17β -estradiol, estron, estriol i epistriol, a izlučuju ih jajnici u kojima se odvija i sama sinteza tih hormona. Moguće je izolirati ove hormone i iz placente, testisa te adrenalnih žlijezda. Najzastupljeniji hormon iz ove skupine je 17β -estradiol. Njegova molekularna masa iznosi 272.3 Da (MEŠTRIĆ i sur., 2018.). Svi navedeni hormoni nastaju iz kolesterola i acetata, a tijekom djelovanja se metaboliziraju jedni u druge (DROBNJAK i GRIZELJ, 1974.). Hipotalamus i hipofiza preko gonadotropno-stimulirajućeg hormona (GnRH), folikulo-stimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) reguliraju izlučivanje estrogena.

Primjena 17β -estradiola u terapijske svrhe istražuje se dugi niz godina, o čemu su objavljeni brojni znanstveni radovi. Utjecaj ovog hormona na fiziološke procese u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu, a ukoliko se primjenjuje na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi ostatci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača. (PLEADIN i sur., 2013.).

17β -estradiol se najčešće upotrebljava u terapijske svrhe u kombinaciji s progesteronom, a njegovo korištenje je dopušteno samo u mesnih pasmina krava i junica čije mlijeko se ne koristi za konzumaciju u ljudi te za junice mliječnih pasmina. Uloga aplikacije 17β -estradiola je dvojaka: antiluteotropna i blago luteolitička, jer skraćuje životni vijek žutog tijela, a druga uloga je da utječe na folikularnu dinamiku, jer inducira supresiju dominantnog folikula i pojavu novog dominantnog vala. Postupak je učinkovit bez obzira na fazu razvoja dominantnog folikula (u rastu, dominaciji ili regresiji) (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

Propisane razine 17β -estradiola za poduzimanje mjera zbog sumnje na zlouporabu definirane su Direktivom Vijeća 1996/22/EC i odnose se na plazmu goveda, a podijeljene su po dobi i spolu životinja. Kako bi se isključila mogućnost dobivanja velikog broja lažno pozitivnih rezultata,

granica pri kojoj se poduzimaju mjere za 17β -estradiol u plazmi, za oba spola i sve dobne skupine goveda, postavljena je na nešto veću razinu u odnosu na prosječne fiziološke razine i to do najviše 40 ng/L za negravidna i 4000 ng/L za gravidna goveda (HEITZMANN, 1994.). Smatra se da koncentracije ovog hormona u plazmi goveda veće od navedenih upućuju na zlouporabu anaboličke svrhe (PLEADIN i sur., 2013.).

Androgeni su skupina muških hormona u koje ubrajamo testosteron, 5-alfa dihidrotestosteron (5α -DHT), dehidroepiandosteron (DHEA) i androstendion. Uglavnom se sintetiziraju u testisu, ali DHEA i androstendion se mogu izlučivati i iz nadbubrežnih žlijezda te jajnika. Androgeni su vrlo važni za održavanje jakih mišića i kostiju te pridonose libidu, kontroliraju približno polovicu bjelančevina koju sintetiziraju epididimisi s pozitivnim ili negativnim učinkom. Preostalih 43 % bjelančevina modulirane su lokalnim čimbenicima, a svega 6 % bjelančevina nije pod sustavnom, a ni pod lokalnom kontrolom (ŽURA ŽAJA i sur. 2019.).

Muški spolni hormoni imaju anaboličko djelovanje, odnosno pojačavaju različite oksidacijske procese, stimuliraju unutarstaničnu proizvodnju bjelančevina, osobito u mišićima te dovode do zadržavanja dušičnih spojeva u organizmu.

Najvažniji androgeni hormon je testosteron, neophodan za razvoj sekundarnih spolnih oznaka, i održavanje normalnog spolnog nagona. Ujedno, testosteron je i potreban za funkciju akcesornih spolnih žlijezdi, produkciju spermija i održavanje muškog provodnog sustava, a ujedno osigurava optimalne uvjete za stvaranje spermija, transport spermija te polaganja sjemena u ženske spolne stanice (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.).

Regulacija izlučivanja je pod kontrolom hipotalamusnog hormona GnRH (gonadotropnog otpuštajućeg hormona), koji potiče adenohipofizu da izlučuje LH i FSH hormone kada je razina testosterona ispod fiziološke razine. Ovi hormoni djeluju specifično na ciljana tkiva u testisima, i aktiviraju sustav drugog glasnika cAMP-a, koji zatim pokreće enzimsku kaskadu i aktivira se izlučivanje testosterona. Testosteron je dobro topljiv u lipidima te nakon sinteze u Leydigovim stanicama vrlo jednostavno difundira kroz staničnu membranu, ulazi u međustaničnu tekućinu te zatim u krv (GUYTON i HALL, 2017.). U krvi se može naći svega 2 % slobodnog testosterona, a ostali je vezan za albumine i globuline – tzv. SHBG (engl. *sex hormone binding globuline*).

Svoju fiziološku ulogu ostvaraju tako što utječu na razvoj primarnih i sekundarnih spolnih karakteristika mužjaka, ali djeluju i na intermedijarni metabolizam (BOŽIĆ, 2012.).

U terapijske svrhe u farmских životinja, rijetko je inducirana uporaba testosterona. No, potreba za istim može se javiti kod mišićne atrofije, slabog apetita, nedostatka natjecateljskog duha u kastriranih konja, za rast dlake ili grive u izložbenih životinja te kod deficijencije testosterona u kastrata. Poznata je uporaba i u kobilama koje se prečesto tjeraju (SAMARDŽIJA i sur., 2015.).

Testosteron se obično koristio u stočarskoj proizvodnji u kombinaciji sa 17β -estradiolom obliku ušnog implatanta, kako bi se povećao rast životinja i iskoristivnost hrane (PLEADIN i sur., 2013.).

Prema literaturnim podacima može se uvidjeti da je razina testosterona značajno ovisna o dobi životinje i kreće se u muške i ženske junadi do 0-1 ng/mL, a u bikova do 20 ng/L (SAMARDŽIJA i sur., 2018.). Ukoliko su razine više od navedenih, takve razine upućuju na zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe (HOFFMAN i EVERS, 1986.).

Postoje varijacije fizioloških koncentracija spolnih hormona obzirom na vrstu životinje, dob, spol, i kategoriju namjene. Koncentracija tih hormona ovisna je i o načinu uzgoja, držanja, spolnoj zrelosti životinje, prisutnosti drugih životinja, metaboličkim poremećajima, prisutnosti hormona u hrani (fitoestrogeni). U tablici 2 prikazane su poznate koncentracije pojedinih hormona u tkivima farmских životinja.

Tijekom stresnog odgovora inhibira se normalno odvijanje spolnog ciklusa jer visoka koncentracija kortizola suprimira izlučivanje GnRH pa su koncentracije FSH i LH niske (TURK i sur., 2017.). Takva saznanja također je važno uzeti u obzir prilikom prosudbe o anaboličkoj uporabi određene tvari. Poznato je i da visoka temperatura okoliša djeluje kao stresor na krave te posljedično tome dolazi do kraćeg trajanja estrusa, folikuli su manji, a koncentracije estrogena i progesterona su niže od fizioloških (WOLFENSON i sur., 2000.).

Tablica 2. Koncentracije hormona u jestivim tkivima životinja koje se uzgajaju na farmama (SAMARDŽIJA i sur., 2015.)

ŽIVOTINJA	TKIVO	ESTRON (pg/mL)	17 β -ESTRADIOL (pg/mL)	TESTOSTERON (pg/mL)	PROGESTERON (pg/g)
TELE	MIŠIĆ		< 100	70	
	JETRA		< 100	47	
	BUBREG		< 100	685	
	MAST		< 100	340	6
BIK	MIŠIĆ			335	
	JETRA			749	
	BUBREG			2783	
	MAST			10950	
JUNICA	MIŠIĆ		12-13	92	
	JETRA	20 – 40	38-71	193	16
	BUBREG		40-71	595	
	MAST		6	250	
GRAVIDNA KRAVA	MIŠIĆ		370-860		336
	MAST	3870	2500-5500		
VOL	MIŠIĆ	6	14		
	JETRA	20	14		
	MAST	23	14		

Egzogena primjena prirodnih spolnih hormona u domaćih životinja ima stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva. Zbog brojnih toksičnih učinaka u potrošača prouzročenih konzumacijom kontaminiranih proizvoda te moguće zlouporabe u anaboličke svrhe, nameće se potreba za provođenjem sustavnog nadzora i kontrole ovih tvari u hrani životinjskog podrijetla, putem određivanja njihovih rezidua u biološkom materijalu životinja tijekom tova i na klaonici te u krajnjim proizvodima, odnosno hrani životinjskog podrijetla (PLEADIN i sur., 2009., PLEADIN i sur., 2011.a).

Stoga je cilj ovog rada bio nasumično izabrati telad različitih pasmina, različitog spola i dobi i podrijetlom s različitih farmi te ustvrditi prosječnu koncentraciju 17 β -estradiola i testosterona u krvi. Dobiveni podatci mogu poslužiti budućoj usporedbi tih koncentracija s vrijednostima određenim na drugim farmama u cilju kontrole potencijalne zlouporabe ovih hormona kao anaboličkih sredstava.

3. MATERIJALI I METODE

U 2019. godini s 3 različite farme na području Republike Hrvatske nasumično je izabrano 32 teladi različitog spola (5 muških i 27 ženskih), dobi 2-5 mjeseca starosti, različitih pasmina i kategorija (13 teladi simentalke pasmine, 2 teladi mesne pasmine i 17 teladi holstein-friesian pasmine), u svrhu ispitivanja koncentracije 17β -estradiola i testosterona.

Prilikom općeg kliničkog pregleda nadležnog veterinara, nisu primjećeni nikakvi znaci bolesti ili stanja koje bi mogle utjecati na razine ovih hormona te je shodno tome izvađena krv i dostavljena na Hrvatski veterinarski institut, Odjel za javno zdravstvo, Laboratorij za analitičku kemiju, Zagreb, Hrvatska, koji je ujedno i Nacionalni referentni laboratorij za određivanje rezidua tvari s anaboličkim učinkom.

3.1. Princip metode određivanja razine 17β -estradiola

Princip metode temelji se na reakciji antigen-antitijelo. Jažice u mikrotitracijskoj ploči obložne su ovčjim protutijelima protiv 17β -estradiol protutijela. U te jažice, dodaju se standardi ili uzorci, 17β -estradiol enzimski konjugat i anti- 17β -estradiol protutijela. Slobodni i enzimom konjugirani 17β -estradiol natječu se za protutijelo vežuća mjesta (kompetitivna ELISA). U isto vrijeme, anti- 17β -estradiol protutijela se također vežu imobiliziranim protutijelima. Nevezani enzimatski konjugat se zatim uklanja ispiranjem. Enzimatski supstrat i kromogen se potom dodaju u jažice te slijedi inkubacija. Vezani enzimatski konjugat pretvara bezbojni kromohen u plavi produkt. Kada se doda tzv. STOP otopina, boja se mijenja iz plave u žutu te se nakon toga provodi fotometrijsko mjerenje na 450 nm. Očitana apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji 17β -estradiolu u uzorku.

Materijal potreban za određivanje razine 17β -estradiola

Korištena je sljedeća oprema:

- Kemijski analizator ChemWell 2910, Awarness Technology inc., SAD
- Tresilica, IKA HS 269 Control

- Hladnjak/ledenica, LTH, Škofja Loka
- Vodena kupelj, Thermo Haake
- Analitička vaga, s preciznošću odvage od 0,00001 g
- Analitička vaga, s preciznošću odvage od 0,01 g
- Uređaj za uparavanje u struji dušika
- Jednokanalna mikropipeta, 10-100 μL i 100-1000 μL
- Multikanalna mikropipeta, 10-100 μL i 30-300 μL
- Računalo s printerom
- Kit, Ridascreen, 17 β -estradiol koji sadrži sljedeće komponente :
 - Mikrotitracijska ploča s 96 jažica obloženih protutijelima
 - 6 bočica od 1,3 mL, spremnih za uporabu, koje sadrže otopinu standarda 17 β -estradiola koncentracije : 0 ppt, 50 ppt, 800 ppt, 3200 ppt, 12800 ppt
 - 1 bočica (0,7 mL) s koncentratom konjugata (11 x koncentrirani)
 - 1 bočica (0,7 mL) s koncentratom anti-17 β -estradiola protutijela (11 x koncentrirani)
 - 1 bočica (50 mL) pufera za razrjeđivanje konjugata/protutijela/uzoraka
 - 1 bočica (7 mL) sa supstratom (spremno za uporabu)
 - 1 bočica (7 mL) s kromogenom (spremno za uporabu)
 - 1 bočica (14 mL) stop otopine (sadrži 1 NH_2SO_4)
- Reagensi : tert. butilmetileter, p.a. i petrol eter

Priprema reagensa

Otopina 17 β -estradiol enzimatskog konjugata: Budući da otopina razrjeđenog enzimatskog konjugata ima ograničenu stabilnost, potrebno je prirediti samo potrebnu količinu otopine. Prije pipetiranja, koncentrat konjugata je potrebno pažljivo protresti. Konjugat se razrjeđuje s puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:11 (1+10), npr. 200 μL koncentriranog konjugata i 2 mL pufera.

Otopina anti-17 β -estradiol protutijela: Budući da otopina razrjeđenog protutijela ima ograničenu stabilnost, potrebno je prirediti samo potrebnu količinu otopine. Prije pipetiranja, koncentrat protutijela je potrebno pažljivo protresti. Protutijelo se razrjeđuje s puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:11 (1+10), npr. 200 μL koncentriranog protutijela i 2 mL pufera.

Provedba metode

Priprema uzoraka plazme

1 mL plazme se ekstrahira s 5 mL eterne mješavine (npr. butilmetileter/petrol eter (30:70, v/v)), pažljivo mješajući 20 minuta u staklenoj epruveti. Zatim se ekstrahirana otopina zamrzava 60 minuta na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i slijedi dekantiranje nadtaloga u staklenu epruvetu. Dekantirani nadtalog je potrebno upariti u struji dušika ili vodenoj kupelji na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezidue se otope u 400 μL pufera za razrjeđivanje i pažljivo se pomiješa. Za analizu se koristi 20 μL razrijeđenog uzorka po jažici.

ELISA test procedura

1. Pripremi se mikrotitracijska ploča. Potrebne kemikalije se temperiraju na sobnu temperaturu. U pliticu se doda dovoljan broj jažica. Pažljivo se odredi raspored standarda i uzoraka na plitici.
2. Na dno jažica pomoću mikropipete doda se i to sljedećim redoslijedom: 20 μL standarda (ukupno 6 standarda) i 20 μL uzoraka u duplikatima.
3. Doda se 50 μL razrijeđenog enzimskog konjugata u sve jažice.
4. Doda se 50 μL razrijeđene otopine antitijela u sve jažice
5. Ploča se lagano miješa 1 minutu, a zatim inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi.
6. Cjelokupan sadržaj tekućine izbacuje se iz jažica i lupkanjem o sloj papira, potpuno se izbacuje preostala tekućina (3 puta). U sve jažice se doda 250 μL destilirane vode i ponovo se izbacuje tekućina i tako još 2 puta. Potrebno je ukloniti svu tekućinu iz jažica. Ovaj korak provodi se pomoću uređaja ili ručno multikanalnom pipetom.
7. Doda se 50 μL supstrata i 50 μL kromogena u svaku jažicu lagano protrese i inkubira kroz 130 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.
8. Nakon 30 min. zaustavlja se reakcija dodatkom 100 μL stop otopine u svaku jažicu i dobro promiješa. Zatim vršimo mjerenje apsorbancije na ELISA procesoru na valnoj duljini od 450 nm (do 30 min.).

Izračunavanje koncentracije analita

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije 17β -estradiola u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0 ng/mL) i množe se sa 100 te se dobiju %-tci apsorbancije B / B_0 . Prema tome nulti standard je jednak 100 %.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \times 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

Koncentracija 17β -estradiola u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje kojoj su na ordinatu nanesene vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije testosterona, a na apscisu koncentracije testosterona (0-12800 ng/kg). Dobivene koncentracije 17β -estradiola u uzorcima plazme pomnože s faktorom 0,2.

3.2. Princip metode određivanja razine testosterona

Princip metode temelji se na reakciji antigen-antitijelo. Jažice u mikrotitracijskoj ploči obložne su ovčjim protutijelima protiv anti-testosteron protutijela. U te jažice, dodaju se standardi ili uzorci, testosteron enzimski konjugat i anti-testosteron protutijela. Slobodni i enzimom konjugirani testosteron natječu se za protutijelo vežuća mjesta (kompetitivna ELISA). U isto vrijeme, anti-testosteron protutijela se također vežu imobiliziranim protutijelima. Nevezani enzimatski konjugat se zatim uklanja ispiranjem. Enzimatski supstrat i kromogen se potom dodaju u jažice te slijedi inkubacija. Vezani enzimatski konjugat pretvara bezbojni kromogen u plavi produkt. Kada se doda tzv. STOP otopina, boja se mijenja iz plave u žutu te se nakon toga provodi fotometrijsko mjerenje na 450 nm. Očitana apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji testosterona u uzorku.

Materijal potreban za određivanje razine testosterona

Korištena je sljedeća oprema :

- Kemijski analizator ChemWell 2910, Awarness Technology inc., SAD
- Tresilica, IKA HS 269 Control
- Hladnjak/ledenica, LTH, Škofja Loka
- Vodena kupelj, Thermo Haake
- Analitička vaga, s preciznošću odvage od 0,00001 g
- Analitička vaga, s preciznošću odvage od 0,01 g
- Uređaj za uparavanje u struji dušika
- Jednokanalna mikropipeta, 10-100 μL i 100-1000 μL
- Multikanalna mikropipeta, 10-100 μL i 30-300 μL
- Računalo s printerom
- Kit, Ridascreen, testosteron koji sadrži sljedeće komponente :
 - Mikrotitracijska ploča s 96 jažica obloženih protutijelima
 - 6 bočica od 1,3 mL, spremnih za upotrebu, koje sadrže otopinu standarda 17 β -estradiola koncentracije : 0 ppt, 50 ppt, 800 ppt, 3200 ppt, 12800 ppt
 - 1 bočica (0,7 mL) s koncentratom konjugata (11 x koncentrirani)
 - 1 bočica (0,7 mL) s koncentratom anti-testosteron protutijela (11 x koncentrirani)
 - 1 bočica (50 mL) pufera za razrjeđivanje konjugata/protutijela/uzoraka
 - 1 bočica (7 mL) sa supstratom (spremno za uporabu)
 - 1 bočica (7 mL) s kromogenom (spremno za uporabu)
 - 1 bočica (14 mL) stop otopine (sadrži 1 NH_2SO_4)
- Reagensi : tert. butilmetileter, p.a. i petrol eter

Priprema reagensa

Otopina testosteron enzimatskog konjugata: Budući da otopina razrijeđenog enzimatskog konjugata ima ograničenu stabilnost, potrebno je prirediti samo potrebnu količinu otopine. Prije pipetiranja, koncentrat konjugata je potrebno pažljivo protresti. Konjugat se razrjeđuje s puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:11 (1+10), npr. 200 μ L koncentriranog konjugata i 2 mL pufera.

Otopina anti-testosteron protutijela: Budući da otopina razrijeđenog protutijela ima ograničenu stabilnost, potrebno je prirediti samo potrebnu količinu otopine. Prije pipetiranja, koncentrat protutijela je potrebno pažljivo protresti. Protutijelo se razrjeđuje s puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:11 (1+10), npr. 200 μ L koncentriranog protutijela i 2 mL pufera.

Provedba metode

Priprema uzoraka plazme

1 mL plazme se ekstrahira s 5 mL eterne mješavine (npr. butilmetileter/petrol eter (30:70, v/v)), pažljivo mješajući 20 minuta u staklenoj epruveti. Zatim se ekstrahirana otopina zamrzava 60 minuta na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i slijedi dekantiranje nadtaloga u staklenu epruvetu. Dekantirani nadtalog je potrebno upariti u struji dušika ili vodenoj kupelji na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezidue se otope u 400 μ L pufera za razrjeđivanje i pažljivo pomiješaju. Za analizu se koristi 20 μ L razrijeđenog uzorka po jažici.

ELISA test procedura

1. Pripremi se mikrotitracijska ploča. Potrebne kemikalije se temperiraju na sobnu temperaturu. U pliticu se doda dovoljan broj jažica. Pažljivo se odredi raspored standarda i uzoraka na plitici.
2. Na dno jažica pomoću mikropipete doda se i to sljedećim redoslijedom: 20 μ L standarda (ukupno 6 standarda) i 20 μ L uzoraka u duplikatima.
3. Doda se 50 μ L razrijeđenog enzimskog konjugata u sve jažice.
4. Doda se 50 μ L razrijeđene otopine antitijela u sve jažice
5. Ploča se lagano miješa 1 minutu, a zatim inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi.
6. Cjelokupan sadržaj tekućine izbacuje se iz jažica i lupkanjem o sloj papira, potpuno se

izbaci preostala tekućina (3 puta). U sve jažice se doda 250 µL destilirane vode i ponovo se izbaci tekućina i tako još 2 puta. Potrebno je ukloniti svu tekućinu iz jažica. Ovaj korak provodi se pomoću uređaja ili ručno multikanalnom pipetom.

7. Doda se 50 µL substrata i 50 µL kromogena u svaku jažicu lagano protrese i inkubira kroz 130 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.
8. Nakon 30 minuta zaustavlja se reakcija dodatkom 100 µL stop otopine u svaku jažicu i dobro promiješa. Zatim vršimo mjerenje apsorbancije na ELISA procesoru na valnoj duljini od 450 nm (do 30 minuta).

Izračunavanje koncentracije analita

Nakon analize pristupa se određivanju koncentracije testosterona u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke dijele se s apsorbancijom prvog odnosno nultog standarda (0 ng/mL) i množe se sa 100 te se dobiju %-tci apsorbancije B / B_0 . Prema tome nulti standard je jednak 100 %.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \times 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

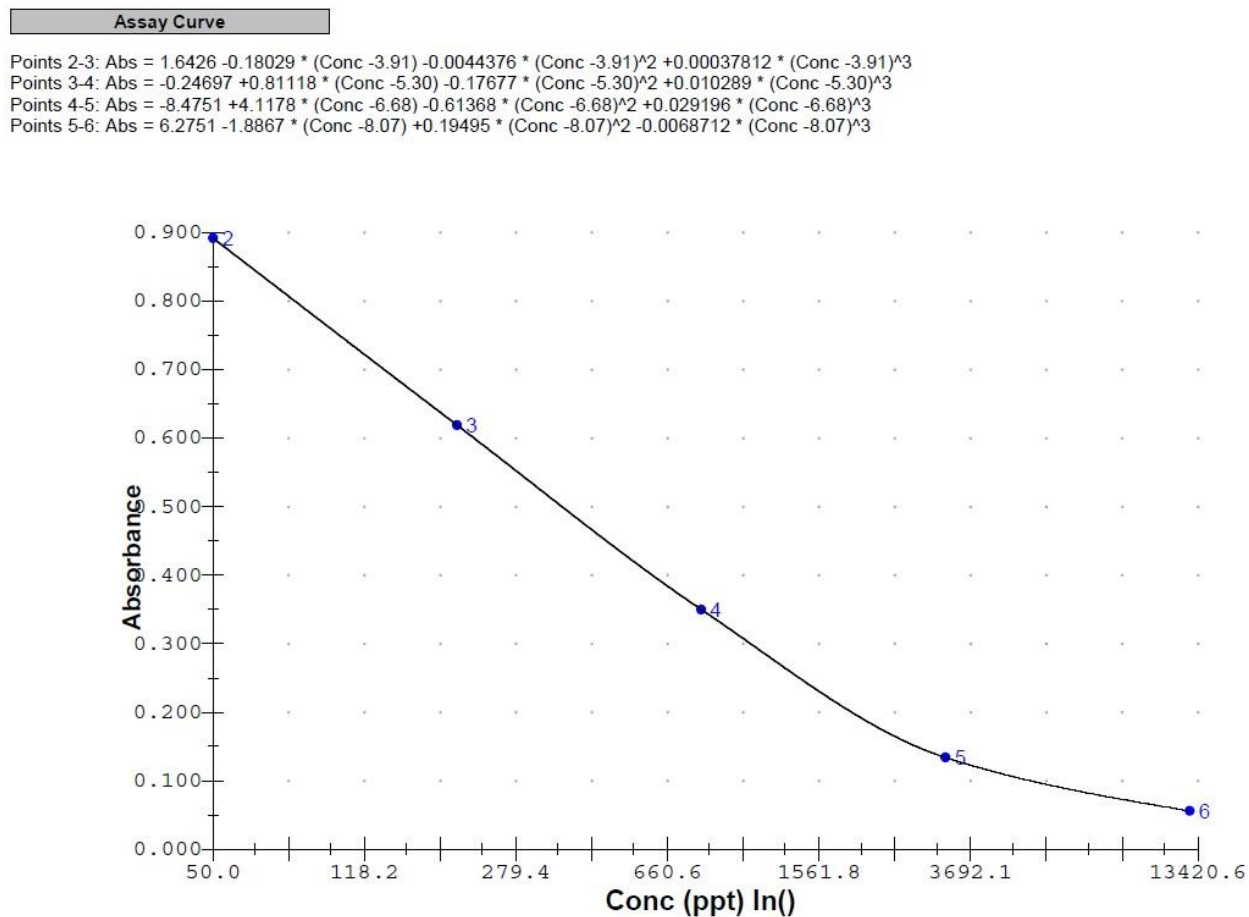
Koncentracija testosterona u uzorcima očitava se iz baždarne krivulje kojoj su na ordinatu nanesene vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije testosterona, a na apscisu koncentracije testosterona (0-12800 ng/kg). Dobivene koncentracije testosterona u uzorcima plazme se pomnože s faktorom 0,2.

3.3. Statistička analiza rezultata

Dobiveni brožčani podatci obrađeni su korištenjem programa Stata 13.1 (Stata Corp., SAD). Razdioba vrijednosti koncentracije estradiola provedena je Shapiro-Wilk testom. Razlike u koncentraciji estradiola između teladi različitih spolova, podrijetla i pasmine provjerene su univarijantnim Studentovim t testom i analizom varijance (ovisno o broju skupina). U model linearne regresije uvršteni su koji su u univarijantnom testu bili statistički povezani s čimbenikom. Budući da je u većini uzoraka seruma teladi koncentracija testosterona bila ispod razine detekcije metode, koncentracija je prevedena u dihotomnu varijablu 0 i 1. Vrijednost 0 pripisana je koncentracijama manjim od vrijednosti 50 ng/L, dok je vrijednost 1 pripisana teladi u čijoj je plazmi razina testosterona bila mjerljiva, odnosno ako je iznosila više od 50 ng/L. Statistički je provjerena povezanost dihotomne varijable koncentracije testosterona s ostalim promatranim varijablama koristeći Fisher exact test.

4. REZULTATI

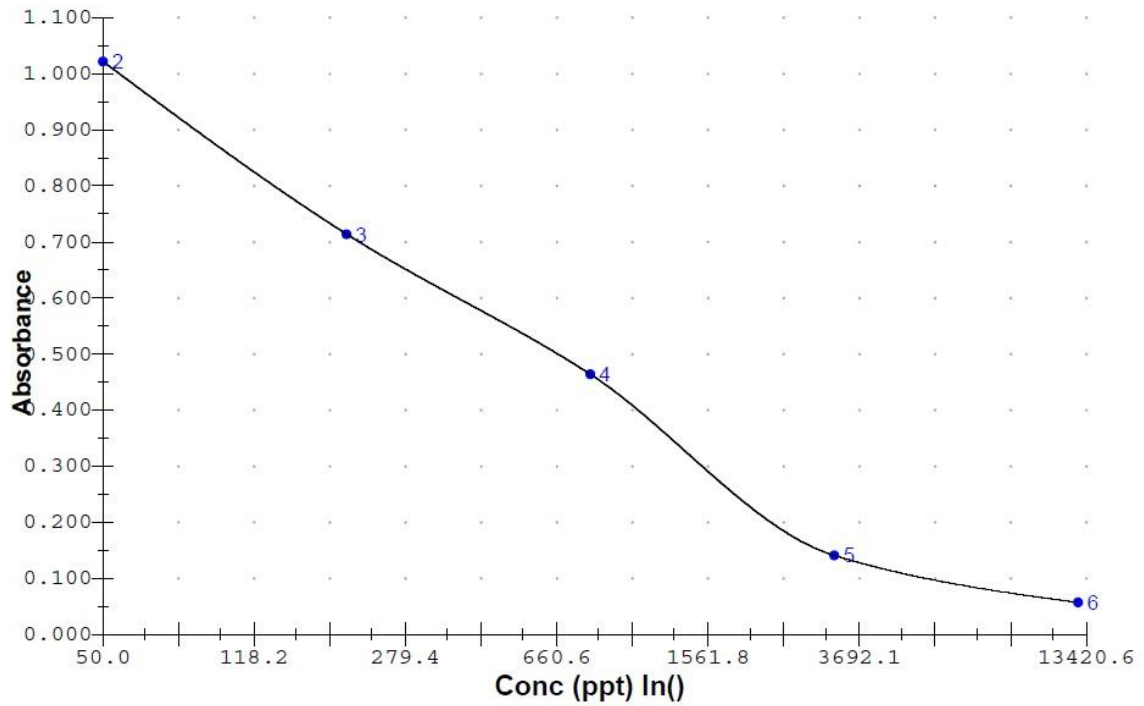
U analizama 17β -estradiola i testosterona korištene su baždarne krivulje njihovih standardnih otopina prikazane na slikama 1 i 2. Rezultati mjerenja razina 17β -estradiola i testosterona u krvi teladi različitog spola i pasmina prikazani su u tablici 3.



Slika 1. Baždarna krivulja standardnih otopina 17β -estradiola

Assay Curve

Points 2-3: Abs = 1.5766 + 0.042128 * (Conc - 3.91) - 0.070513 * (Conc - 3.91)^2 + 0.0060082 * (Conc - 3.91)^3
Points 3-4: Abs = 6.2220 - 2.4895 * (Conc - 5.30) + 0.38867 * (Conc - 5.30)^2 - 0.021708 * (Conc - 5.30)^3
Points 4-5: Abs = -30.379 + 13.303 * (Conc - 6.68) - 1.8790 * (Conc - 6.68)^2 + 0.086639 * (Conc - 6.68)^3
Points 5-6: Abs = 8.2920 - 2.5267 * (Conc - 8.07) + 0.26265 * (Conc - 8.07)^2 - 0.0092573 * (Conc - 8.07)^3



Slika 2. Baždarna krivulja standardnih otopina testosterona

Tablica 3. Prikaz koncentracija 17 β -estradiola i testosterona u teladi po parametrima variranja

R.br.	Farma	Spol	Pasmina	Dob (mjeseci)	EST u jažici/ppt	EST u ng/L	TEST u jažici/ppt	TEST ng/L
1.	A	Ž	Simental	3,5	81,2	16,24	<50	<50
2.	B	M	Mesna	2,5	101,1	20,22	765,3	153,06
3.	B	M	Simental	3	69,1	13,82	959,3	191,86
4.	B	Ž	Mesna	3	70,2	14,04	<50	
5.	B	Ž	Simental	4	87,7	17,54	<50	
6.	B	Ž	Simental	4	88,6	17,72	<50	
7.	B	Ž	Holstein	4,5	99	19,8	2510, 3	502,06
8.	B	M	Simental	4,5	100	20	<50	
9.	B	Ž	Simental	2,5	201,1	40,22	71, 1	14,22
10.	B	Ž	Simental	2	137,2	27,44	119, 7	23,94
11.	B	M	Simental	2	135,7	27,14	531, 5	106,30
12.	B	M	Simental	2	145	29	<50	
13.	B	Ž	Simental	2,5	179,6	35,92	<50	
14.	B	Ž	Simental	4,5	147,2	29,44	<50	
15.	B	Ž	Holstein	5	158,9	31,78	<50	
16.	C	Ž	Holstein	4	163,8	32,76	<50	
17.	C	Ž	Holstein	4,5	266,5	53,30	54, 9	10,98
18.	C	Ž	Holstein	2,5	174,2	34,84	<50	
19.	C	Ž	Holstein	3	194	38,80	<50	
20.	C	Ž	Holstein	3	235,2	47,04	<50	
21.	C	Ž	Holstein	5	191,1	38,22	<50	
22.	C	Ž	Holstein	3,5	237,5	97,50	<50	
23.	C	Ž	Holstein	5	166,3	33,26	<50	
24.	C	Ž	Holstein	4,5	111,3	22,26	<50	
25.	C	Ž	Holstein	4,5	228,2	45,64	53, 3	10,66
26.	C	Ž	Holstein	4	170,8	34,16	<50	
27.	C	Ž	Simental	3,5	176,1	35,22	<50	
28.	C	Ž	Holstein	3	127,1	25,42	<50	
29.	C	Ž	Holstein	4,5	86,8	17,36	<50	
30.	C	Ž	Simental	5	101,6	20,32	<50	
31.	C	Ž	Holstein	4,5	119,6	23,92	<50	
32.	C	Ž	Holstein	4	62,2	12,44	<50	

4.1. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola u plazmi teladi

Shapiro-wilk testom ustvrđeno je da izmjerene koncentracije 17 β -estradiola u plazmi teladi udovoljavaju načelima normalne razdiobe ($P=0,25$).

4.1.1. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola obzirom na spol

Potom je ispitano postoji li razlika u koncentracijama 17 β -estradiola s obzirom na muški (5 teladi) i ženski (27 teladi) spol (tablica 4). Opažene razlike u koncentraciji 17 β -estradiola između muške i ženske teladi nisu statistički različite ($P=0,133$).

Tablica 4. Koncentracija 17 β -estradiola u serumu teladi različitog spola (srednja vrijednost (SV) \pm standardna devijacija (SD))

Spol	N	SV	SD	<i>P</i>
M	5	22,03	6,11	0,1330
Ž	27	30,09	11,26	
Ukupno	32	28,83	10,95	

4.1.2. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola u teladi s obzirom na farmu podrijetla

Uspoređeni su podatci o koncentracijama 17 β -estradiola i obzirom na farmu podrijetla telad. S farme A uzet je uzorak krvi od jednog teleta, sa farme B od 14 teladi, a s farme C od 17 teladi. Rezultati su prikazani u tablici 5. Opažene razlike u koncentraciji 17 β -estradiola u krvi teladi s različitih farmi statistički su se značajno razlikovale ($P=0,04$).

Tablica 5. Koncentracija 17β -estradiola u serumu teladi podrijetlom s različitih farmi (srednja vrijednost (SV) \pm standardna devijacija (SD))

Farma	N	SV	SD	<i>P</i>
A	1	16,24	.	0,04
B	14	24,57	8,17	
C	17	33,08	11,54	

4.1.3. Varijacije u koncentracijama 17β -estradiola s obzirom na pasminu

Podatci o koncentracijama 17β -estradiola međusobno su uspoređeni i s obzirom na pasminu teladi, pri čemu su razlikovane tri skupine: mesna pasmina (2 teladi), pasmina holstein-frisien (17 teladi) te simentalaska pasmina (13 teladi). Tablica 6 prikazuje navedene rezultate. Opažene razlike u koncentraciji 17β -estradiola između teladi različitih pasmina bile su statistički značajne ($P=0,048$).

Tablica 6. Koncentracija 17β -estradiola u serumu teladi različitih pasmina (srednja vrijednost (SV) \pm standardna devijacija (SD))

Pasmina	Broj	SV	SD	<i>P</i>
Holstein	17	32,85	11,57	0,0480
Simental	13	25,39	8,45	
Mesna	2	17,13	4,37	

4.1.4. Varijacije u koncentracijama 17 β -estradiola s obzirom na dob

Telad je podijeljena na dvije skupine obzirom na dob: mlađa i starija. Mlađa skupina predstavlja telad koja je u trenutku vađenja krvi bila mlađa ili je imala točno 3,5 mjeseca starosti (ukupno 15 teladi), a stariju skupinu predstavlja telad starija od 4 mjeseca (ukupno 17 teladi). Rezultati koncentracija 17 β -estradiola s obzirom na te dvije skupine prikazani su u tablici 7. Opažene razlike u koncentraciji 17 β -estradiola između teladi različitih dobnih skupina nisu bile statistički značajne ($P=0,5204$).

Tablica 7. Koncentracija 17 β -estradiola u serumu teladi različite dobi (srednja vrijednost (SV) \pm standardna devijacija (SD))

Dob (mjeseci)	N	SV	SD	<i>P</i>
$\leq 3,5$	15	30,19	11,02	0,5204
≥ 4	17	27,64	11,09	

Koeficijenti regresije dobiveni iz modela linearne regresije pokazuju da koncentracija 17 β -estradiola nije statistički značajno linearno povezana s podrijetlom teladi (farma) niti s pasminom teladi. Prikaz linearne regresije nalazi se u tablici 8.

Tablica 8. Prikaz linearne regresije

Čimbenik	Koeficijent regresije	SE _{koef. reg.}	T	<i>P</i>	95% Interval povjerenja
Farma	5,16	4,32	1,19	0,242	-3,6-14,01
Pasmina	-4,42	3,95	-1,12	0,273	-12,51-3,66

4.2. Varijacije u koncentracijama testosterona u plazmi teladi

4.2.1. Varijacije u koncentraciji testosterona s obzirom na spol

U promatranom uzorku (5 muških teladi i 27 ženskih teladi) ispitano je postoji li razlika u koncentraciji testosterona obzirom na spol teladi. Koncentracija testosterona manja od 50 ng/L izmjerena je u 2 teladi muškog spola i u 22 teladi ženskog spola, dok je koncentracija testosterona iznad 50 ng/L izmjerena u 3 teladi muškog spola i u 5 teladi ženskog spola. Tablica 9 prikazuje spomenute rezultate. Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi obaju spolova, odnosno opažene razlike između spolova nisu statistički značajne ($P=0,085$).

Tablica 9. Varijacije u koncentraciji testosterona u teladi različitog spola

Konc. testosterona (ng/L)	Spol		<i>P</i>
	M	Ž	
< 50	2	22	0,085
>50	3	5	
UKUPNO	5	27	

4. 2. 2. Varijacije u koncentracijama testosterona s obzirom na farmsko podrijetlo

Uspoređeni su podaci o koncentracijama testosterona i obzirom na farmsko podrijetlo teladi. S farme A uzet je uzorak krvi od jednog teleta, s farme B od 14 teladi, a s farme C od 17 teladi. Rezultati su prikazani u tablici 10. Koncentracija testosterona manja od 50 ng/L izmjerena je u 1 teleta na farmi A, u 8 teladi na farmi B te u 15 teladi na farmi C. Koncentracija testosterona veća od 50 ng/L izmjerna je u 6 teladi na farmi B te u dvoje teladi na farmi C. Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi svih triju promatranih farmi, odnosno opažene razlike između farmi nisu statistički značajne ($P=0,122$).

Tablica 10. Varijacije u koncentracijama testosterona s obzirom na farmsko podrijetlo

Konc. testosterona (ng/L)	Farma			<i>P</i>
	A	B	C	
< 50	1	8	15	0,122
>50	0	6	2	
UKUPNO	1	14	17	

4. 2. 3. Varijacije u koncentracijama testosterona s obzirom na pasminu teladi

Podatci o koncentracijama 17β -estradiola međusobno su uspoređeni i obzirom na pasminu teladi, pri čemu su razlikovane tri skupine: mesna pasmina (2 teladi), pasmina holstein-frisien (17 teladi) te simentalna pasmina (13 teladi). Rezultati su prikazani u tablici 11. Koncentracija testosterona manja od 50 ng/L izmjerena je u 14 teladi pasmine holstein-frisien, 9 teladi simentalne pasmine i 1 teleta mesne pasmine. Koncentracija testosterona veća od 50 ng/L izmjerena je u 3 teladi pasmine holstein-frisien, 4 teladi simentalne pasmine i 1 teleta mesne pasmine. Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi svih triju promatranih pasmina, odnosno opažene razlike između pasmina nisu statistički značajne ($P = 0,541$).

Tablica 11. Varijacije u koncentraciji testosterona s obzirom na pasminu teladi

Konc. testosterona (ng/L)	Pasmina			<i>P</i>
	Holstein	Simmental	Mesna	
< 50	14	9	1	0,541
>50	3	4	1	
UKUPNO	17	13	2	

4. 2. 4. Varijacije u koncentracijama testosterona obzirom na dob

Telad je podijeljena na dvije skupine obzirom na dob: mlađa i starija. Mlađa skupina predstavlja telad koja je u trenutku vađenja krvi bila mlađa od 4 mjeseca starosti (ukupno 15 teladi), a stariju skupinu predstavlja telad starija od 4 mjeseca (ukupno 17 teladi). Koncentracija testosterona manja od 50 ng/L izmjerena je u 10 teladi mlađe od 4 mjeseca i 14 teladi starije od 4 mjeseca. Koncentracija testosterona veća od 50 ng/L izmjerena je u 5 teladi mlađih od 4 mjeseca starosti i u 3 teladi starije od 4 mjeseca. Prikaz rezultata nalazi se u tablici 12. Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi različitih dobnih skupina, a opažene razlike između dobnih skupina nisu statistički značajne ($P=0,27$).

Tablica 12. Varijacije u koncentracijama testosterona obzirom na dob

Konc. testosterona (ng/L)	Dob (mjeseci)		<i>P</i>
	<4	≥4	
< 50	10	14	0,270
>50	5	3	
UKUPNO	15	17	

5. RASPRAVA

U ovom radu ustvrđene su varijacije u koncentracijama 17β -estradiola u teladi različitih pasmina te s obzirom na dob, spol i uvjete držanja na različitim farmama. Izmjerene koncentracije 17β -estradiola u plazmi teladi, bez obzira na varijacije, udovoljavaju načelima normalne razdiobe ($P=0,25$). Prosječna koncentracija 17β -estradiola u teladi iznosi $28,83 \pm 0,95$ ng/L.

S obzirom na spol, uočljivo je da ženska telad ima nešto veću prosječnu razinu 17β -estradiola u plazmi (30,09 ng/L) nego muška telad (22,03 ng/L), što je i očekivano s obzirom da se i fiziološki veća količina estrogena izlučuje u ženskih jedinki.

Okolišni čimbenici poput: klime, vjetra, vlage, temperature, količine padaline i sunčanih sati, smještaja farme, načina prehrane stoke, broja životinja na farmi, higijenskog održavanja staje, načina držanja stoke (intenzivno ili ekstenzivno) te mnogi drugi faktori razlog su zbog kojeg može doći do promjene u metabolizmu same životinje, a time i do varijacije u koncentracijama hormona. Stoga su navedeni čimbenici utjecaja mogući razlog što svaka farma ima različito visoku prosječnu koncentraciju ispitivanih hormona.

Statistički značajna razlika primjećena je među teladi različitih pasmina. Najvišu prosječnu koncentraciju 17β -estradiola u plazmi teladi pokazala je ranozrela pasmina holstein-friesian (32,85 ng/L) koja brže od ostalih pasmina ulazi u spolni ciklus te shodno tome ima i u ranijoj dobi već pojačano izlučivanje spolnih hormona u odnosu na druge kasnozrelije pasmine.

Koncentracija 17β -estradiola obzirom na dob mlađu od 3,5 mjeseca ili stariju od 4 mjeseca nije bila statistički značajna ($P=0,5204$).

Dobiveni rezultati uspoređeni su s podacima različitih autora kako bi se ustvrdilo postoji li sumnja o ilegalnoj uporabi anaboličkih tvari u pretraživanih životinja iz ovog istraživanja.

AHHAMED i sur. (2018.) ispitivali su razinu hormona u krvi 30 krava, među ostalim i 17β -estradiola, kako bi vidjeli postoji li porast u razini ovog hormona nakon sinkronizacije spolnog ciklusa. Srednja vrijednost prve izmjerene koncentracije bez davanja GnRH i $\text{PGF}_{2\alpha}$ iznosila je 82,23 pg/mL, a srednja vrijednost nakon sinkronizacije ciklusa 107,3 pg/mL.

WOZNIAK i sur. (2016.) mjerili su razinu 17β -estradiola na populaciji krava u Poljskoj te su dobivene sljedeće koncentracije: razina hormona u krvi do 18 mjeseci starosti iznosila je ispod $0,027-0,086 \mu\text{g/L}$, u starijih od 18 mjeseci ispod $0,059-0,125 \mu\text{g/L}$, dok je u bikova iznosila $0,025-0,041 \mu\text{g/L}$.

PLEADIN i sur. (2013.) u znanstvenom istraživanju o razinama 17β -estradiola u goveđem mesu, mlijeku i krvi navode da su koncentracije blago varirale po životinjama, ali i ovisile o vrsti matriksa. Izmjerene koncentracije u mesu su bile $10-21 \text{ ng/kg}$, u mlijeku $10-35 \text{ ng/L}$, a u krvi $12-29 \text{ ng/L}$. Srednje vrijednosti 17β -estradiola u uzorcima iz svih pet analiziranih skupina iznosile su $13 \pm 5 \text{ ng/kg}$ u mesu, $19 \pm 13 \text{ ng/L}$ u mlijeku i $21 \pm 11 \text{ ng/L}$ u plazmi. Statističkom obradom podataka nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$), u koncentracijama 17β -estradiola između analiziranih skupina uzoraka.

OPARA i sur. (2006.) istraživali su razinu 17β -estradiola u folikularnoj tekućini i serumu u 110 zaklanih zebu goveda (*Bos indicus*) na području Nigerije. Srednja vrijednost 17β -estradiola u folikularnoj tekućini bila je $1669,6 \pm 9,7 \text{ pg/mL}$, a u serumu negravidnih krava $858,5 \pm 6,8 \text{ pg/mL}$, dok je u gravidnih krava $115,7 \pm 1,2 \text{ pg/mL}$.

GINTHER i sur. (2000.) te BEG i sur. (2001.) objavili su rezultate razina 17β -estradiola u folikularnoj tekućini u goveda (*Bos taurus*), pri čemu su varijacije u koncentracijama iznosile $300-500 \text{ ng/mL}$ u folikularnoj tekućini, dok je najviša izmjerena koncentracija bila 1000 ng/mL .

NAKADA i sur. (2000.) su objavili podatke za junice koje još nisu gravidne te je vrijednost 17β -estradiola u plazmi bila $0,3-2,2 \text{ ng/L}$, dok je razina u gravidnih junica bila znatno veća, u rasponu od $52-277 \text{ ng/L}$.

S obzirom da je razina testosterona usko vezana s dobi životinje i svoj porast dobiva tek iza 12-14 mjeseci starosti bika (CHACUR, 2018.), varijacije u koncentracijama testosterona mjerenih iz plazme teladi nisu bile značajno promijenjene s obzirom na spol, pasminu, dob i farmu, što je sukladno i rezultatima ovog istraživanja, a slične vrijednosti dobili su i drugi autori. U ovom radu izmjerena koncentracija testosterona manja je od 50 ng/L u 24 teladi, a u 8 teladi je veća od 50 ng/L .

Prema istraživanju WOZNIAK i sur. (2016.) prosječna koncentracija testosterona u krvi teladi iznosi 0,05-0,23 $\mu\text{g/L}$, dok je u odraslih jedinki starijih od 18 mjeseci 0,30-0,49 $\mu\text{g/L}$. U bikova, bez obzira na njihovu dob, prosječna koncentracija iznosila je 5-12,1 $\mu\text{g/L}$.

Prema istraživanju PLEADIN i sur. (2011.) prosječna koncentracija testosterona u plazmi jednogodišnjih muških goveda iznosila je $9,44 \pm 5,7$ ng/mL.

Primjena spolnih hormona, bilo sintetskih, bilo prirodnih, u farmских životinja može rezultirati prisutnošću rezidua tih tvari u proizvodima životinjskog podrijetla koji su namijenjeni za prehranu ljudi. Konzumiranjem takve hrane zdravlje potrošača može biti ozbiljno ugroženo te je stoga primjena svih anaboličkih sredstava u Europskoj uniji zabranjena. Teško je sa sigurnošću definirati koncentracije hormona koje se mogu smatrati fiziološkim, a koje bi uputile na zlouporabu, budući da brojni čimbenici imaju utjecaj na njihove vrijednosti. S obzirom na stalni razvoj novih sintetskih tvari i moguću zlouporabu tzv. „koktela“ s niskim udjelima aktivnih tvari iz ove skupine, potreban je kontinuiran nadzor njihove primjene tijekom tova životinja sve do klaoničkog iskorištavanja, s konačnim ciljem proizvodnje zdravstveno ispravne hrane životinjskog podrijetla i zaštite zdravlja potrošača (PLEADIN i BOGDANOVIĆ, 2017.).

6. ZAKLJUČAK

Koncentracije 17β -estradiola i testosterona u teladi različitih pasmina, dobi i spola, dobivene ovim istraživanjem, sukladne su vrijednostima koje su objavili drugi autori. Važno je spomenuti da su se dobivene koncentracije 17β -estradiola i testosterona kretale u okviru fizioloških razina te da nisu ustvrđeni nesukladni rezultati. Prosječna koncentracija 17β -estradiola u teladi iznosila je $28,83 \pm 10,95$ ng/L, dok je ustvrđena koncentracija testosterona bila manja od 50 ng/L u 24 teladi te veća od 50 ng/L u 8 teladi.

Vrijednosti koncentracija variraju s obzirom na spol, pasminu i okolišne čimbenike (farmu). S obzirom na dobivene vrijednosti u istraživane teladi, može se isključiti sumnja na moguću zlouporabu prirodnih ili sintetičkih hormonskih tvari s anaboličkim učinkom.

Ustvrđene fiziološke razine u promatranim uzorcima, s obzirom da isključuju mogućnost zlouporabe 17β -estradiola i testosterona, u budućnosti mogu služiti kao referentne vrijednosti za usporedbu u daljnjim procjenama.

7. SAŽETAK

Fiziološke koncentracije spolnih hormona 17β -estradiola i testosterona variraju obzirom na vrstu životinje, dob, spol, pasminu, način držanja, hranidbu, stres, okolišne faktore. Navedeni hormoni su nužni za rast i razvoj životinje te njihovu spolnu zrelost i reproduktivnu funkciju. Zbog svog anaboličkog učinka koristili su se u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji kao promotori rasta te su se u prošlosti koristili putem stočne hrane ili u obliku implantata. No, zbog svojih toksičnih, mutagenih, kancerogenih i teratogenih učinka u životinja i ljudi zabranjena je njihova uporaba u svrhu proizvodnje hrane životinjskog podrijetla. Danas je dopušteno korištenje ovih hormona samo u terapijske svrhe za liječenje poremećaja reprodukcije i gravidnosti. S obzirom na stalni razvoj novih sintetskih tvari koje bi mogle imati anabolički učinak i moguću zlouporabu, nužno je tijekom toga redovito provoditi kontrole te poznavati fiziološke vrijednosti razina ovih hormona. Cilj ovog rada, uzimajući u obzir sve navedeno, bilo je istražiti fiziološke razine prirodnih hormona 17β -estradiola i testosterona u krvi teladi različitih pasmina, spolu i dobi na području Republike Hrvatske. U tu svrhu s tri različite farme na području Republike Hrvatske nasumično je izabrano 32 teladi različitog spola (5 muški i 27 ženskih), dobi 2-5 mjeseci starosti, različitih pasmina i kategorija (13 teladi simentalne pasmine, 2 teladi mesne pasmine, 17 teladi holstein-friesian pasmine). Prilikom općeg kliničkog pregleda životinje od strane nadležnog veterinara, nisu primjećeni nikakvi znaci bolesti ili stanja koje bi mogle utjecati na razine ovih hormona. Prosječna razina 17β -estradiola iznosila je $28,83 \pm 10,95$ ng/L, dok je koncentracija testosterona niža od 50 ng/L izmjerena u 24 teladi, a koncentracija testosterona viša od 50 ng/L u 8 teladi. S obzirom da su navedene koncentracije u skladu s fiziološkim koncentracijama iz drugih istraživanja, kod pretraživane teladi može se isključiti sumnja na ilegalnu uporabu sredstava s anaboličkim učinkom.

Ključne riječi: 17β -estradiol, testosteron, anabolički i terapijski učinak, fiziološke razine

8. SUMMARY

Variations in the concentration of the hormone 17 β -oestradiol and testosterone level in calves of different sex and breed

Physiological levels of sex hormones 17 β -oestradiol and testosterone vary according to the type of animal, age, sex, breed, manner of holding, nutrition, stress and environmental factors. Those hormones are necessary for growth and development of the animal, their sexual maturity and reproductive function. Because of their anabolic effect they were used in intensive livestock industry as growth promoters, applied in food or as an implant. But because of their toxic, mutagenic, teratogenic and cancerous effects on animal and human, they are forbidden for using as a purpose of improving the quality of the products of animal origin. Today it is only allowed to use this hormones in therapeutic purpose when it is necessary to treat some reproductive problem or problem in pregnancy. Considering the constant development of new synthetic substances that could have anabolic effects and possible misuse, it is necessary to provide regular controls during fattening and to know physiological values of the levels of these hormones. The aim of this work, taking all of the above, was to investigate the physiological levels of the natural hormones 17 β -oestradiol and testosterone in the blood of calves with different age, sex and breed on the area of Republic of Croatia. In this purpose we have randomly selected in Croatia 32 calves of both sexes (5 males and 27 females), aging 2-5 months, different breeds and categories (13 calves of Simmental breed, 2 calves of meat breed and 17 calves of Holstein-Friesian breed). During general clinical examination we none of visible clinical changes were observed or conditions which could indicate which could alter physiological levels of investigating hormones. In this regard blood samples were taken and analyzed for these hormone levels in Croatian veterinary institute, Zagreb, Croatia. The average level of 17 β -oestradiol is 28.83 ± 10.95 ng/L, while the testosterone level was under 50 ng/L in 24 calves and above 50 ng/L in 8 calves. Considering that the concentrations were consistent with the physiological concentrations of other authors, the suspected illegal use of the anabolic agent in those examined calves was excluded.

Key words: 17 β -oestradiol, testosterone, anabolic and therapeutic use, physiological levels

9. LITERATURA

AHHAMED, R., M. TASNIM, MD. A. HALIM, M. SARKAR, MD. S. ISLAM, M. MORSHED (2018) : A comparative study on reproductive hormones of repeat breeding and synchronized repeat breeding dairy cows under Bathan Rearing System at Baghabari milk shed areas in Bangladesh. IOSR J. Agricul. Vet. Sci., 11, Ver. II, 55-60.

ANONYMOUS (1996): Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/ECC. Official Journal of the European Union: Legis. L125,3.

ANONYMOUS (2003): Council Directive 2003/74/EC of the European parliament and of the council of 22 September 2003 amending Council Directive 96/22/EC concerning prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. Official Journal of the European Union: Legis. L 262/17.

ANONYMOUS (2010): Naredba kojom se zbranjuje primjena na farmskim životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 82/2010).

ANONYMOUS (2011): Pravilnik o farmakološkim djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 21/2011).

BOŽIĆ, T. (2012): Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, 398-399.

CHACUR, M., A. ARIKAWA, E. OBA, C. SOUZA, L. R. G. FILHO (2018): Influence of testosterone on body and testicular development in Zebu cattle in the Tropical Climate, Advances in testosterone action, Sao Paulo, Brasil.

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, str. 18-22.

GINTHER, O. J., D. R. BERGFELT, L. J. KULICK, K. KOT (2000): Selection of dominant follicles in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.* 63, 383-389.

GUYTON, A. C., J. E. HALL (2017): *Medicinska fiziologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 13. izdanje. Str. 925-936., 1027-1033.

HEITZMAN, R. J. (1994): *Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products : Reference Materials and Methods*. Oxford : Blackwell science.

HOFFMANN, B., P. EVERS (1986): Anabolic agents with sex –hormone-like activities: problems of residue. In: *Drug Residues in Animals*, Rico, A. G. (ed.), Academic Press, New York, pp. 11-146.

MEŠTRIĆ-FLEGAR, Z., M. VUČIĆ-LOVRENČIĆ i sur. (2018): Preglednik medicinskobiokemijskih pretraga Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur 1937.-2017., Medicinska naklada, Zagreb, str. 66.

NAKADA, K., M. MORIYOSHI, T. NAKAO, G. WATANABE, K. TAYA (2000): Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol 17-beta, testosterone, progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domest. Anim. Endocrinol.* 18, 57-69.

OPARA, M. N., C. IOKOLI, U. HERBERT, O. ADEYEMO (2006): Ovarian morphology and estradiol 17-beta concentrations in serum and follicular fluid of slaughtered zebu cattle in Ibadan, Nigeria. *Vet. arhiv* 76, 403-411.

PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ, N. VAHČIĆ (2013): 17 β -estradiol u goveđem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44-49.

PLEADIN, J., N. PERŠI, B. ANTOLOVIĆ, B. ŠIMIĆ, I. KMETIĆ (2011a): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 48-56.

PLEADIN, J., S. TERZIĆ, N. PERŠI, A. VULIĆ (2011b): Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. *Biotechnol. Anim. Husband.* 27, 147-159.

- PLEADIN, J., T. BOGDANOVIĆ (2017): Anabolici u proizvodnji mesa – učinci u farmских životinja i opasnosti po zdravlje potrošača. Meso 19, 59-67.
- SAMARDŽIJA, M., B. VUDRAG, J. PLEADIN (2015): Spolni hormoni u farmских životinja: fiziološke razine, terapijska i anabolička primjena. Vet. stn. 46, 281-293.
- SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T., DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 77-79.
- SAMARDŽIJA, M., T. MAGAŠ, L. RADMANIĆ, J. PLEADIN (2018): Primjena testosterona u domaćih životinja – terapijsko i anaboličko djelovanje. Vet. stn. 49, 287-296.
- TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- TURK, R., I. JUKIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. ROBIĆ, M. BELIĆ (2017): Neuro-hormonska regulacija stresnog odgovora i učinak na imunost domaćih životinja, Vet. stn. 48, 305-315.
- WOLFENSON, D., Z. ROTH, R. MEDIAN (2000): Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspect. Anim. Reprod. Sci. 61, 535-547.
- WOZNIAK, B., S. WITEK, I. MATRASZEK-ZUCHOWSKA, A. KLOPOT, A. POSYNIAK (2016): Levels of the natural hormones 17 β -oestradiol and testosterone in serum of cattle: results from population studies in Poland. J. Vet. Res. 60, 461-466.
- ZIMMERMAN, H. J. (1998): Hepatic disease. In: Toxicology of the liver. Eds. Plaa, G. L. Hewitt, W. R., Taylor and Francis, USA, 45-47.
- ŽURA ŽAJA I., A. SLUGANOVIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. MILINKOVIĆ-TUR, T. DOBRANIĆ, S. STRELEC, Đ. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ, S. VINCE (2019): Učinci oksidacijskog stresa na muški spolni sustav i mehanizmi antioksidacijske zaštite. Vet. stn. 50, 43-54.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.11.1990. u Zagrebu, gdje sam i završila Osnovnu školu Ivana Cankara te Žensku opću gimnaziju Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013. godine. Paralelno uz studij veterine, radila sam kao savjetnik za nutricionizam pasa i mačaka te sam bila čest gost brojnim pet shopovima, veterinarskim ljekarnama i veterinarskim ambulancama diljem Hrvatske. Kratko vrijeme radila sam i u veterinarskoj farmakovigilanciji. Članica sam felinološkog saveza „Felis Hungarica“ te međunarodne felinološke organizacije „Federation International Feline“ te se aktivno bavim uzgojem čistokrvnih Maine Coon mačaka od 2008. godine. Redovito pohađam veterinarske kongrese i radionice u sklopu dodatne edukacije.