

# Primjena testosterona u domaćih životinja - terapijsko i anaboličko djelovanje



Marko Samardžija, Tea Magaš, Luka Radmanić i Jelka Pleadin\*

## Uvod

Endokrini hormoni predstavljaju kemijske tvari koje žlijezde ili specijalizirane stanice otpuštaju u krvotok, utječući potom na brojne funkcije u ljudskom i životinjskom organizmu. Mogu djelovati generalizirano na cijeli organizam ili specijalizirano samo na tkiva koja posjeduju njihove receptore. Različiti hormonski sustavi imaju ključnu ulogu u regulaciji gotovo svih tjelesnih funkcija kao što su: metabolizam, rast i razvoj, ravnoteža vode i elektrolita, razmnožavanje i ponašanje (Guyton i Hall, 2006.). Obzirom na njihovu kemijsku strukturu, kao i fiziološku aktivnost, mogu se razvrstati u četiri skupine: androgeni, estrogeni, progestini i relaksini (Dukes, 1975.). Pod nazivom „prirodni spolni hormoni“ podrazumijevaju se tvari steroidne građe koje primarno sintetiziraju spolne žlijezde, pri čemu spominjemo tri najvažnija spolna hormona i to: 17 $\beta$ -estradiol, progesteron i testosteron. Ove su tvari uključene u endokrinu regulaciju rasta te razvoj primarnih i sekundarnih spolnih karakteristika u životinja i ljudi. Odavno je poznato da se spolni hormoni mogu

izlučivati i iz drugih tkiva, osim spolnih žlijezda te da osim reproduktivnih imaju i brojne druge učinke u organizmu (Griffin i Wilson, 1998., Meyer, 2001., Samardžija i sur., 2015.).

Vrijednosti fizioloških razina spolnih hormona u domaćih životinja, variraju ovisno o brojnim čimbenicima, poput: vrste, pasmine, spola, dobi, spolne zrelosti te uvjeta uzgoja te je vrlo teško ustvrditi standardne fiziološke razine hormona (Heitzman, 1994., Schilt i sur., 1996.). Razina spolnih hormona je, dakle, različita, na što mogu utjecati i brojne biljne vrste (npr. izoflavoni, laktoni rezorcilne kiseline, kumestani), odnosno metaboliti koji se nalaze u hrani za životinje koja se koristi u hranidbi farmskih životinja (Barnes, 2010.). Egzogeno primjena prirodnih spolnih hormona u domaćih životinja ima stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva. Zbog brojnih toksičnih učinaka potrošača zbog konzumacije kontaminiranih proizvoda te moguće zlouporabe u anaboličke svrhe, nameće se potreba za provođenjem sustavnog nadzora i

Dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Tea MAGAŠ, dr. med. vet., Zagreb, Hrvatska; Luka RADMANIĆ, dr. med. vet., asistent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Jelka PLEADIN\*, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, izvanredna profesorica, (dopisni autor, e-mail: pleadin@veinst.hr), Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

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).

Testosteron je najvažniji prirodni androgen, uz androsteron i dihidroandrosteron, a primarno predstavlja muški spolni hormon. Pod pojmom „androgeni hormoni“ podrazumijevaju se svi steroidni hormoni koji imaju maskulinizirajući učinak, a tu, osim prije navedenih, spadaju još i hormoni sintetizirani drugdje u tijelu, osim u testisima (Guyton i Hall, 2006.). Glavna uloga testostona je stimulacija i razvoj muških spolnih žlijezda i spolnih karakteristika, povećanje libida i sinteza proteina, a samim time podupire i rast kostiju i mišića te utječe i na ponašanje (Griffin i Wilson, 1998., Cergolj i Samardžija, 2006.). Slično androgeno djelovanje kao i testosteron ima androsteron, hormon nuzbubrežne žlijezde. Androgeni kore nuzbubrežne žlijezde usko su povezani s funkcijom spolnih žlijezda, iako prema nekim autorima taj odnos do danas nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da zbog činjenice što nuzbubreg neprekidno izlučuje znatnu količinu androgenih tvari, one mogu biti preteča iz kojih testisi sintetiziraju testosteron (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Ovaj rad daje pregled svojstava, mehanizma djelovanja, fizioloških razina te uporabe spolnih hormona u terapijske i anaboličke svrhe u domaćih životinja, s naglaskom na testosteron.

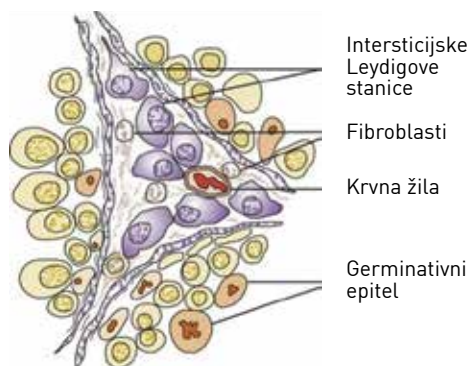
## Izlučivanje testosterona

Testisi izlučuju nekoliko muških androgenih spolnih hormona, a među kojima su testosteron, dihidrotestosteron i androstendion. Količina testosterona znatno je veća od količine ostalih

hormona da testosteron možemo smatrati glavnim hormonom testisa, premda se velik dio testosterona u ciljnim tkivima konačno pretvara u još aktivniji hormon, dihidrotestosteron. Nadzor nad spolnim funkcijama u oba spola počinje izlučivanjem hormona koji oslobađa gonadotropine (GnRH) iz hipotalamusa. Taj hormon potiče prednji režanj hipofize, tj. adenohipofizu na izlučivanje gonadotropnih hormona, odnosno luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). Riječ je o glikoproteinima koji na ciljna tkiva u testisima djeluju uglavnom tako što aktiviraju sustav drugog glasnika cAMP, a on u tim ciljnim stanicama aktivira specifične enzimatske sustave. Intersticijske Leydigove stanice (slika 1.) testisa testosteron izlučuju samo kada ih na to potakne LH iz adenohipofize.

Testosteron, izlučen iz testisa kao odgovor na LH, povratnom spregom spriječava izlučivanje LH iz adenohipofize. Najveći dio inhibicije je posljedica izravnog učinka testosterona na hipotalamus, kojim se smanjuje izlučivanje GnRH. Taj učinak zatim smanjuje izlučivanje LH iz adenohipofize, što u konačnici rezultira i manjim izlučivanjem testosterona u testisima. Dakle, nakon izlučivanja većih količina testosterona, negativna povratna sprega, djelujući preko hipotalamusa i adenohipofize, smanjuje izlučivanje testosterona na fiziološku razinu. Suprotno tome, manjak testosterona omogućava izlučivanje velikih količina GnRH iz hipotalamusa, čime se povećava izlučivanje gonadotropnih hormona pa i testosterona iz testisa (Guyton i Hall, 2017.). Unatoč tome i brojni psihološki faktori mogu utjecati na izlučivanje GnRH u hipotalamusu pa tako mogu posredno imati utjecaj na brojne seksualne i reproduktivne funkcije u mužjaka ili ženki. Smatra se da transport mužjaka u lošim uvjetima smanjuje njegovu plodnost (Guyton i Hall, 2006.).

Leydigove stanice smještene su u intersticiju između sjemenih kanalića i tvore oko 20% adultnog testisa. Leydigovih stanica gotovo i nema u mladim životinja, dakle onda kad testisi praktički ne izlučuju testosteron, ali ih mnogo ima kada nastupi faza spolne zrelosti te u odraslih jedinki. Smatra se da se testosteron počinje izlučivati već u sedmom tjednu embrionalnog razvoja, a u to vrijeme izlučuje ga genitalni greben koji isto tako u ženskih životinja izlučuje estrogene. Njegovo izlučivanje je pod utjecajem gonadotropnih hormona hipofize. U obje životne dobi testisi izlučuju velike količine testosterona. Također, razvojem tumora koji potječu iz Leydigovih stanica, izlučuju se velike količine testosterona. Konačno, kad se zametni epitel testisa uništi izlaganjem rendgenskom zračenju ili pretjeranoj toplini, otpornije Leydigove stanice često nastavljaju stvarati testosteron (Guyton i Hall, 2017.). Testosteron se u manjoj mjeri izlučuje i u ženskih jedinki, gdje ga izlučuju granulosa stanice jajnika te nadbubrežne žlijezde u oba spola. U krvi se veže za  $\beta$ -globulin (engl. *SHBG-sex hormone binding globulin*) i albumin te je samo oko 2% ovog hormona u slobodnom obliku. Svoju fiziološku ulogu ostvaruju tako što utječu na



**Slika 1.** Intersticijske Leydigove stanice koje izlučuje testosteron smještene u intersticiju između sjemenih kanalića [Guyton i Hall, 2011.]

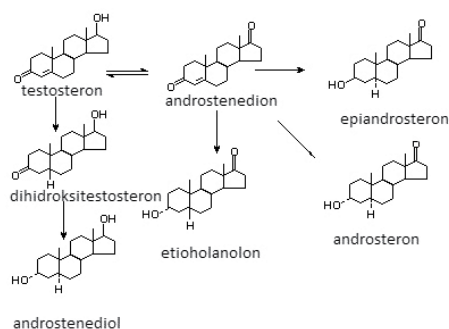
razvoj primarnih i sekundarnih spolnih karakteristika mužjaka, ali djeluju i na intermedijarni metabolizam (Božić, 2012.).

## Metabolizam testosterona

Testosteron ulazi u ciljane stanice već nekoliko minuta nakon što se izluči. Nakon izlučivanja iz testisa oko 97% testosterona slabom se vezom veže za albumine iz plazme ili se čvršće veže za beta-globulin te globulin, koji ima ulogu vezivanja spolnih hormona. U tom obliku testosteron cirkulira u krvi od 30 minuta do nekoliko sati, a za to vrijeme se ili prenose u tkiva ili razgradi u neaktivne proizvode koji se izlučuju. Djelovanjem staničnog enzima  $5\alpha$ -reduktaze se pretvara u dihidrotestosteron, koji se veže za receptorsku bjelančevinu u citoplazmi (Guyton i Hall, 2017.). Taj kompleks odlazi u staničnu jezgru gdje se veže s bjelančevinom jezgre i potiče proces transkripcije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u ribonukleinsku kiselinu (RNK). Tijekom 30 minuta aktivira se RNK-polimeraza pa se u stanicama počinje povećavati koncentracija RNK, a zatim i koncentracija staničnih bjelančevina. U žlijezdi se poslije nekoliko dana poveća i količina DNK, a istodobno se poveća i broj stanica u ciljnom tkivu. Testosteron, koji nije vezan za tkiva, brzo se pretvori, uglavnom u jetri, u androsteron i dehidroepiandrosteron, a istodobno se konjugira u glukuronide ili sulfate (pretežno u glukuronide), koji se izlučuju preko žuči u crijevo ili preko bubrega u mokraću (Guyton i Hall, 2017.). Na slici 2. prikazan je metabolički put testosterona.

## Učinci u organizmu

Većina je učinaka testosterona posljedica povećanog stvaranja bjelančevina u ciljnim stanicama.



**Slika 2.** Metabolički put testosterona (Anonymous, 2015.)

Testosteron potiče stvaranje bjelančevina gotovo u cijelom tijelu, premda s više specifičnosti povećava količinu onih bjelančevina u ciljnim organima ili tkivima koje su odgovorne za razvoj primarnih i sekundarnih muških spolnih osobina. Jedna od glavnih funkcionalnih razlika između ženskih i muških spolnih kromosoma zapravo je u tome što muški spolni kromosom ima SRY-gen (engl. *sex-determining region Y gene*), koji kodira bjelančevinu nazvanu čimbenik koji određuje razvoj testisa (SRY-protein). Ta bjelančevina potiče slijed genskih aktivacija koje prouzroče diferencijaciju spolnog nabora u stanice koje izlučuju testosteron i od kojih konačno nastaju testisi. Ženski kromosom prouzroči diferencijaciju nabora u stanicama koje izlučuju estrogene. Ako se gravidnoj ženki ubrizga velika količina muškog spolnog hormona u fetusima će se razviti muški spolni organi i ako su fetusi ženski. Uklone li se muškom fetusu u početnom razvojnom stadiju testisi, razvit će se ženski spolni organi. Prema tome, testosteron što ga izlučuju najprije genitalni nabori, a kasnije testisi fetusa, prouzroči razvoj muških spolnih osobina, uključujući stvaranje penisa, skrotuma, prostate, sjemenih mjehurića i muških spolnih kanala te istodobno potiskuje stvaranje ženskih spolnih organa

(Guyton i Hall, 2017.). Testisi se obično tijekom posljednjih mjeseci gravidnosti spuštaju u skrotum, odnosno u vrijeme kad počinju izlučivati priličnu količinu testosterona (Cergolj i Samardžija, 2006.). U muških jedinki rođenih s testisima koji se nisu spustili, ali su inače normalni, davanje testosterona obično prouzroči normalno spuštanje testisa, ako su ingvinalni kanali dostatno široki za prolazak testisa. Davanje gonadotropnih hormona koji potiču Leydigove stanice u testisu novorođenčeta na stvaranje testosterona može prouzročiti spuštanje testisa. Prema tome, poticaj za spuštanje testisa je testosteron, što je još jedan dokaz da je taj hormon tijekom fetalnog života važan za razvoj muških spolnih osobina (Guyton i Hall, 2017.).

Testosteron zadebljava kožu cijelog tijela, a potkožno tkivo postaje grublje. Pojačava i sekreciju nekih, a možda i svih žlijezda lojnica. U ljudi može prouzročiti nastanak akni na licu. Odgovoran je i za rast i raspodjelu dlaka po tijelu (Cergolj i Samardžija, 2006., Guyton i Hall, 2017.). Jedan od najvažnijih učinaka testosterona je jačanje razvoja mišića pa se mišićna masa u muških jedinki povećava u prosjeku 50% više od mišićne mase u ženki. Istodobno se i u drugim dijelovima tijela povećava količina bjelančevina. Mnoge promjene na koži nastaju upravo zbog odlaganja bjelančevinu u kožu. Zbog znatnijeg povećanja koncentracije testosterona, kosti izrazito zadebljavaju i u njima se odlažu znatne količine kalcijevih soli. Dakle, testosteron povećava ukupnu količinu koštanog tkiva i prouzroči zadržavanje kalcija. Vjeruje se da je povećanje koštanog tkiva posljedica općeg anaboličkog učinka testosterona na bjelančevine te odlaganja kalcijevih soli, što je odgovor na povećanu količinu bjelančevina. Specifično djeluje i na zdjelicu tako što sužava zdjelični izlaz, produžuje zdjelicu, čini je ljevkastom i znatno povećava čvrstoću cijele zdjelice;

omogućuje i spajanje epifiza i dijafiza dugih kostiju. Kada se u mladih jedinki izlučuju velike količine hormona, rast kostiju znatno se ubrza pa se ubrza i rast cijelog tijela (Guyton i Hall, 2017.).

Ubrizgavanjem velikih količina testosterona intenzitet bazalnog metabolizma može se povećati i za 15%. Smatra se da i normalna količina testosterona što se izlučuje u ranijoj dobi iz testisa povećava intenzitet metabolizma za 5 do 10% iznad vrijednosti koja bi postojala bez aktivnosti testisa. Povećanje intenziteta vjerojatno je neizravna posljedica učinka testosterona na anabolizam bjelančevina, jer povećana količina bjelančevina, osobito enzima i pojačava aktivnost svih stanica. Unatoč izrazitoj povezanosti testosterona s povećanjem hematokrita, čini se da testosteron ne povećava izravno razinu eritropoetina te da nema izravnog učinka na proizvodnju eritrocita. Učinak testosterona na povećano stvaranje eritrocita mogao bi barem dijelom biti posredna posljedica povećanja intenziteta metabolizma, koje nastaje poslije ubrizgavanja testosterona, a može povećati i reapsorpciju natrija u distalnim bubrenjnim kanalčićima (Guyton i Hall, 2017.). Testosteron čini mužjake agresivnima, ali i izaziva

posebne oblike ponašanja vezane za privlačenje ženki, što može biti praćeno posebnim načinom oglašavanja (pjesma slavuja, rika jelena i sl.), a stimuliraju i libido i utječu na povećanu sekreciju feromona (Božić, 2012.).

## Fiziološke razine u domaćih životinja

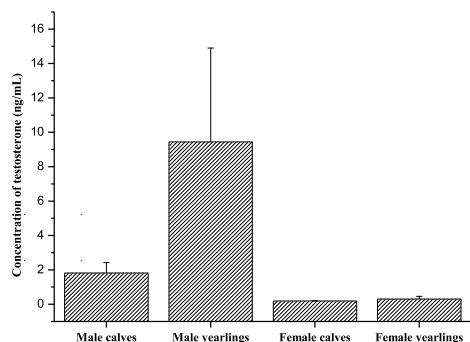
Fiziološke razine spolnih hormona u tjelesnim tekućinama te tkivima životinja općenito ovise o: vrsti, pasmini, spolu i dobi (Heitzman, 1994.). Zanimljiva je činjenica da steroidni hormoni prelaze iz krvi u mlijeko, a razina prijenosa ovisi o brojnim čimbenicima, kao što je primjerice vrsta sisavaca, hormona, koncentracija hormona u krvi, molekularna masa, relativna topljivost u vodi i lipidnoj fazi te tjelesnim tekućinama, ali i o nekim drugim svojstvima. U primjeni prirodnih hormona, ujedno i testosterona, na farmskim životinjama svakako je potrebno uzeti u obzir njihovu fiziološku razinu, kao i činjenicu da takve razine variraju (Samardžija i sur., 2015.). Prema literaturnim podatcima može se uvidjeti da je razina testosterona karakteristična

**Tabela 1.** Koncentracija testosterona u jestivim tkivima domaćih životinja (Hoffman i Evers, 1986., Samardžija i sur., 2015.).

Vrsta životinje	Tkivo	Koncentracija testosterona (pg/g)
Tele	mišić	70
	jetra	47
	bubreg	685
	mast	340
Bik	mišić	335
	jetra	749
	bubreg	2783
	mast	10950
Junica	mišić	92
	jetra	193
	bubreg	595
	mast	250

značajno ovisna o dobi životinje i kreće se u muške i ženske junadi do 0,1 ng/mL, a u bikova do 20 ng/mL. Ukoliko su razine više od navedenih, takve razine upućuju na zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe (Hoffman i Evers, 1986.). U tabeli 1 prikazane su koncentracije testosterona u jestivim tkivima domaćih životinja.

Pleadin i sur. (2011.a) u istraživanju anaboličkog korištenja steroida određivali su razine prirodnih hormona, 17 $\beta$ -estradiola, progesterona i testosterona u plazmi goveda različite dobi i spola. Razine prirodnih hormona utvrđene su pomoću kvantitativne ELISA metode u uzorcima plazme goveda različitih pasmina s nekoliko farmi u Hrvatskoj tijekom 2006.-2009. godine. Razine hormona bile su statistički značajno više u plazmi jednogodišnjih grla u odnosu na plazmu teladi ( $p < 0,05$ ). Najviša razina testosterona ( $9,44 \pm 5,47$  ng/mL) određena je u plazmi jednogodišnjih muških grla goveda. Rezultati su pokazali da razine spolnih hormona, ujedno i testosterona, variraju ovisno o dobi i spolu životinja, ukazujući da ne postoji sumnja o ilegalnoj uporabi anaboličkih supstanci u niti jedne od analiziranih životinja. Na slici 3. prikazane su vrijednosti koncentracije testosterona određene u goveđoj plazmi u istraživanju Pleadin i sur. (2011.b).



**Slika 3.** Koncentracija testosterona u goveđoj plazmi [Pleadin i sur., 2011.b]

## Terapijska i anabolička primjena u domaćih životinja

Spolni se hormoni općenito koriste u liječenju životinja. Njihova primjena u stočarskoj industriji kao pospješivača rasta, odnosno tvari s anaboličkim učinkom, prouzročila je brojne polemike i sudske postupke diljem svijeta, a najviše u zemljama EU gdje je primjena spolnih hormona u anaboličke svrhe potpuno zabranjena. Primjena spolnih hormona u veterinarskoj praksi danas je u EU dopuštena samo u terapijske svrhe i to kod poremećaja oplodnje ili tijekom gravidnosti. Uporabom hormona općenito se tijekom uzgoja farmskih životinja dobiva meso boljih organoleptičkih svojstava, odnosno meso s većim udjelom mišićnog tkiva te manjim udjelom masnog tkiva i to uz ostvarenje ubrzanijeg i većeg rasta te prinosa u proizvodnji mesa (Pleadin i sur., 2011.a).

Prema nekadašnjim protokolima uporaba hormona u teladi započinjala je pri tjelesnoj težini od oko 65 kg. Implantati od 20 mg 17 $\beta$ -estradiola i 200 mg progesterona u muške teladi te 20 mg 17 $\beta$ -estradiola i 200 mg testosterona u ženske teladi, rezultirali su s većim zadržavanjem dušika od 21% i većem dnevnom prirastu od 20%. Zadržavanje dušika povećano je za oko 70% u mlađe teladi te se postupno smanjuje na ispod 40% u dobi od oko 15 tjedana. U dobi od 10-15 tjedana prosječna konverzija hrane u bjelančevine mesa je oko 40%, a hormonskim tretmanom konverzija se može povećati do oko 60% (Meyer, 2001.).

Primjena testosterona u medicini je vrlo slična primjeni progesterona, koji je nakon peroralne primjene uglavnom nedjelotvoran. Razlog tome je, jer testosteron zbog brze konjugacije i metaboličke transformacije u jetri ima slabu bioiskoristivost. Testosteron se općenito najčešće primjenjivao u kombinaciji sa 17 $\beta$ -estradiolom (Pleadin i sur., 2013.). Koristio se u stočarskoj

proizvodnji u obliku subkutanih ušnih implantata da bi se povećao rast životinja i iskoristivost hrane. Razlog parenteralne primjene je činjenica da nakon takve primjene, zbog brze konjugacije i metaboličke transformacije u jetri, testosteron ima slabu bioiskoristivost, slično kao i progesteron i  $17\beta$ -estradiol te ga se primjenjuje u obliku supkutanih implantata. Primjena isključivo testosterona u domaćih životinja je vrlo rijetka, a opisani su samo pojedini slučajevi liječenja kod mišićne slabosti, slabog apetita i nedostatka natjecateljskog duha kastriranih konja te kod deficijencije testosterona u kastrata. Poznata je uporaba i u kobilama koje se prečesto tjeraju (Samardžija i sur., 2015.). Istraživanja su pokazala da pojava tumora i drugih promjena u životinja koje su bile tretirane testosteronom ima isključivu vezu s njegovim hormonskim djelovanjem. U kombinaciji sa  $17\beta$ -estradiolom ima kancerogeno djelovanje i može prouzročiti mutacije gena u teladi (Toffolatti i sur., 2006.).

Istraživanja su pokazala da, ukoliko se spolni hormoni, a ujedno i testosteron, primjenjuju na životinjama i to u propisanoj terapijskoj dozi, njihovi ostatci u mesu su niski stoga ne predstavljaju nikakvu opasnost za zdravlje potrošača (Pleadin i sur., 2011.a). Njihov utjecaj na fiziološke procese u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu (Andersson i Skakkebaek, 1999.). Da bi se ustvrdila ilegalna primjena prirodnih ili sintetičkih hormonskih pripravaka u farmaskih životinja potrebno je poznavati fiziološke razine spolnih hormona u životinja. No, budući da se spolni hormoni fiziološki nalaze u organizmu, a njihova količina varira u ovisnosti o brojnim čimbenicima, prisutnost u tkivima i tekućinama ne upućuje odmah na ilegalnu uporabu u farmaskih životinja. Stoga se u cilju valjane prosudbe provode brojna istraživanja o fiziološkim razinama hormona u

različitih životinjskih vrsta i u ovisnosti o brojnim čimbenicima (Pleadin i sur., 2011.a,b). Podatci pokazuju da je plazma najpouzdaniji matriks u detekciji razine hormona, ujedno i njihove terapijske primjene ili zlorabuse u anaboličke svrhe, s vrlo niskim limitima detekcije hormona, ujedno i testosterona stoga i predstavlja uobičajeni matriks nadzora (Scippo i sur., 1994., Pleadin i sur., 2011.a).

## Zakonodavstvo i analitičke metode

S obzirom na moguće štetno djelovanje na zdravlje ljudi, u EU je od 1988. godine Direktivom Vijeća 88/146/EEC zabranjeno korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak radi njihova anaboličkog djelovanja u farmaskih konzumnih životinja (Heitzman, 1994.). S druge strane uporaba prirodnih steroidnih hormona u terapijske svrhe je ograničena i to kod poremećaja u reprodukciji, točnije tijekom gravidnosti. Da bi se spriječila zloraba spolnih hormona poglavito u anaboličke svrhe, potrebno je provođenje monitoringa, odnosno kontrola ostataka ovih tvari u biološkom materijalu farmaskih životinja. U Republici Hrvatskoj je nadzor zlorabuse hormona u svim fazama proizvodnje namirnica životinjskog podrijetla reguliran Državnim programom monitoringa rezidua (DPMR) propisanog od strane Ministarstva poljoprivrede te Uredbom Komisije (EU) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. godine o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla, odnosno Prilogom Uredbe Farmakološki djelatne tvari i njihova klasifikacija u odnosu na najviše dopuštene količine (NDK) te Naredbom o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmaskim

životinjama (N.N. 51/2013). Analize spolnih hormona, ujedno i testosterona, provode se sukladno odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. 2/2005) te se rezultati analiza u ovisnosti o ispitivanom parametru uspoređuju s njihovim poznatim fiziološkim razinama (Pleadin i sur., 2009.).

O primjeni analitičkih metoda potrebno je naglasiti kako od *screening* metoda u najvećoj je uporabi imunoenzimska metoda (engl. ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*), kao i radioimunoenzimska metoda (engl. RIA - *radioimmunoassay*). ELISA znatno ubrzava broj analiziranih uzoraka te ima jednostavnu pripremu uzoraka. Prihvatljivija je i ekološki s obzirom da smanjuje uporabu organskih otapala. S druge strane ista je prihvatljiva i gospodarski i to iz razloga što snižava cijenu korištenja. Nedostatak metode je da daje informaciju o prisustvu analita, ali ne i o njegovim biokemijskim svojstvima, kao npr. molekularna težina. Istraživanja su pokazala da kvaliteta ELISA kitova može varirati od proizvođača do proizvođača. Međutim, *screening* metode mogu rezultirati s lažno pozitivnim rezultatima te je stoga potrebno na onim uzorcima kojima je metodom dobiven povišen rezultat provesti i potvrdnu metodu, koja će omogućiti selektivno određivanje tvari (Pleadin i sur., 2009.). Kao prikladne potvrđne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućuju selektivno određivanje ostataka anabolika, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spektrometrijom masa (MS), odnosno tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom. LC/MS/MS tehnika ima najznačajniju primjenu u analizama ostataka tvari s anaboličkim učinkom i ima prednost u odnosu na

plinsku kromatografiju jer ne zahtijeva derivatizacijski korak prije analize (Pleadin i sur., 2011.a).

## Zaključna razmatranja

Spolni hormoni poput testosterona se prirodno sintetiziraju u organizmu kao tvari steroidne strukture. Imaju čitav niz vrlo bitnih funkcija u organizmu, kako životinjskom tako i ljudskom. Osim odlika spolnih karakteristika, spolni hormoni utječu i na još nekoliko bitnih segmenata te se stoga upotrebljavaju u terapijske svrhe za potrebe liječenja bolesti reproduktivnog sustava. S druge strane, uporaba u domaćih životinja za poboljšanje rasta radi financijske dobiti, odnosno u anaboličke svrhe, u EU nije odobrena s obzirom da mogu negativno djelovati, ne samo na životinje, nego i na ljude kao konzumenata hrane životinjskog podrijetla. Naime, dugotrajno korištenje ovih tvari ima: toksične, mutagene, teratogene i karcinogene učinke u životinja, a kao posljedica primjene ovih tvari u životinjskim tkivima kumuliraju se rezidue. Rezidue ovih tvari eliminiraju se putem tjelesnih tekućina, uključujući i mlijeko. Potrošači time mogu biti izloženi ovim tvarima konzumirajući namirnice životinjskog podrijetla (meso, jaja, mlijeko), s tim da u ljudi ove tvari mogu prouzročiti još veći broj nuspojava i štetnih posljedica po zdravlje ljudi i životinja. Stoga je opravdana zabrana njihova korištenja u anaboličke svrhe, a nužno je i provođenje monitoringa, odnosno sustavne kontrole njegovih ostataka u biološkom materijalu farmskih životinja, prouzročenom za vrijeme tova životinja te na liniji klanja. Osim nadležnih tijela, vrlo bitnu ulogu u nadzoru primjene spolnih hormona, ujedno i testosterona, imaju i veterinarske službe te referentni laboratoriji. U cilju utemeljene procjene zlouporabe hormona potrebno je provoditi daljnja istraživanja ovih tvari i njihovih metabolita, budući



da i metaboliti u organizmu imaju biološku aktivnost. U budućnosti je potrebno pronaći alternativna rješenja za terapijsku primjenu hormona u farmских životinja, a sustavi kontrole trebaju biti vrlo učinkoviti kako bi se isključila mogućnost njihove zlouporabe u anaboličke svrhe.

## Sažetak

Spolni hormoni, poput testosterona, su tvari koje sintetiziraju spolne žlijezde. Riječ je o tvarima koje su uključene u endokrinu regulaciju rasta, kao i u razvoj spolnih karakteristika, kako u životinjskom, tako i u ljudskom organizmu. Spolni hormoni imaju čitav niz vrlo bitnih funkcija u organizmu. Osim na razvoj spolnih karakteristika, spolni hormoni mogu utjecati i na još nekoliko bitnih segmenata, poput rasta te se stoga upotrebljavaju u terapijske i anaboličke svrhe. Postoje četiri skupine spolnih hormona i to: androgeni, estrogeni, gestageni te relaksini. Cilj ovog rada je dati pregled literature o uporabi spolnih hormona u terapijske i anaboličke svrhe s naglaskom na testosteron. Naime, testosteron je najvažniji prirodni androgen koji se izlučuje u testisima te stimulira razvoj muških spolnih žlijezda te spolnih karakteristika, a najčešće se koristi u kombinaciji sa  $17\beta$ -estradiolom. U radu se posebno ističe negativno djelovanje testosterona koji pri medicinski neopravdanoj uporabi može prouzročiti i mutacije gena te pojavu tumora. Što se tiče uporabe u terapijske svrhe, spolni hormoni, uključujući testosteron, mogu se opravdano koristiti kako bi se prevenirali i smanjili zdravstveni problemi u reproduktivnom sustavu. S druge strane, njihova neprimjerena uporaba u cilju poboljšanja rasta i ostvarivanja financijske dobiti, odnosno u anaboličke svrhe, nije legalna s obzirom da mogu negativno djelovati ne samo na životinje, nego i na ljude kao konzumenta hrane životinjskog podrijetla. Slijedom toga, u proizvodnji konzumnih životinja zakonom je regulirana uporaba spolnih hormona, uključujući i testosteron. Osim nadležnih tijela vrlo bitnu ulogu u nadzoru ovih tvari, imaju i veterinarske službe i referentni laboratoriji. U budućnosti je potrebno pronaći alternativna rješenja za terapijsku primjenu hormona u farmских životinja, a sustavi kontrole trebaju biti vrlo

učinkoviti kako bi se isključila mogućnost zlouporabe ovih tvari u anaboličke svrhe.

**Ključne riječi:** spolni hormoni, testosteron, terapijsko djelovanje, anaboličko djelovanje

## Popis literature

- ANDERSSON, A.-M. and N. E. SKAKKEBAEK (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur. J. Endocrinol.* 140, 477-485.
- Anon. (2015): <http://veterina.com.hr/wp-content/uploads/2015/09/slika01-spolni-hormoni-u-farmskih-zivotinja.png>
- BARNES, S. (2010): The biochemistry, chemistry and psychology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Res. Biol.* 8, 89-98.
- BOŽIĆ, T. (2012): Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, str. 398-399.
- CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinary andrology. (M. Samardžija, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska. (In Croatian).
- Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal orthostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/229/EEC. *Official Journal of the European Union: Legis.* L125, 3.
- DUKES, H. (1975): Djuksova fiziologija domaćih životinja. Svjetlost, izdavačko poduzeće, Sarajevo, 8. izdanje, str. 1237-1245.
- GRIFFIN, J. E. and J. D. WILSON (1998): Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> ed., (ed.) Wilson, J. D. et al., W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 819-876.
- GUYTON, A. C. i J. E. HALL (2006): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 11. izdanje, str. 1016-1018.
- GUYTON, A. C. and J. E. HALL (2011): *Textbook of medical physiology*. (ed.) Hall, J. E., 12<sup>th</sup> edition, Philadelphia, Saunders.
- GUYTON, A. C. and 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. and P. EVERS (1986): Anabolic agents with sex-hormone-like activities: problems of residues. In: *Drug Residues in Animals*. Rico, A. G. (ed.), Academic Press, New York, pp. 111-146.
- MEYER, H. H. D. (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.* 109, 1-8.
- Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmским životinjama. Ministarstvo poljoprivrede (NN 51/2013).

16. PLEADIN, J., A. VULIĆ i N. PERŠI (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. *Meso* 11, 360-365.
17. PLEADIN, J., N. PERŠI, B. ANTOLOVIĆ, B. ŠIMIĆ i I. KMETIĆ (2011a): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 48-56.
18. PLEADIN, J., S. TERZIĆ, N. PERŠI and A. VULIĆ (2011b): Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. *Biotechnol. Anim. Husband.* 27, 147-159.
19. PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ i N. VAHČIĆ (2013): 17 $\beta$ -estradiol u govedem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44-49.
20. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede (NN 02/2005).
21. SAMARDŽIJA, M., B. VUDRAG i J. PLEADIN (2015): Spolni hormoni u farmskih životinja: fiziološke razine, terapijska i anabolička primjena. *Vet. stn.* 46, 281-293.
22. SCHILT, R., R. W. STEPHANY, C. J. M. ARTS and L. M. H. FRIJNS (1996): Estradiol levels in urine of veal calves as indicator of treatment: Possibility or fiction? *Euroresidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food.* Veldhoven, The Netherlands.
23. SCIPPO, M. L., G. DEGAND, A. DUJCKAERTS and G. MAGHUIN-ROGISTER (1994): Control of the illegal administration of natural steroid hormones in plasma of bulls and heifers. *Analyst.* 119, 2639-2644.
24. TOFFOLATTI, L., G. L. ROSA, T. PATARNELLO, C. ROMUALDI, R. MERLANTI, C. MONTESISSA, L. POPPI, M. CASTAGNARO and L. BARGELLONI (2006): Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones. *Domest. Anim. Endocrin.* 30, 38-55.
25. Uredba Komisije (EZ) o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (NN 37/2010).

## The use of testosterone in domestic animals - therapeutic and anabolic activities

Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia; Tea MAGAŠ, DVM, Zagreb, Croatia; Luka RADMANIĆ, DVM, Assistant, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Sex hormones such as testosterone are substances synthesized by the sexual glands. These substances are involved in endocrine regulation of growth, and the development of sexual characteristics both in animals and humans. Sex hormones have a number of very important functions. Apart from the development of sexual characteristics, sex hormones may also affect several other important segments, such as growth, and are used for therapeutic and anabolic purposes. There are four groups of sex hormones, androgens, oestrogens, gestagens and relaxants. The aim of this paper was to review the literature on the use of sex hormones for therapeutic and anabolic purpose with an emphasis on testosterone. Specifically, testosterone is the most important natural androgen excreted in the testicles and stimulates the development of male sex glands and sexual characteristics. It is most commonly used in combination with 17 $\beta$ -oestradiol. In this paper, the negative effects of testosterone are particularly emphasized, which can

cause genetic mutations and the appearance of tumours in medically unjustified use. As far as therapeutic use is concerned, these testosterone-specific hormones can be used to prevent and reduce health problems in the reproductive system. On the other hand, inadequate use of sex hormones to improve growth to achieve financial gain or anabolic purposes is not legal since they can have a negative effect not only on the animal but also on the human as a consumer of foods of animal origin. Consequently, the law regulates the use of sex hormones including testosterone. In addition to the competent authorities, veterinary services and reference laboratories have a very important role in the control of these substances. In the future, alternative solutions for the therapeutic use of hormones in farm animals need to be found, and control systems should be effective in excluding the possibility of abuse of these substances for anabolic purposes.

**Key words:** *sex hormones, testosterone, therapeutic effect, anabolic action*