

# Varijacije koncentracije $17\beta$ -estradiola i testosterona u teladi različitog spola, dobi, pasmine i farmaskog podrijetla



M. Samardžija, I. Gulić, D. Đuričić, N. Kudumija, M. Benić i J. Pleadin\*

## Sažetak

Fiziološke koncentracije spolnih hormona  $17\beta$ -estradiola i testosterona varijaju s obzirom na vrstu životinje, dob, spol, pasminu, način držanja, hranidbu, stres i okolišne čimbenike. Navedeni hormoni su nužni za rast i razvoj životinje te njihovu spolnu zrelost i reproduktivnu funkciju. Zbog svog anaboličkog učinka koristili su se u prošlosti u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji kao promotori rasta, putem stočne hrane ili u obliku implantata. No, zbog svojih toksičnih učinaka u životinja i ljudi, uključujući mutagenost, kancerogenost i teratogenost, njihova je uporaba zabranjena u svrhu proizvodnje hrane životinjskog podrijetla. Danas je dopušteno korištenje prirodnih 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 mogu zlorabiti, nužno je tijekom redovitog provođenja kontrole te

poznavanja fizioloških vrijednosti razina ovih hormona. Cilj ovog rada, uzimajući u obzir sve navedeno, bilo je istražiti razine prirodnih hormona  $17\beta$ -estradiola i testosterona u krvi teladi različitog spola, pasmina, dobi i farmaskog podrijetla na području Republike Hrvatske. U tu svrhu s tri različite farme na području Republike Hrvatske nasumično su izabrana 32 teleta različitog spola (5 muških i 27 ženskih), dobi 2 – 5 mjeseci starosti, različitih pasmina i kategorija (13 teladi simentalske pasmine, 2 teladi mesne pasmine, 17 teladi holštajnske pasmine). Prilikom općeg kliničkog pregleda životinje od strane nadležnog veterinarara, nisu primijećeni nikakvi znaci bolesti ili stanja koje bi mogle utjecati na razine ovih hormona. Prosječna razina  $17\beta$ -estradiola iznosila je  $28,8 \pm 11,0$  ng/L. Koncentracija testosterona bila je niža od limita detekcije primjenjene analitičke metode u 24 uzorka plazme teladi, a detektirana je u 8 uzoraka s

Dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Ines GULIĆ, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., docent, Veterinarska stanica Đurđevac, Hrvatska; dr. sc. Nina KUDUMIJA, dipl. ing. preh. tehnol., asistentica, dr. sc. Miroslav BENIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Jelka PLEADIN\*, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, izvanredna profesorica, (dopisni autor, e-mail: pleadin@veinst.hr), Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

prosječnom koncentracijom od  $126,7 \pm 167,5$  ng/L, ukazujući na široku varijabilnost u koncentracijama ovog hormona. Statistički značajna razlika u koncentracijama određena je jedino za  $17\beta$ -estradiol s obzirom na pasminski sastav i farmu podrijetla ( $P < 0,05$ ). S obzirom da su

ustvrđene koncentracije u skladu s fiziološkim razinama iz ranije provedenih istraživanja u literaturi, u pretraživane teladi se može isključiti sumnja na ilegalnu uporabu sredstava s anaboličkim učinkom.

**Ključne riječi:** *17 $\beta$ -estradiol, testosteron, fiziološke razine*

## Uvod

Posljednjih desetljeća u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji koriste se brojni stimulatori apetita, dodatci prehrani, vitamini i minerali, lijekovi za prevenciju i suzbijanje bolesti, ali i tvari koje imaju anabolički učinak. Skupina anabolika uključuje stilbene te njihove derivate, antitireoidne tvari, prirodne i sintetske steroidne hormone, laktone rezorcilne kiseline te beta agoniste. 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 (Heitzman, 1994., Pleadin i Bogdanović, 2017.). Zbog mogućeg štetnog djelovanja na zdravlje ljudi od 1989. godine u Europskoj uniji je zabranjeno korištenje svih tvari kojima se u farmakološkim životinjama ostvaruje anabolički učinak (Anonymous, 1996., Anonymous, 2003.).

Prirodni steroidni hormoni svoju fiziološku ulogu u organizmu ostvaruju tako što utječu na razvoj primarnih i sekundarnih spolnih karakteristika jedinki, ali djeluju i na intermedijarni metabolizam (Božić, 2012.). Budući da su steroidni hormoni dio endokrinog sustava u njihovim fiziološkim koncentracijama, moguće su varijacije te se povećane razine spolnih hormona ne mogu 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 i primjene ovih tvari u svrhu liječenja. Isto tako, od velikog su značenja i podatci o okolišnim čimbenicima, stresu te načinu prehrane životinja (Samarđžija i sur., 2015., 2016.). Tijekom stresnog odgovora inhibira se normalno odvijanje spolnog ciklusa, jer visoka koncentracija kortizola suprimira izlučivanje gonadotropnih releasing hormona (GnRH) pa su koncentracije folikulistimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona niske (Turk i sur., 2017.). 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.).

Estrogeni su skupina prirodnih steroidnih hormona u koju ubrajamo  $17\beta$ -estradiol, estron, estriol i epistriol, a izlučuju ih jajnici u kojima se odvija i sama sinteza tih hormona, ali i žuto tijelo te u manjoj količini testisi i nadbubrežna žlijezda (Tomašković i sur., 2007.). Estrogeni se izlučuju u manjim količinama u razdoblju prije spolne zrelosti, da bi se tijekom spolne zrelosti količina povećala do 20 puta. Tada djeluju na proliferaciju stanica i rast tkiva u svim organima vezanim uz primarna spolna obilježja i rasplodivanje (spolni organi, mliječna žlijezda). Estrogeni su ženski spolni hormoni odgovorni za razvoj i održavanje ženskih spolnih organa i sekundarnih spolnih karakteristika (razvoj kostura, dlake, metabolizma masti, odlaganje

bjelančevina, sinteze i akumuliranja RNK i bjelančevina) (Samardžija i sur., 2016.). Tijekom gravidnosti djeluju zajedno s progesteronom, a osim toga povoljno djeluju na gustoću kostiju (Čvorišćec i Čepelak, 2009.). Estrogeni, poput testosterona, direktno i indirektno utječu na pojačano zadržavanje dušika u organizmu te povećanu sintezu proteina (Stephany, 2010., Pleadin i sur., 2011.). Najzastupljeniji hormon iz ove skupine je 17 $\beta$ -estradiol koji je ujedno i najvažniji hormon u razvoju sekundarnih spolnih karakteristika (Gamulin i sur., 2018., Meštrić-Flegar i sur., 2018.).

Androgeni su muški spolni hormoni koji su važni za održavanje jakih mišića i kostiju te pridonose libidu i 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.). Imaju i 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 (Cergolj i Samardžija, 2006.).

U terapijske svrhe u farmskih životinja, rijetko je inducirana uporaba testosterona. No, potreba za testosteronom 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 17 $\beta$ -estradiolom u obliku ušnog implantanta, da bi se povećao rast životinja i iskoristivnost hrane (Pleadin i sur., 2013.).

Utjecaj steroidnih hormona na fiziološke procese u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu, a ukoliko se primjenjuju na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi su ostatci u hrani životinjskog podrijetla niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (Pleadin i sur., 2013., Pleadin i Samardžija, 2019.). Zbog uočenih brojnih toksičnih učinaka u potrošača, prouzročenih konzumacijom kontaminiranih proizvoda te moguće zlouporabe u anaboličke svrhe, nameće se potreba za stalnom provedbom 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., 2011., Samardžija i sur., 2017.).

Cilj je ovog rada bio ispitati variranje koncentracije prirodnih hormona 17 $\beta$ -estradiola i testosterona u plazmi teladi različitog spola, pasmina i dobi, podrijetlom s različitih farmi u Republici Hrvatskoj. Dobiveni podatci mogu poslužiti i usporedbi utvrđenih koncentracija s vrijednostima određenim u drugim istraživanjima, u cilju kontrole potencijalne zlouporabe ovih tvari kao anaboličkih sredstava na teladi.

## Materijali i metode

### Uzorci

U svrhu ispitivanja koncentracija 17 $\beta$ -estradiola i testosterona, tijekom 2019. godine s tri različite farme na području Republike Hrvatske nasumično je odabrano 32 teladi. Telad je bila različitog spola (5 muških i 27 ženskih), različitih pasmina i kategorija (13 teladi simentalske pasmine, 2 teladi mesne pasmine i 17 teladi holštajn pasmine) te dobi (2 – 5 mjeseca starosti). Mlađa skupina predstavljala je telad koja je u trenutku vađenja krvi bila mlađa ili je imala točno 3,5 mjeseca starosti (ukupno

15 teladi), a stariju skupinu predstavljala je telad starija od 4 mjeseca (ukupno 17 teladi).

Prilikom općeg kliničkog pregleda nadležnog veterinara nisu primijećeni nikakvi znaci bolesti ili stanja koje bi mogle utjecati na razine ovih hormona te je životinjama izvađena krv. Uzorci krvi (plazme) su odmah dostavljeni na analize hormona 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 u hrani životinjskog podrijetla.

### Priprema uzoraka plazme

U staklenoj epruveti 1 mL plazme ekstrahirano je s 5 mL eterne mješavine (butilmetileter/petrol eter (30:70, v/v)) te je sadržaj ostavljen mučkati na tresilici tijekom 20 minuta. Zatim je ekstrahirana otopina zamrznuta tijekom 60 minuta pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega je slijedilo dekantiranje nadtaloga u drugu staklenu epruvetu. Dekantirani nadtalog uparen je u struji dušika ili vodenoj kupelji na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezidue hormona su otopljene u  $400\text{ }\mu\text{L}$  pufera za razrjeđivanje te je sadržaj pažljivo promiješan. Za analizu ELISA metodom korišteno je  $20\text{ }\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka po jažici.

### Određivanja razine $17\beta$ -estradiola i testosterona

Analiza  $17\beta$ -estradiola i testosterona provedena je prema uputama proizvođača komercijalnih ELISA kitova (R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka). Princip primjenjenih metoda temelji se na reakciji antigen-antitijelo. Jažice u mikrotitracijskoj ploči obložne su ovčjim protutijelima protiv  $17\beta$ -estradiola, odnosno anti-testosteron protutijelima. U te jažice, dodavani su standardi te uzorci,  $17\beta$ -estradiol enzimski konjugat i anti- $17\beta$ -estradiol protutijela, odnosno testosteron enzimski konjugat i anti-te-

stosteron protutijela. Slobodni i enzimom konjugirani  $17\beta$ -estradiol, odnosno testosteron natječu se za protutijelo vežuća mjesta (kompetitivna ELISA). U isto vrijeme, anti- $17\beta$ -estradiol i anti-testosteron protutijela se vežu i imobiliziranim protutijelima. Nevezani enzimski konjugat se zatim uklanja ispiranjem. Enzimski supstrat i kromogen se potom dodaju u jažice te slijedi inkubacija. Vežani enzimski konjugat pretvara bezbojni kromogen u plavi produkt. Dodatkom tzv. stop otopine, boja se mijenja iz plave u žutu te se nakon toga provodi fotometrijsko mjerenje na  $450\text{ nm}$ . Očitana apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji  $17\beta$ -estradiola, odnosno testosterona, u uzorku.

Koncentracija  $17\beta$ -estradiola i testosterona u uzorcima očitana je iz baždarne krivulje kojoj su na ordinatu nanesele vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije  $17\beta$ -estradiola, odnosno testosterona, a na apscisu koncentracije  $17\beta$ -estradiola, odnosno testosterona ( $0 - 12800\text{ ng/L}$ ). Dobivene se koncentracije  $17\beta$ -estradiola i testosterona u uzorcima plazme pomnože s faktorom razrijeđenja  $0,2$ .

### Statistička analiza rezultata

Dobiveni brožani podatci koncentracija hormona obrađeni su korištenjem programa Stata 13.1 (Stata Corp., SAD). Razdioba vrijednosti koncentracije estradiola provedena je Shapiro-Wilk testom. Razlike u koncentraciji  $17\beta$ -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 oni koji su u univarijantnom testu bili statistički povezani s čimbenikom. Budući da je u većini uzoraka plazme teladi koncentracija testosterona bila ispod razine limita detekcije analitičke metode (LOD), kon-

centracija je prevedena u dihotomnu varijablu 0 i 1. Vrijednost 0 pripisana je koncentracijama manjim od LOD, dok je vrijednost 1 pripisana teladi u čijoj je plazmi razina testosterona bila mjerljiva, odnosno ako je iznosila više od LOD. Statistički je provjerena povezanost dihotomne varijable koncentracije testosterona s ostalim promatranim varijablama koristeći Fisher exact test.

## Rezultati i rasprava

Osim spola i dobi životinje, ranija istraživanja pokazuju da i 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 čimbenici, razlog su zbog kojeg može doći do promjene u metabolizmu same životinje, a time i do varijacije u koncentracijama hormona (Adolf i sur., 1994., Hartmann i sur., 1998., Doyle, 2000., Pleadin i sur., 2013., Samardžija i sur., 2018., Pleadin i Samardžija, 2019.). Stoga su navedeni čimbenici utjecaja mogući razlog različitosti u koncentracija ispitivanih hormona među farmama. Rezultati koncentracija 17 $\beta$ -estradiola i testosterona u plazmi teladi različitog spola, pasmina i dobi podrijetlom s tri farme u Republici Hrvatskoj određeni u ovom istraživanju prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1.** Prikaz koncentracija 17 $\beta$ -estradiola i testosterona u teladi prema pokazateljima variranja

Red. br.	Farma	Spol	Pasmina	Dob (mjeseci)	EST (ng/L)	TEST (ng/L)
1.	A	Ž	Simental	3,5	16,2	n.d.
2.	B	M	Mesna	2,5	20,2	153,1
3.	B	M	Simental	3	13,8	191,9
4.	B	Ž	Mesna	3	14,0	n.d.
5.	B	Ž	Simental	4	17,5	n.d.
6.	B	Ž	Simental	4	17,7	n.d.
7.	B	Ž	Holstein	4,5	19,8	502,1
8.	B	M	Simental	4,5	20,0	n.d.
9.	B	Ž	Simental	2,5	40,2	14,2
10.	B	Ž	Simental	2	27,4	23,9
11.	B	M	Simental	2	27,1	106,3
12.	B	M	Simental	2	29,0	n.d.
13.	B	Ž	Simental	2,5	35,9	n.d.
14.	B	Ž	Simental	4,5	29,4	n.d.
15.	B	Ž	Holstein	5	31,8	n.d.
16.	C	Ž	Holstein	4	32,8	n.d.
17.	C	Ž	Holstein	4,5	53,3	11,0

18.	C	Ž	Holstein	2,5	34,8	n.d.
19.	C	Ž	Holstein	3	38,8	n.d.
20.	C	Ž	Holstein	3	47,0	n.d.
21.	C	Ž	Holstein	5	38,2	n.d.
22.	C	Ž	Holstein	3,5	97,5	n.d.
23.	C	Ž	Holstein	5	33,3	n.d.
24.	C	Ž	Holstein	4,5	22,3	n.d.
25.	C	Ž	Holstein	4,5	45,6	10,7
26.	C	Ž	Holstein	4	34,2	n.d.
27.	C	Ž	Simental	3,5	35,2	n.d.
28.	C	Ž	Holstein	3	25,4	n.d.
29.	C	Ž	Holstein	4,5	17,4	n.d.
30.	C	Ž	Simental	5	20,3	n.d.
31.	C	Ž	Holstein	4,5	23,9	n.d.
32.	C	Ž	Holstein	4	12,4	n.d.

A, B, C – oznake hrvatskih farmi; M – muški spol; Ž – ženski spol; EST – koncentracija 17 $\beta$ -estradiola; TEST – koncentracija testosterona; n.d. – nije detektirano

Prosječna koncentracija 17 $\beta$ -estradiola u teladi iznosila je 28,83 $\pm$ 0,95 ng/L. Shapiro-wilk testom ustvrđeno je da koncentracije 17 $\beta$ -estradiola u plazmi teladi udovoljavaju načelima normalne razdiobe ( $P = 0,25$ ). S obzirom na spol, uočljivo je da ženska telad ima nešto veću prosječnu razinu 17 $\beta$ -estradiola u plazmi (30,09 ng/L) u odnosu na mušku telad (22,03 ng/L), što je i očekivano s obzirom da se i fiziološki veća količina estrogena izlučuje u ženskih jedinki. Međutim, koncentracije ovog hormona po spolu teladi nisu bile statistički različite ( $P = 0,133$ ). Statistički značajna razlika u koncentracijama 17 $\beta$ -estradiola ustvrđena je između teladi različitih pasmina ( $P = 0,048$ ). Najvišu prosječnu koncentraciju imala je ranozrela pasmina holštajn (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 korištene u ovom istraživanju. Koncentracija 17 $\beta$ -estradiola obzirom na dob mlađu od 3,5 mjeseca ili stariju od 4 mjeseca nije bila statistički značajna ( $P = 0,520$ ), dok su značajne razlike ovog hormona određene po farmama podrijetla ( $P = 0,040$ ) (tabela 2).

Koeficijenti regresije dobiveni iz modela linearne regresije pokazuju da koncentracija 17 $\beta$ -estradiola određena u plazmi teladi nije statistički značajno linearno povezana s podrijetlom teladi (farma) niti s pasminom teladi. Prikaz linearne regresije nalazi se u tabeli 3.

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. Ahha-med i sur. (2018.) ispitivali su razinu

**Tabela 2.** Varijacije u koncentraciji 17 $\beta$ -estradiola (ng/L) u plazmi teladi različitog spola s obzirom na farmsko podrijetlo, pasminu i dob

Spol	N	SV	SD	P
M	5	22,03	6,11	0,133
Ž	27	30,09	11,26	
Ukupno	32	28,83	10,95	
Farma	N	SV	SD	P
A	1	16,24	–	0,040
B	14	24,57	8,17	
C	17	33,08	11,54	
Pasmina	N	SV	SD	P
Holštajn	17	32,85	11,57	0,048
Simentalska	13	25,39	8,45	
Mesna	2	17,13	4,37	
Dob (mjeseci)	N	SV	SD	P
≤3,5	15	30,19	11,02	0,520
≥4	17	27,64	11,09	

A, B, C – oznake hrvatskih farmi; M – muški spol; Ž – ženski spol; N – broj uzoraka; SV – srednja vrijednost SD – standardna devijacija; P – vrijednost statističke značajnosti

**Tabela 3.** Prikaz modela linearne regresije određen za koncentracije 17 $\beta$ -estradiola u plazmi teladi

Čimbenik	Koeficijent regresije	SE <sub>koef. reg.</sub>	t	P	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

SE – standardna pogreška, t – Studentov t-test, P – vrijednost statističke značajnosti

17 $\beta$ -estradiola u krvi 30 krava te ustvrdili da je srednja vrijednost prve izmjerene koncentracije bez davanja GnRH i prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  iznosila je 82,23 pg/mL, a srednja vrijednost nakon sinkronizacije ciklusa 107,3 pg/mL. Wozniak i sur. (2016.) mjerili su razinu 17 $\beta$ -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  $\mu$ g/L, u starijih od 18 mjeseci 0,059 – 0,125  $\mu$ g/L, dok je u bikova iznosila 0,025 – 0,041  $\mu$ g/L. Opara i sur. (2006.) istraživali su razinu 17 $\beta$ -estradiola u folikularnoj tekućini i serumu u 110 zebu goveda (*Bos indicus*) na području Nigerije. Srednja vrijednost 17 $\beta$ -estradiola u folikularnoj tekućini bila je 1669,6 $\pm$ 9,7 pg/mL, a u serumu negravidnih krava 858,5 $\pm$ 6,8 pg/mL, dok je u gravidnih

krava iznosila  $115,7 \pm 1,2$  pg/mL. Ginther i sur. (2000.) objavili su rezultate razina  $17\beta$ -estradiola u folikularnoj tekućini u goveda (*Bos taurus*), pri čemu su varijacije u koncentracijama iznosile 300-500 ng/mL u folikularnoj tekućini, dok je najviša izmjerena koncentracija bila 1000 ng/mL. Bage i sur. (2002.) su u junica švedske mliječne pasmine tijekom estrusa ustanovili raspon vrijednosti  $17\beta$ -estradiola u plazmi između 6,1 pmol/L do 80,9 pmol/L. Nakada i sur. (2000.) su objavili podatke za junice koje nisu gravidne te je vrijednost  $17\beta$ -estradiola u plazmi bila 0,3-2,2 ng/L, dok je razina u gravidnih junica bila znatno veća, u rasponu od 52 do 277 ng/L. U ranijem istraživanju o razinama  $17\beta$ -estradiola u plazmi goveda provedenom u Hrvatskoj određene su vrijednosti u rasponu od 12 do 29 ng/L, s prosječnom vrijednošću od  $21 \pm 11$  ng/L (Pleadin i sur., 2013.). Iz navedenih podataka ranijih istraživanja uočeno je široko variranje koncentracija  $17\beta$ -estradiola u ovisnosti o brojnim čimbenicima utjecaja, ali su spomente vrijednosti usporedive s koncentracijama određenim u ovom istraživanju.

Ispitivanjem testosterona u uzorcima plazme teladi određene su vrijednosti manje od LOD analitičke metode u 24

uzorka, dok je u osam teladi testosteron detektiran. Prosječna vrijednost u tim uzorcima iznosila je  $126,7 \pm 167,5$  ng/L, ukazujući na široku varijabilnost u koncentracijama testosterona. Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi obaju spolova, odnosno opažene razlike između spolova nisu bile statistički značajno različite ( $P = 0,085$ ), kao ni razlike s obzirom na farmsko podrijetlo ( $P = 0,122$ ). Učestalost vrijednosti mjerljivih koncentracija testosterona podjednaka je u teladi svih triju promatranih pasmina, a opažene razlike između pasmina nisu statistički značajne ( $P = 0,541$ ). Također, opažene razlike između dobnih skupina teladi nisu bile statistički značajno različite ( $P = 0,270$ ). U tabeli 4 prikazane su varijacije u koncentraciji testosterona u plazmi teladi različitog spola, s obzirom na farmsko podrijetlo, pasminu i dob.

S obzirom da je razina testosterona usko vezana s dobi životinje i svoj porast dobiva tek nakon 12 – 14 mjeseci starosti bika (Chacur i sur., 2018.), varijacije u koncentracijama testosterona određenih u plazmi teladi nisu bile značajno promijenjene s obzirom na spol, pasminu, dob i farmu, što je sukladno i

**Tabela 4.** Varijacije u koncentraciji testosterona (ng/L) u plazmi teladi različitog spola, s obzirom na farmsko podrijetlo, pasminu i dob

TEST (ng/L)	Spol			P
	M		Ž	
< 50	2		22	0,09
>50	3		5	
Ukupno	5		27	
TEST (ng/L)	Farma			P
	M	M	Ž	
< 50	1	8	15	0,12
>50	0	6	2	
Ukupno	1	14	17	



TEST (ng/L)	Pasma			P
	holštajn	simental	mesna	
< 50	14	9	1	0,54
>50	3	4	1	
Ukupno	17	13	2	
TEST (ng/L)	Dob (mjeseci)		P	
	<4	≥4		
< 50	10	14	0,27	
>50	5	3		
Ukupno	15	17		

TEST – koncentracija testosterona; A, B, C – oznake hrvatskih farmi; M – muški spol; Ž – ženski spol; P – vrijednost statističke značajnosti

rezultatima ovog istraživanja. Istraživanjem Wozniak i sur. (2016.) ustvrđena je prosječna koncentracija testosterona u krvi teladi u rasponu 0,05 – 0,23  $\mu$ g/L, a u odraslih jedinki starijih od 18 mjeseci 0,30 – 0,49  $\mu$ g/L. U bikova, bez obzira na njihovu dob, prosječna koncentracija iznosila je 5 – 12,1  $\mu$ g/L. Pleadin i sur. (2011.) su u svom istraživanju ustvrdili prosječnu koncentraciju testosterona u plazmi jednogodišnjih muških goveda od 9,44 $\pm$ 5,7 ng/mL. 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 do 1 ng/mL, a u bikova do 20 ng/mL (Samardžija i sur., 2018.), što je u rasponu vrijednosti određenih i u ovom istraživanju.

## Zaključak

Statistički značajna razlika u koncentracijama 17 $\beta$ -estradiola ustvrđena

je između teladi različitog pasminskog sastava i farne podrijetla, dok statistički značajne razlike po pitanju spola i dobi nisu određene. Varijacije u koncentracijama testosterona nisu se pokazale značajno različitim po pitanju svih razmatranih parametara varijabilnosti. Koncentracije 17 $\beta$ -estradiola i testosterona dobivene u ovom istraživanju općenito su sukladne vrijednostima koje su objavili drugi autori iz različitih zemalja te se mogu smatrati fiziološkim razinama hormona u plazmi teladi, ujedno isključujući sumnju na moguću zlorabu ovih tvari u anaboličke svrhe. Ustvrđene fiziološke razine u promatranim uzorcima, s obzirom da isključuju mogućnost zlorabe 17 $\beta$ -estradiola i testosterona, u budućnosti mogu poslužiti kao referentne vrijednosti za provedbu daljnjih procjena fizioloških razina i moguće zlorabe ovih tvari u anaboličke svrhe.

## Literatura

- ADOLF, T., W. EBERHARDT, H. HESEKER, S. HARTMANN, A. HERWIG, B. MATIASKE, K. J. MOTH, R. SCHNEIDER and W. KIIBLER (1994): Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme in der Bundesrepublik Deutschland. In: VERASchriftenreihe, Band XII, Ktibler, W., Anders, H. J., Heeschen, W. (eds.), Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen.
- AHHAMED, R., M. TASNIM, M. D. A. HALIM, M. SARKAR, M. D. S. ISLAM and 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.
- Anon. (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.
- Anon. (2003): Council Directive 2003/74/EC of the European parliament and of the council of 22 September 2003 armending 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.
- BAGE, R., H. GUSTAFSSON, B. LARSSON, M. FORSBERG and H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2002): Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 57, 2257–2269.
- BOŽIĆ, T. (2012): Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, 398–399.
- CHACUR, M., A. ARIKAWA, E. OBA, C. SOUZA and 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. DOI: 10.5772/intechopen.76706
- CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, str. 18–22.
- ČVORIŠEĆ, D. i I. ČEPELAK (2009): Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska.
- DOYLE, E. (2000): Human Safety of Hormone Implants Used to Promote Growth in Cattle. *FRI BRIEFINGS*. <http://fri.wisc.edu/docs/pdf/hormone.pdf>
- GAMULIN, E., M. SAMARDŽIJA, I. BUTKOVIĆ and J. PLEADIN (2018): Biochemical mechanisms of sex hormones synthesis in domestic mammals. *Vet. stn.* 49, 425–438. (In Croatian).
- GINTHER, O. J., D. R. BERGFELT, L. J. KULICK and K. KOT (2000): Selection of dominant follicles in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.* 63, 383–389.
- HARTMANN, S., M. LACORN and H. STEINHART (1998): Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 62, 7–20.
- HEITZMAN, R. J. (1994): *Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products : Reference Materials and Methods.* Oxford: Blackwell science.
- 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 and 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 and O. ADEYEMO (2006): Ovarian morphology and estradiol 17-beta concentrations in serum and follicular fluid of slaughtered zebu cattle in Ibdan, Nigeria. *Vet. arhiv* 76, 403–411.
- PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ i N. VAHČIĆ (2013): 17β-estradiol u govedim mesu, mlijeku i krvi : Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44–49.
- PLEADIN, J., N. PERŠI, B. ANTOLOVIĆ, B. ŠIMIĆ i I. KMETIĆ (2011): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 48–56.
- PLEADIN, J. i T. BOGDANOVIĆ (2017): Anabolici u proizvodnji mesa - učinci u farmskih životinja i opasnosti po zdravlje potrošača. *Meso* 19, 59–67.
- PLEADIN, J. and M. SAMARDŽIJA (2019): Hormonally active substances in the food chain from farm animals to consumers. *Vet. stn.* 50, 501–512.
- SAMARDŽIJA, M., B. VUDRAG i J. PLEADIN (2015): Spolni hormoni u farmskih životinja: fiziološke razine, terapijska i anabolička primjena. *Vet. stn.* 46, 281–293.
- SAMARDŽIJA, M., N. KRALJ i J. PLEADIN (2016): Estrogeni u hrani životinjskog podrijetla i utjecaj na ljudsko zdravlje. *Vet. stn.* 47, 513–521.
- SAMARDŽIJA, M., A. JELIČIĆ, M. MITAK and J. PLEADIN (2017): Oestrogen effects of zearelenon in farm animals and risks for human and animal health. *Vet. stn.* 48, 109–118. (In Croatian).
- SAMARDŽIJA, M., T. MAGAŠ, L. RADMANIĆ i J. PLEADIN (2018): The use of testosterone in domestic animals – therapeutic and anabolic activities. *Vet. stn.* 49, 287–296. (In Croatian).
- STEPHANY, R. W. (2010): Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handb. Exp. Pharmacol.* 195, 355–367.

27. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ i M. SAMARDŽIJA (2007): Reproduction of cows and heifers. (M. Samardžija et al., eds.). University textbook. Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia. (In Croatian).
28. TURK, R., I. JUKIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. ROBIĆ and M. BELIĆ (2017): Neuro-hormonal regulation of stress response and its impact on immunity of domestic animals. *Vet. stn.* 48, 305–315. (In Croatian).
29. WOLFENSON, D., Z. ROTH and R. MEDIAN (2000): Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspect. *Anim. Reprod. Sci.* 61, 535–547.
30. WOZNIAK, B., S. WITEK, I. MATRASZEK-ZUCHOWSKA, A. KLOPOT, and A. POSYNIK (2016): Levels of the natural hormones 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone in serum of cattle: results from population studies in Poland. *J. Vet. Res.* 60, 461–466.
31. ŽURA ŽAJA, I., A. SLUGANOVIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. MILINKOVIĆ-TUR, T. DOBRANIĆ, S. STRELEC, Đ. ĐURIČIĆ, H. VALPOTIĆ and S. VINCE (2019): The effects of oxidative stress on the male reproductive system and mechanisms of antioxidant protection. *Vet. stn.* 50, 43–54. (In Croatian).

## Variations in the concentration of 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone levels in calves of different sex, age, breed and farm origin

Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Ines GULIĆ, DVM, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Veterinary Practice Đurđevac, Croatia; Nina KUDUMIJA, BSc, PhD, Assistant, Miroslav BENIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Scientific Advisor in Tenure, Associate Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Physiological levels of the sex hormones 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone vary based on animal species, age, sex, breed, rearing technology, nutrition, stress and environmental factors. These hormones are essential for growth and development, and for sexual maturity and reproductive function. Due to their anabolic effects, they have been used as growth promoters in intensive livestock production, applied in feed or as an implant. However, due to their toxic, mutagenic, teratogenic and cancerogenic effects in animals and humans, their use is now banned in food animal production. Today, the use of these natural hormones is permitted exclusively for therapeutic purposes in the treatment of reproductive and pregnancy disorders. Considering the constant development of new synthetic substances that might have anabolic effects and their possible misuse, it is necessary to perform regular controls during the fattening period to determine the physiological values of the levels of these hormones. Accordingly, the aim of this study was to investigate the physiological levels of the natural hormones 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone in the blood of calves of different sex, age, breed and farm origin in the Republic of Croatia. For this purpose, 32 calves of both sexes (5 males

and 27 females), aged 2-5 months, of different breeds and categories (13 calves of Simmental breed, 2 calves of meat breed and 17 calves of Holstein breed) were randomly selected from three farms for inclusion in this study. During general clinical examination by an authorized veterinarian, no visible clinical changes or conditions were observed that could influence the physiological levels of the investigated hormones. The average level of 17 $\beta$ -oestradiol was 28.83 $\pm$ 10.95 ng/L. The concentration of testosterone was lower than the detection limit of the analytical method applied in 24 samples of calf plasma. In eight samples in which this hormone was detected, the average concentration was 126.7 $\pm$ 167.5 ng/L, indicating wide variability in the levels of this hormone. A statistically significant difference was determined only for 17 $\beta$ -oestradiol, taking into account the composition of breeds tested ( $P < 0.05$ ). Considering that the established concentrations of the analysed hormones were consistent with the physiological concentrations recorded in the literature, any suspected illegal use of anabolic agents in the examined calves is excluded.

**Key words:** 17 $\beta$ -oestradiol; testosterone; physiological levels