# Raspodjela metala u bedrenoj kosti smeđeg medvjeda (Ursus arctos Linnaeus, 1758)

**Nemet, Mateja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:311963

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mateja Nemet

# Raspodjela metala u bedrenoj kosti smeđeg medvjeda (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Maje Lazarus v. znan. sur. i suvodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, u sklopu završetka diplomskog studija Eksperimentalne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvale*

*Najveća zahvala mentorici dr.sc. Maji Lazarus na predloženoj temi diplomskog rada, na izdvojenom vremenu, strpljenju, razumijevanju i pomoći tijekom izrade rada.*

*Hvala i izv. prof. dr. sc. Ani Galov na savjetima i izdvojenom vremenu pri izradi ovog rada.*

*Veliko hvala svim mojim dragim prijateljima s kojima sam dijelila ovaj put studiranja, a posebno Ivi i Mirni koje su dale novo značenje prijateljstu.*

*Hvala našoj studenstkoj udruzi BIUS koji je uvelike uljepšao i upotpunio iskustvo studiranja.*

*Hvala mojem bratu Luki na čašici razgovora u trenucima studija kada mi je bila potrebna pauza.*

*Posebno veliko hvala mojim roditeljima na pruženoj mogućnosti studiranja te na strpljenju s tijekom studija.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Raspodjela metala u bedrenoj kosti smeđeg medvjeda (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758)

Mateja Nemet
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ovim radom istražile su se razine olova, stroncija, kalcija i cinka u 41 bedrenoj kosti smeđeg medvjeda (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) s područja Like i Gorskog kotara prikupljenih tijekom 2014 i 2015. godine. Metali su izmjereni tehnikom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme. Ispitan je utjecaj spola i dobi na razine metala u kosti te nisu pronađene razlike u sadržaju metala između mužjaka i ženki, no uočen je proporcionalan rast dobi i razine elemenata. Istraživanjem razlika u sadržaju metala morfološki različite kompaktne i spužvaste kosti uočena je značajno veća razina u kompaktnom tipu kosti u odnosu na spužvasti tip bedrene kosti. Važan faktor koji utječe na razinu metala je i pozicija na kosti. Spužvasta kost, gdje su oba istraživana metala (olovo i stroncij) pokazala povezanost s esencijalnim elementima kosti (kalcij i cink), pokazala se relevantnijom za istraživanje interakcija između elemenata u bedrenoj kosti za razliku od kompaktne kosti. Izmjerena razina olova bila je istog reda veličine kao i kod divljih životinja u drugim zemljama te u rasponu normalnih razina za domaće životinje.

(44 stranice, 9 slika, 9 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: olovo, stroncij, kalcij, cink

Voditelj: Dr. sc. Maja Lazarus, v. znan. sur., IMI Zagreb
Neposredni voditelj: Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.
Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, izv. prof.
Dr. sc. Božena Mitić, prof.
Dr. sc. Sandra Hudina, doc.

Rad prihvaćen: 3. svibnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

# Distribution of metals in the femoral bone of the brown bear (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758)

Mateja Nemet
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This study investigated the levels of lead, strontium, calcium and zinc in the femoral bone of 41 brown bears (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) from the area of Lika and Gorski kotar, collected during 2014 and 2015. Metal levels were measured by the inductively coupled plasma-mass spectrometry technique. Influence of gender and age was studied and no differences in metal content between males and females were found, while age was associated with levels of all elements. Differences in metal content in morphologically different compact and spongy bone have shown significantly higher levels of the elements in the compact type of the bone, compared to the spongy bone. Location of bone sampling was also proven to be an important factor for metal levels. It was observed that spongy bone type, where both investigated metals (lead and strontium) were associated with the essential bone elements (calcium and zinc), is more relevant for investigation of interactions between the elements. The measured levels of lead were of the same order of magnitude as in wild animals from other countries and in the range of normal levels for domestic animals.

(44 pages, 9 figures, 9 tables, 52 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Keywords: lead, strontium, calcium, zinc

Supervisor: Dr. Maja Lazarus, Sen. Res. Assoc.
Assistant supervisor: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
Dr. sc. Božena Mitić, Prof.
Dr. sc. Sandra Hudina , Asst. Prof.

Thesis accepted: May 3, 2018

# Sadržaj:


1. Uvod ... 1
   1.1. Kost ... 1
   1.2. Bedrena kost ... 2
   1.3. Mineralni sastav kosti ... 3
   1.4. Metali u kostima ... 3
      1.4.1. Olovo ... 3
      1.4.2. Kalcij ... 5
      1.4.3. Stroncij ... 5
      1.4.4. Cink ... 6
   1.5. Elementi u kostima divljih životinja ... 7
   1.6. Smeđi medvjed (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) ... 12
   1.7. Dosadašnja istraživanja elemenata u medvjedima ... 14
   1.8. Ciljevi istraživanja ... 15
2. Materijali i metode ... 16
   2.1. Materijali ... 16
      2.1.1. Kemikalije ... 16
      2.1.2. Popis uređaja i opreme rabljenih u eksperimentalnom radu ... 16
      2.1.3. Popis referentnih materijala ... 17
   2.2. Metode rada ... 18
      2.2.1. Prikupljanje uzoraka na terenu ... 18
      2.2.2. Uzorkovanje bedrene kosti ... 21
      2.2.3. Priprema uzoraka za analizu metala ... 25
      2.2.4. Pranje laboratorijskog posuđa za razgradnju uzoraka i analizu elemenata ... 26
      2.2.5. Određivanje količina metala u bedrenoj kosti ... 26
   2.3. Statističke metode ... 27
3. Rezultati ... 28
   3.1. Koncentracije metala u bedrenoj kosti smeđeg medvjeda ... 28
   3.2. Razlike u sadržaju metala između mužjaka i ženki ... 28
   3.3. Utjecaj dobi na sadržaj metala ... 31
   3.4. Raspodjela metala između kompaktne i spužvaste kosti ... 34
   3.5. Raspodjela metala u ovisnosti o poziciji na kosti ... 34
   3.6. Povezanost toksičnih i esencijalnih metala ... 35

4. Rasprava ..... 37
5. Zaključci ..... 40
6. Literatura ..... 41
7. Životopis ..... 45

**Popis kratica**

DNA ... deoksiribonukleinska kiselina

RNA ... ribonukleinska kiselina

ICP-MS ... masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom

GDM ... granica detekcije metode

# 1. Uvod

## 1.1. Kost

Koštano tkivo je mineralizirano potporno tkivo koje se odlikuje specifičnim biomehaničkim karakteristikama čvrstoće i elastičnosti te se sastoji od stanica (osteocita, osteoblasta i osteoklasta) i međustanične tvari koja po masi prevladava (Đudarić i sur. 2014). Osteociti su najbrojnije stanice koštanog tkiva, one su terminalno diferencirane, a nastaju ukopavanjem osteoblasta u koštani matriks. Imaju ključnu ulogu u regulaciji koštane i mineralne homeostaze, reguliraju aktivnost i osteoblasta i osteoklasta te su glavne mehanosenzorne stanice koje koordiniraju prilagođavanje koštanog sustava na mehaničko opterećenje (Zoričić Cvek i sur. 2015). Osteoblasti su stanice koštanog tkiva koje proizvode, odlažu i mineraliziraju koštani matriks (Đudarić i sur. 2014). Odgovorni su za sintezu organskih sastojaka međustanične tvari uključujući kolagen tipa I, proteoglikane i glikoproteine. Također sintetiziraju i enzim alkalnu fosfatazu koji je važan u procesu mineralizacije matriksa (Zoričić Cvek i sur. 2015). Sinteza koštane tvari počinje stvaranjem kolagena tipa I (Đudarić i sur. 2014), a mineralizaciju matriksa reguliraju oslobađanjem malih, membranom omeđenih, vezikula matriksa koji koncentriraju kalcij (Ca) i fosfat i enzimski razgrađuju inhibitore mineralizacije kao što su pirofosfati ili proteoglikani (Clarke 2008). U odraslih se organizama te stanice nalaze u periostu, endostu, sinovijalnoj membrani, perihondriju i krvi (Đudarić i sur. 2014). Osteoklasti su velike pokretne stanice s mnogo izdanaka i više jezgara te su jedine poznate stanice koje mogu resorbirati kost (Junqueira i Carneiro 2005, Clarke 2008). Pokrovne ili lining stanice koštanog tkiva nastaju od osteoblasta i smatraju se njihovom relativno inaktivnom formom. Smatra se da su pokrovne stanice aktivne u izdvajanju kalcija iz matriksa kada je potreban u sistemskoj cirkulaciji (Zoričić Cvek i sur. 2015).

Koštano tkivo je metabolički dinamično i podložno promjenama i nakon završenog rasta i razvoja (Zoričić Cvek i sur. 2015). Remodeliranje je odgovor koštanog tkiva na biomehaničke i metaboličke zahtjeve organizma s ciljem održavanja homeostaze koštanog sustava, odnosno cijeloga organizma (Đudarić i sur. 2014, Zoričić Cvek i sur. 2015). Remodeliranjem se ne mijenja masa koštanog tkiva, već se mijenja i preslaguje postojeća masa koštanog tkiva koja je mehanički otpornija kako bi se održala masa i volumen koštane tvari, njena snaga, čvrstoća i elastičnost (Đudarić i sur. 2014, Zoričić Cvek i sur. 2015).

Brzina pregradnje kosti (ukupna izmjena koštanog tkiva) vrlo je velika u djece, gdje pregradnja može biti i do 200 puta brža nego u odraslih (Junqueira i Carneiro 2005). Kosti imaju razne funkcije: štite vitalne unutarnje organe i strukture, osiguravaju održavanje mineralne homeostaze i acidobazne ravnoteže, služe kao rezervoar faktora rasta i citokina, osiguravaju okruženje za hematopoezu unutar koštane srži (Clarke 2008), pružaju strukturnu potporu ostatku tijela, omogućuju kretanje (Junqueira i Carneiro 2005) i određuju veličinu i osnovni oblik tijela (Đudarić i sur. 2014).

Opće kategorije kosti su: duge kosti (npr. ključna kost, nadlaktična kost, palčana, bedrena kost, cjevanica), kratke kosti (npr. karpalne kosti, patela, metatarzalna kost), pločaste kosti (npr. lubanja, donja čeljust, lopatica, prsna kost, rebra) i nepravilne kosti (npr. kralješci, krsna kost, trtična kost, podjezična kost). Pločaste kosti nastaju intramembranskim okoštavanjem, dok se duge kosti formiraju kombinacijom intramembranskog okoštavanja i enhondralnog okoštavanja (Clarke 2008).

## 1.2. Bedrena kost

Bedrena kost, femur, jedina je natkoljenična kost i pripada skupini dugih cjevastih kostiju. Postoje tri dijela bedrene kosti: proksimalni dio, trup (tijelo) i distalni dio. Proksimalni dio bedrene kosti započinje njenom glavom, lat. *caput femoris*, koja ima oblik polukugle, a na sebi ima zglobnu plohu za zglob s *acetabulumom*. Na vrhu glave nalazi se udubljenje, *fovea capitis femoris*. Odmah ispod glave nalazi se vrat, *collum femoris*, koji je mjesto prijelaza proksimalnog dijela kosti u trup kosti. Na tom se mjestu nalaze još i veliki i mali obrtač, *trochanter major et minor*. Zatim slijedi trup bedrene kosti lat. *corpus femoris* i distalni dio kosti koji je sastavljen od dva kondila, lat. *condylus medialis et lateralis* (Jalšovec 2005).

Glava bedrene kosti je izgrađena od spužvaste kosti prekrivene tankim slojem kompaktne kosti. Tijelo kosti je izgrađeno od kompaktne kosti s malo spužvaste kosti s unutrašnje strane oko koštane sržne šupljine. Unutrašnju i vanjsku površinu kosti oblaže sloj vezivnog tkiva koji sadrži osteogene stanice, endost na unutrašnjoj i periost na vanjskoj površini (Junqueira i Carneiro 2005).

Dva oblika koštane tvari, spužvasta i kompaktna, razlikuju se u strukturi (rasporedu lamela, volumenu mineralizirane tvari i sadržaju kalcija) i funkciji. U spužvastoj koštanoj tvari koštano tkivo oblikuje koštane gredice različitih dimenzija, a prostore između gredica

ispunjava koštana srž. Kompaktna koštana tvar solidne je strukture koja nema šupljine ispunjene koštanom srži (Đudarić i sur. 2014, Jee 1983). Kompaktna tvar ima primarno mehaničku i zaštitnu funkciju kosti dok spužvasta obavlja metaboličku funkciju (Favus i Goltzman 2003). Kostur odraslog čovjeka sastoji se ukupno od 80 % kompaktne kosti i 20 % spužvaste kosti. Kompaktna kost je manje metabolički aktivna nego spužvasta (Clarke 2008) što ima za posljedicu i veći mineralizirani volumen (80-90 %) u odnosu na spužvastu tvar (15-25 %) (Jee 1983). Godišnje se remodelira oko 25 % spužvaste koštane tvari i oko 3 % kompaktne koštane tvari (Đudarić i sur. 2014).

## 1.3. Mineralni sastav kosti

Najveći maseni udio matriksa, oko 50 – 70 % čini mineralni anorganski sadržaj, oko 5 do 10 % čini voda, 20 – 40 % organski sadržaj i <3 % lipida (Zoričić Cvek i sur. 2015, Clarke 2008). Oko 95 % organskog sadržaja matriksa čine vlaknati proteini, kolagen, od kojih je najzastupljeniji, i za koštani matriks specifičan, kolagen tip I, a ostatak čine glukozaminoglikanske molekule udružene s proteinima u makromolekularne komplekse. Mineralni sadržaj matriksa predstavlja oko 50 % suhe tvari i sadrži velike količine Ca i fosfora (P) te manje količine bikarbonata, magnezija (Mg), natrija (Na) i klora (Cl). Najzastupljeniji među njima je kalcijev fosfat ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) u obliku kristala hidroksiapatita (Zoričić Cvek i sur. 2015), ali ima i dosta amorfnog, nekristalnog kalcij-fosfata (Junqueira i Carneiro 2005). Za razliku od Ca koji je najzastupljeniji element u kostima, drugi elementi, kao primjerice cink (Zn) i bakar (Cu) prisutni su u tragovima no imaju esencijalnu funkciju u normalnom razvoju i održavanju homeostaze kosti (Schwalfenberg i Genius 2015).

## 1.4. Metali u kostima

### 1.4.1. Olovo

Olovo (Pb) je sveprisutni metal koji u okoliš dolazi iz prirodnih izvora (stijena) te kao posljedica ljudskog djelovanja: kopanjem i preradom ruda, proizvodnjom baterija, streljiva, boja, stakla, pigmenata, električne i automobilske opreme, odlaganjem otpada (ATSDR 2007). Prehrambenim lancem Pb se prenosi iz tla i biljaka do viših sisavaca. Ima svojstva

nakupljanja u organizmu i toksičnih učinaka na respiratorni, kardiovaskularni, gastrointestinalni, hematološki, mišićno-koštani, endokrini, imunološki, neurološki i reproduktivni sustav, negativne učinke na jetru i bubrege te genotoksične i karcinogene učinke (Gerhardsson 2004). Kost je ciljni organ za nakupljanje Pb tijekom dugotrajne izloženosti te koštani sustav sadrži više od 90 % Pb u tijelu (Gerhardsson 2004). Od toga, 70 % se nakuplja u kompaktnoj kosti (Lanocha i sur. 2013) gdje je poluživot Pb 5-10 godina tj. oko 5 puta duži od onog u spužvastoj kosti (Gerhardsson 2004). Sadržaj Pb u jetri odražava kratkotrajnu izloženost olovu (od nekoliko tjedana) (Rodríguez-Estival i sur. 2011).

Makrodistribucija Pb u kosturu nije ujednačena, ovisi o tipu kosti (kompaktna ili spužvasta), godinama i u manjoj mjeri o spolu (Aufderheide i Wittmers 1992). Olovo se izraženije nakuplja u područjima kosti s aktivnom mineralizacijom te je u mlađoj dobi nakupljanje dominantno u spužvastoj, a u odrasloj dobi i u spužvastoj i kompaktnoj kosti. Poluživot olova u kostima djece kraći je od onog u odraslih. Olovo iz kosti može ponovno ući u cirkulaciju u razdobljima intenzivnog rasta kostiju, mineralizacije i preoblikovanja (trudnoća, laktacija) i na taj način biti endogeni izvor olova za organizam (ATSDR 2007).

Olovo je iznimno citotoksično, utječe na osteoblaste, osteoklaste i hondrocite. Utječe i na sekreciju hormona, odgovore stanica na hormone pa tako i na sintezu proteina vezanih uz kost, kao što su: osteokalcin, kolagen, osteopontin i sklerostin (Dermience i sur. 2015). Pohrana i otpuštanje Pb iz kostiju usko su vezani uz metabolizam Ca (Berglund 2000). U kristalu hidroksiapatita Pb može zamijeniti Ca, a ima i veći afinitet vezanja za osteokalcin od Ca. Smatra se da zamjena Ca s Pb, bilo u kompleksu s osteokalcinom ili hidroksiapatitom, može pogoršati brzinu vezanja proteina na kristal. Iako uloga osteokalcina nije u potpunosti poznata, pretpostavlja se da bi vezanje Pb za osteokalcin moglo utjecati na remodeliranje kosti (Dermience i sur. 2015).

Olovo je također navedeno kao potencijalni faktor rizika za osteoporozu i osteoartritis. Patološke promjene pri izloženosti Pb stoga mogu utjecati na lomljivost kosti. Kako koštano tkivo ima visoki kapacitet za akumulaciju i pohranu Pb, moguća funkcija koštanog tkiva je i smanjenje razina takvih toksičnih elemenata u serumu. Oslobađanje Pb pohranjenog u kosti se može snažno povećati kod bolesti i stanja s povećanom pregradnjom kostiju (osteoporoza, hipertireoza, hiperparatireoidizam i trudnoća) (Pemmer i sur. 2013).

### 1.4.2. Kalcij

Kalcij kao esencijalni element ima glavnu strukturnu ulogu u kosti, a čak 99 % ukupnog Ca u tijelu je u obliku hidroksiapatita koji izgrađuje kosti i zube. Kalcij se neprestano izmjenjuje između krvi i koštanog tkiva. Brzim mehanizmom mobilizacije Ca ioni se iz spužvaste kosti prenose s kristala hidroksiapatita u intersticijsku tekućinu i odatle u krv. Spori mehanizam mobilizacije Ca ovisi o djelovanju hormona na koštano tkivo. U nedostatku Ca u krvi luči se paratiroidni hormon koji aktivira vitamin D, utječe na zadržavanje Ca u bubrezima čime se smanjuje izlučivanje urinom, potiče resorpciju koštanog matriksa i oslobađanje kalcija, a kalcitonin inhibira resorpciju matriksa (Junqueira i Carneiro 2005). Smanjen unos Ca prehranom dovodi do smanjenog mineralnog sadržaja kostiju i mineralne gustoće kostiju, a dugotrajni nedostatak može dovesti do rahitisa, osteomalacije i osteoporoze. Kalcij također pridonosi metabolizmu kosti. Eksperimenti u kulturi stanica pokazali su da visoke koncentracije izvanstaničnog Ca stimuliraju sazrijevanje stanica poput osteoklasta i resorpciju kosti zrelim osteoklastima. Visoka razina izvanstaničnog Ca stimulira sintezu deoksiribonukleinske kiseline (DNA) u osteoblastima i potiče proliferaciju osteoklasta dok visoka koncentracija Ca u citosolu modificira citoskeleton osteoklasta. Iako je primarna uloga Ca u metabolizmu kosti stvaranje hidroksiapatita, ovaj sveprisutni element ima mnogobrojne i složene regulatorne funkcije (Dermience i sur. 2015).

### 1.4.3. Stroncij

Stroncij (Sr) je prirodni element koji se pojavljuje samo u obliku spojeva. Prisutan je u stijenama, tlu, prašini, ugljenu, nafti, površinskoj i podzemnoj vodi, zraku, biljkama i životinjama. Prirodni Sr nije radioaktivan, smjesa je od četiri stabilna izotopa i nije štetan u razinama obično prisutnim u okolišu. Radioaktivni izotopi Sr nastaju prilikom nuklearnih eksplozija i u nuklearnim reaktorima, a neki od njih se koriste u medicini (ATSDR 2007). Istraživanja na životinjama su pokazala da Sr može zamijeniti Ca u gotovo svim fiziološkim procesima. Unos Sr hranom može široko varirati bez pojave simptoma otrovanja i nije pod homeostatskom kontrolom pa razina u krvi i serumu nije konstantna već ovisi o unosu (Pemmer i sur. 2013). Unos visokih razina Sr šteti rastu kosti posebice kod djece čije kosti nisu u potpunosti izgrađene, a pogotovo ako je prehrana siromašna Ca i proteinima jer Ca inhibira intestinalnu apsorpciju. Naime, Sr se može koristiti za izgradnju minerala jer

zamjenjuje Ca u hidroksiapatitu i raspoređuje se relativno ravnomjerno unutar kosti. Rezultat toga je dugogodišnje skladištenje (ATSDR 2007). Istraživanja sugeriraju da Sr ima inhibirajući učinak na osteoklaste i osteoblaste te tako utječe na mineralizaciju kosti (Dermience i sur. 2015). Štetniji je radioaktivni Sr čiji učinci su posljedica zračenja. Kad se radioaktivni Sr ugradi u kosti, sama kost i okolno tkivo se s vremenom ošteti radijacijom pa može doći do smanjenja broja krvnih stanica i raka uslijed oštećenja DNA. Djeca su više podložna utjecaju radioaktivnog Sr zbog toga što Sr aktivnije ulazi u kost tijekom rasta, duže tamo ostaje i time su i oštećenja od radijacije veća. Najveći izvor izloženosti Sr su hrana i voda. Unosu najviše pridonose žitarice, lisnato povrće i mliječni proizvodi. Od unesenog Sr samo mali dio ulazi u krvotok. Istraživanja na životinjama pokazala su da mladunčad u razdoblju sisanja apsorbira više Sr putem crijeva nego odrasli. Stroncij se krvotokom širi po tijelu i može lako ući i izaći iz stanica. U tijelu se ponaša kao Ca, a i raspodjela apsorbiranog Sr u ljudskom tijelu je slična Ca pa se u kostur pohrani oko 99%, a 1% u meka tkiva (npr. jetru) (ATSDR 2007). U odraslih se u početku većinom veže na površinu kompaktne ili spužvaste kosti, od kuda se može relativno brzo zamijeniti s Ca u plazmi ili sporije s Ca u kosti te se iz plazme prenese 55 % Sr na površinu spužvaste kosti, a 45 % na površinu kompaktne kosti (Pors Nielsen 2004., ATSDR 2007). Pokazalo se da odnos Sr:Ca u kosti varira s tipom kosti; omjeri u kompaktnoj kosti bili su približno 10–20 % viši nego u spužvastoj kosti. Istraživanja su pokazala da se otprilike 4.75 % Sr unesenog prehranom ugradi u kostur odraslih i da se 7.5 % Sr pohranjenog u kompaktnoj kosti eliminira iz nje svake godine. Stupanj eliminacije iz spužvaste je bio otprilike 4 puta veći od ove vrijednosti. Otkriveno je da i u ljudi i životinja Sr može biti izlučen u mlijeko i prenesen u fetus preko placente (ATSDR 2007).

### 1.4.4. Cink

Cink je esencijalni element čiji manjak dovodi do teških zdravstvenih posljedica. Toksični učinak Zn je relativno rijetka pojava i javlja se samo pri vrlo visokim razinama izloženosti. Akutna toksičnost unosom uzrokuje gastrointestinalne poremećaje, a udisajem npr. cinkovog oksida dolazi do tzv. metalne groznice. Djeluje i neurotoksično, a velike količine akumulirane u gušterači mogu uzrokovati smrt ß-stanica kada se u posebnim okolnostima otpuste iz nje. Cink je sveprisutan u okolišu i stoga je prisutan u većini prehrambenih proizvoda, vodi i zraku. Glavni put unosa Zn u organizam je prehranom, a

apsorpcija u gastrointestinalnom sustavu je homeostatski regulirana. Od ukupnog Zn unesenog hranom samo se oko 20–30 % apsorbira pasivnom difuzijom i olakšanom difuzijom preko specifičnog Zn transportera kao ZnT-1. Apsorpcija se može smanjiti dijetalnim vlaknima, fitatima, kalcijem i fosforom, dok aminokiseline, pikolinična kiselina i prostaglandin E pojačavaju apsorpciju Zn. Cink je učinkovit pokretač sinteze metalotioneina i prilikom zasićenja intestinalnih stanica metalotioneinima smanjuje se njegova apsorpcija. Metalotioneini su također važni u skladištenju staničnog Zn. Postoji više od 300 katalitički aktivnih Zn metaloenzima i 2000 transkripcijskih faktora ovisnih o Zn (Jie i sur. 2008). Uglavnom je aktivan u sintezi proteina i aktivaciji DNA i ribonukleinske kiseline (RNA) kroz regulacijske proteine. Potreban je i u sintezi prostaglandina i za antioksidacijsku zaštitu (Dermience i sur. 2015). Cink je prisutan u koštanom tkivu i ima važnu ulogu u metabolizmu kosti. Istraživanja razine Zn u različitim tkivima otkrila su da je 60 % sadržano u mišićima, 30 % u kostima, 8 % u koži i dlaci, 5 % u jetri i stoga se Zn smatra esencijalnom komponentom kalcificiranog matriksa (Jie i sur. 2008, Pemmer i sur. 2013). U plazmi je vezan na albumin (60-80 %) što predstavlja metabolički aktivan spremnik Zn. Koncentracija Zn u plazmi nije osjetljivi pokazatelj Zn i ne odražava odnos doze i odgovora između razine Zn u tijelu i učinaka na različitim ciljanim mjestima (Jie i sur. 2008).

Brojna *in vivo* istraživanja su potvrdila da nedostatak Zn dovodi do usporavanja rasta kostiju, različitih skeletnih abnormalnosti i osteopenije. Acrodermatitis enteropathica je rijetka bolest koju karakterizira smanjena apsorpcija Zn, a otkrila je bitnu ulogu Zn u metabolizmu kostiju. Pomanjkanje Zn inducirano ovom bolešću dovodi do usporenog i poremećenog rasta kostiju. Pokazalo se da dodatak Zn stimulira osteoblaste, a inhibira diferencijaciju osteoklasta što dovodi do povećane čvrstoće kostiju. Suplementacija Zn također ublažava toksične učinke ostalih metala, osobito kadmija (Cd) i može spriječiti ili liječiti nekoliko vrsta patološkog gubitka kostiju. (Dermience i sur. 2015). Dodatak Zn u hrani smanjuje nakupljanje Pb u tkivima, a nedostatak povećava gastrointestinalnu apsorpciju Pb jer se Pb i Zn natječu za mjesto vezanja na istim transmembranskim transporterima. Olovo također može zamijeniti Zn u hemenzimima krvi, posebno u enzimu delta-aminolevulinska kiselina, i time smanjiti njihovu aktivnost (Schwalfenberg i Genius 2015).

## 1.5. Elementi u kostima divljih životinja

Kost se koristi rjeđe od mekih tkiva (primjerice jetre ili bubrega) u praćenju izloženosti organizama toksičnim zagađivalima iz okoliša no za metale kao što su Pb i Sr koji

se pohranjuju u kost, kost predstavlja osjetljivi biomarker za dugotrajnu izloženost. Koncentracije toksičnih elemenata u kosti daju informaciju o stanju tih elemenata u okolišu u kojem organizam živi, ali i o zdravstvenom stanju jedinke i populacije. Pri izboru vrste organizma za praćenje zagađivala koja imaju svojstvo nakupljanja u organizmu važno je da vrsta dugo živi, da je na što višoj trofičkoj razini, da je rasprostranjena na širem području te da su poznate osnovne karakteristike vrste (npr. prehrana, ciklus razmnožavanja).

Istraživanja su pokazala da metali imaju različitu raspodjelu u kostima ovisno o spolu, vrsti kosti (npr. rebro *vs*. grudna kost *vs*. bedrena kost; Nganvongpanit i sur. 2016), tipu koštanog tkiva (spužvasto *vs*. kompaktno; Lanocha i sur. 2013) i strukturnoj jedinici kosti (Pemmer i sur. 2013). Osim u ljudi, gdje je najčešće korištena kost u studijama praćenja razine metala bila bedrena kost (Wiechula i sur. 2008), metali su mjereni u raznim kostima divljih životinja. Razine Pb mjerene su u rebru divlje svinje (*Sus scrofa*) i običnog jelena (*Cervus elaphus*) (Kuiters 1996), Ca i Pb u metakarpalnoj kosti divlje svinje i običnog jelena (Rodriguez-Estival i sur. 2013); Pb, Zn i Sr u bedrenoj kosti crvene lisice (*Vulpes vulpes*) (Lanocha i sur. 2012, Budis i sur. 2013); Zn i Pb u neodređenoj kosti crvene lisice, pirenejskog risa (*Lynx pardinus*), mungosa (*Herpestes ichneumon*), genetke (*Genetta genetta*) i jazavca (*Meles meles*) (Millan i sur. 2008); Zn i Pb u čeljusti običnog jelena (Lazarus i sur. 2008) i Ca, Zn i Pb u metakarpalnoj kosti losa (*Alces alces*) (Bjorå i sur. 2001). Tablica 1 prikazuje podatke iz literature o razinama Ca, Zn, Sr i Pb izmjerenim u kostima raznih vrsta kopnene divljači.

Kako bi se procijenio značaj nađenih koncentracija elemenata na zdravstveno stanje životinja, važno je, za primjerice esencijalni element, imati poznate raspone vrijednosti u kosti za koje se zna da su adekvatne za zdravlje životinje. Suprotno tome, vrijednosti ispod ili iznad tog „normalnog“ raspona ukazuju na nedostatak ili prekomjernu razinu elementa u organizmu te mogući otklon od dobrog zdravstvenog stanja jedinke. Za toksične elemente u literaturi se najčešće navode granice ispod kojih se ne očekuju negativni učinci na zdravlje jedinke, a uz „toksične“ razine povezuju se dokazani toksični učinci na zdravlje. Kako u literaturi nema dovoljno podataka o normalnim razinama toksičnih i esencijalnih metala u divljih sisavaca, izmjerene koncentracije uspoređuju se s dostupnim podacima za domaće životinje (Tablica 2).

**Tablica 1.** Razine kalcija, cinka, stroncija i olova (mg/kg suhe mase) u kostima divljih životinja.

| vrsta | država | kost | tip kosti | deskriptivna vrijednost | broj jedinki | element (mg/kg) | | | | literatura |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Ca | Zn | Sr | Pb | |
| crvena lisica (*Vulpes vulpes*) | SZ Poljska | bedrena kost | kompaktna | SV (medijan) | 34 | | 125(106) | 68,8(63,3) | 0,978(0,447) | Lanocha i sur. 2012, Budis i sur. 2013 |
| | | | spužvasta | SV (medijan) | 34 | | 111(116) | 55,4(42,8) | 1,49(0,610) | |
| | J Španjolska | | | geometrijska sredina | 16 | | 142 | | 0,385 | Millán i sur. 2008 |
| pirenejski ris (*Lynx pardinus*) | J Španjolska | | | raspon geometrijske sredine | 6 | | 131-133 | | 0,136-2,05 | Millán i sur. 2009 |
| mungos (*Herpestes ichneumon*) | J Španjolska | | | geometrijska sredina | 11 | | 145 | | 0,136 | Millán i sur. 2010 |
| genetka (*Genetta genetta*) | J Španjolska | | | geometrijska sredina | 4 | | 173 | | 0,112 | Millán i sur. 2011 |
| jazavac (*Meles meles*) | J Španjolska | | | geometrijska sredina | 1 | | 128 | | 0,735 | Millán i sur. 2012 |
| divlja svinja (*Sus scrofa*) | Nizozemska | rebro | | raspon medijana | 104 | | | | 4,80-9,70 | Kuiters 1996 |
| | Španjolska, kontrolno područje | metakarpalna kost | | geometrijska sredina | 27 | 205600-220300 | | | 0,76-1,25 | Rodríguez-Estival i sur. 2013 |
| | Španjolska, rudarsko područje | metakarpalna kost | | geometrijska sredina | 26 | 203200-240900 | | | 1,07-6,36 | |
| obični jelen (*Cervus elaphus*) | Hrvatska | čeljust | kompaktna | SV (medijan) | 80 | | 86,7(87,0) | | 0,444(0,281) | Lazarus i sur. 2008 |
| | Nizozemska | rebro | | raspon medijana | 46 | | | | 2,20-3,70 | Kuiters 1996 |

**Tablica 1.** Nastavak.

| vrsta | država | kost | tip kosti | deskriptivna vrijednost | broj jedinki | element (mg/kg) | | | | literatura |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Ca | Zn | Sr | Pb | |
| obični jelen (*Cervus elaphus*) | Španjolska, kontrolno područje | metakarpalna kost | | raspon geometrijske sredine | 22 | 224700-253600 | | | 0,07-0,12 | Rodríguez-Estival i sur. 2013 |
| | Španjolska, rudarsko područje | metakarpalna kost | | raspon geometrijske sredine | 34 | 254500-262400 | | | 0,26-0,77 | Rodríguez-Estival i sur. 2013 |
| los (*Alces alces*) | Norveška | metakarpalna kost | kompaktna | raspon SV | 25 | 266600-269800 | 122-131 | | 0,4-1,5 | Bjorå i sur. 2001 |

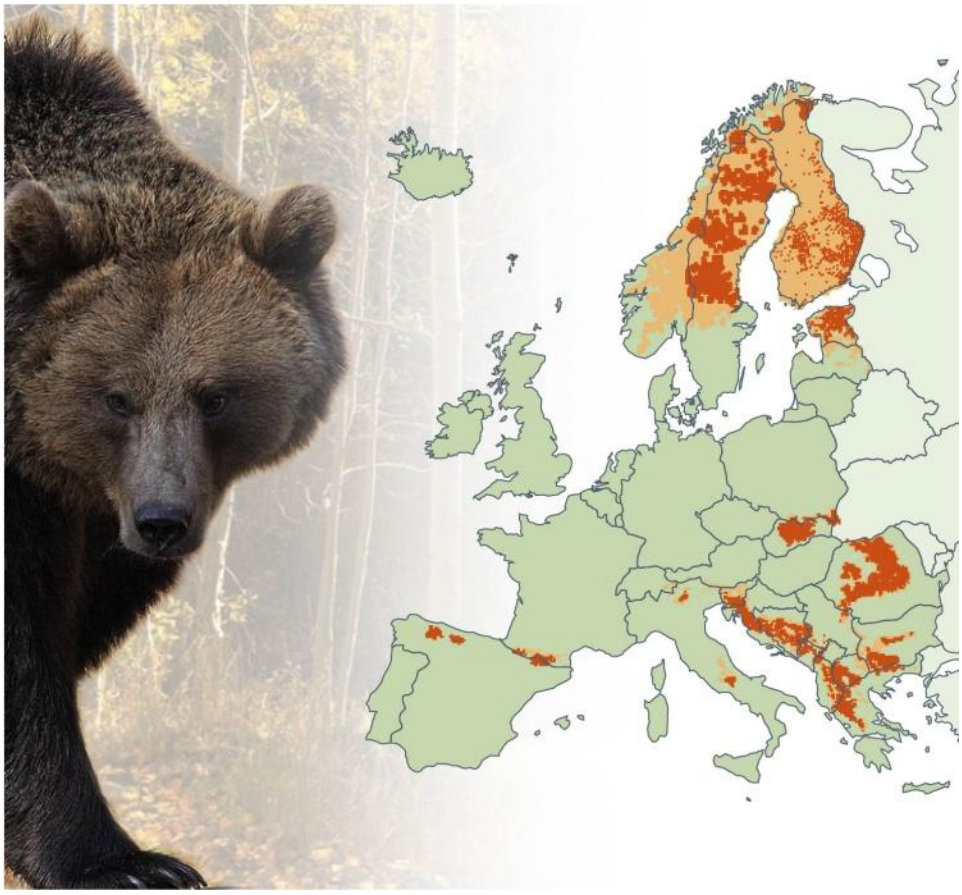
[1]SV- aritmetička sredina

**Tablica 2**. Razine kalcija, cinka i olova u kosti domaćih životinja ( Puls, 1994).

| **element** | **razina u mg/kg suhe tvari kosti** | **vrsta** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **konj** | **svinja** | **govedo** |
| Ca | nedovoljna | | | <245000 |
| | optimalna | | 320000-390000 | |
| | toksična | | | |
| Zn | nedovoljna | | 60-90 | 32-60 |
| | optimalna | 65-75 | 95-146 | 70-250 |
| | toksična | 140-340 | | 150-198 |
| Pb | normalna | 3,0-4,0 | 1 | 1,0-7,0 |
| | visoka | 8,0-40 | 100-500 | 30-75 |
| | toksična | 40-350 | | 30-100 |

## 1.6. Smeđi medvjed (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758)

Medvjed koji živi u Hrvatskoj sisavac je iz reda zvijeri (*Carnivora*), porodice medvjeda (*Ursidae*), roda medvjed (*Ursus*) i vrste smeđi medvjed (*Ursus arctos* L.). Osim njegovih fosilnih ostataka po cijeloj Hrvatskoj, na otoku Lošinju su nađeni i ostaci špiljskog medvjeda (*Ursus spelaeus*). Danas u svijetu živi osam vrsta iz porodice medvjeda koji su se razvili od zajedničkog predatorskog pretka Miacida prije oko 25 milijuna godina. Posebnost medvjeda je velika sposobnost da veličinom i vanjskim izgledom reagira na uvjete staništa pa su tako prije pedesetak godina autori opisivali od 70 do 150 podvrsta smeđih medvjeda. Smeđi je medvjed nekada bio rasprostranjen po cijeloj Euroaziji i Sjevernoj Americi. Danas je u zapadnoj Europi praktično istrijebljen, a preostale su populacije malene, međusobno odvojene i u nestajanju. U Hrvatskoj živi oko 1000 jedinki koje su dio Dinara-Pindos populacije s oko 2800 jedinki (Huber i sur. 2008). Na Slici 1 je prikazana rasprostranjenost smeđeg medvjeda u Europi.



**Slika 1.** Rasprostranjenost smeđeg medvjeda u Europi. Prilagođena slika preuzeta je od Large Carnivore Initiative for Europe.

Medvjedi su najveći kopneni mesožderi. U Hrvatskoj odrasle ženke imaju prosječno 100 kg, mužjaci 150 kg, a rijetki prijeđu i 300 kg. Tijekom godine masa odrasle jedinke može odstupati više od trećine: najveća je u kasnu jesen pred brloženje, a najmanja početkom ljeta odnosno krajem sezone parenja (Huber i sur. 2008).

Brloženje godišnje traje oko 6 mjeseci. Tijekom tog perioda oskudice hrane homeostatskim mehanizmom se štedi energija, neuroendokrini sustav smanjuje metabolički zahtjevne procese pa medvjedi recikliraju kataboličke produkte, kao ureu i Ca, umjesto da ih izluče. Istraživanja pokazuju da medvjedi u tom periodu sprječavaju gubitak i kortikalne i spužvaste kosti. Uravnoteženo stvaranje i resorpcija kostura vjerojatno se odvijaju kako bi se očuvala homeostaza Ca tijekom hibernacije (McGee-Lawrence i sur. 2009).

Medvjedi u Hrvatskoj su spolno zreli u dobi od 3 do 4 godine. U prirodi mogu doživjeti do 25 godina, a u zatočeništvu i do 40 godina (Huber i sur. 2008).

Pare se od kraja svibnja do polovice srpnja. Zametak u maternici ima odloženi razvoj odnosno implantaciju, te se najveći dio njegova razvoja odvija u zadnja 3 mjeseca trudnoće, koja ukupno traje oko 7 mjeseci. Medvjedići se rađaju sredinom zime, za vrijeme brloženja. (Huber i sur. 2008).

Najdulje je zimsko mirovanje gravidnih ženki, koje najčešće u prvoj polovici siječnja rađaju 1 do 4 mladunčeta mase oko 350 g. Rađaju se slijepi i bez dlake. Životno su ovisni o neposrednom kontaktu s tijelom majke, koja ih grije i hrani koncentriranim mlijekom (Huber i sur. 2008).

Iako su po tjelesnom ustrojstvu pravi mesožderi, medvjedi oko 95 % prehrambenih potreba zadovoljavaju biljnom hranom, a udio životinjskih bjelančevina sastoji se uglavnom od beskralježnjaka i lešina većih životinja. Od biljne hrane u proljeće i ljeto dominiraju zeljaste biljke i trave (npr. medvjeđi luk, kozlac, kiselice). Ljeti se pridružuju razni mekani plodovi (jagode, maline, kupine), a u jesen žir bukve kao glavna hrana za prikupljanje zimskih zaliha potkožne masti te plodovi divlje jabuke, divlje kruške, lijeske i kestena. U poljima se hrani svim vrstama žitarica, a naročito zobljem. Od hrane životinjskog podrijetla najčešće se hrani lešinama životinja koje nađe u šumi, beskralježnjacima, ličinkama mrava i drugih kukaca te mladunčadi divljih životinja. Od domaćih životinja najčešće napada ovce, katkad krave, magarce i konje. Od divljači napada samo vrlo mlade, te ranjene i bolesne životinje koje može uhvatiti (Huber i sur. 2008).

## 1.7. Dosadašnja istraživanja elemenata u medvjedima

Praćenjem razine metala u divljih životinja dobiva se informacija o stanju zagađivala u okolišu, zdravlju jedinki i populacije. Istraživanja razine metala u mekim tkivima divljih životinja Hrvatske: običnog jelena, sivog vuka (*Canis lupus*), euroazijskog risa (*Lynx lynx*) i čaglja (*Canis aureus*) pokazala su da je smeđi medvjed (*Ursus arctos* L.) vrsta s najvišim vrijednostima toksičnih metala (Lazarus i sur. 2014, 2017). Medvjed predstavlja pogodnu indikatorsku vrstu jer dugo živi, na vrhu je prehrambenog lanca, dijeli stanište s ljudima, ali i drugim lovnim vrstama koje čovjek konzumira, ima stabilnu populaciju i lovna je vrsta, što olakšava prikupljanje uzoraka.

U mišićima, jetri i bubrezima smeđih medvjeda s područja Hrvatske mjereni su: Mg, kalij (K), Ca, mangan (Mn), željezo (Fe), kobalt (Co), Cu, Zn, arsen (As), molibden (Mo), talij (Tl), Cd, Pb, uranij (U) i živa (Hg) (Bilandžić i sur. 2012, Lazarus i sur. 2014, Lazarus i sur. 2017). U istraživanju razina selena (Se), Cd i Hg u smeđih medvjeda u Hrvatskoj pronađeno je da metali imaju istu distribuciju u tkivima po sljedećem redu: korteks bubrega > jetra > mišić (Lazarus i sur. 2014). Kasnijim istraživanjem potvrđena je ustanovljena raspodjela pa su tako u korteksu bubrega izmjerene visoke razine većine elemenata (As, Ca, Cd, Co, Pb, Se, Hg, Mo, Tl, U) osim Mg, K, Zn (najviše u mišićima), Mn Fe i Cu (najviši u jetri). Nakupljanje po obrascu (od mišića do bubrega) posebno je izraženo za Cd, Hg, U, Pb i Co s time da su samo razine Cd i Pb u jetri i bubrezima bile u toksikološki značajnim razinama (Scheuhammer 1991, Ma 2011), iako u staništu nema značajnog izvora onečišćenja (Lazarus i sur. 2017).

U smeđih medvjeda s područja Karpata su izmjerene razine Cd, Pb, Hg, Cu u bubrezima, mišićima, slezeni, jetri (Čelechovská i sur. 2006). U krznu smeđih medvjeda s područja Irana izmjerena je razina Hg (Solgi i Ghasempouri 2015). Istraživanja koja su uključivala više esencijalnih i toksičnih elemenata provedena su i na polarnim medvjedima (*Ursus maritimus*) Aljaske, pa su tako izmjerene razine As, Cd, Co, Cu, Mg, Mn, Mo, Zn, Pb, Se, Hg, Zn, Ag, u jetri, bubrezima, mišićima i potkožnoj masti (Woshner i sur. 2001). Otkriveno je da su prosječne vrijednosti Cu, Mn, Mo, Ag, Zn, i As više u jetri nego u bubregu, Cd, Co, Pb i Hg više razine u bubregu nego u jetri, dok je Mg najviše bilo u mišiću (Woshner i sur. 2001). Do sada nije provedeno praćenje razine metala u kostima smeđeg medvjeda niti ijedne druge vrste medvjeda u svijetu.

## 1.8. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja je istražiti izloženost smeđeg medvjeda s područja Hrvatske toksičnim metalima (Pb i Sr) i njihov mogući utjecaj na esencijalne metale (Ca i Zn), raspodjelu metala između kompaktnog i spužvastog tipa kosti, raspodjelu metala u ovisnosti o poziciji na kosti, razlike u sadržaju metala između mužjaka i ženki te utjecaj dobi životinja na sadržaj metala u bedrenoj kosti.

# 2. Materijali i metode

## 2.1. Materijali

U ovom radu su korištene slijedeće kemikalije, uređaji i oprema:

### 2.1.1. Kemikalije

- standardna otopina cinka (Zn), ϱ= 1003 mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- standardna otopina kalcija (Ca), ϱ=1002 µg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- standardna otopina olova (Pb), ϱ= 999 mg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- standardna otopina stroncija (Sr), ϱ=1004 µg/L, PlasmaCAL, SCP Science, Kanada
- ultračista $H_2O$ specifične vodljivosti: 0,055 µS/cm (pri 25$^oC$; 18.2 MΩcm)
- pročišćena konc. $HNO_3$ – dobivena iz $HNO_3$, 65% (p.a.), Merck, Njemačka
- argon (Ar), plazma plin, čistoće >99.999%, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska – SOL Group, Italija
- helij (He), kolizijski plin, čistoće >99.9999%, UTP d.o.o., Zagreb, Hrvatska – SOL Group, Italija

### 2.1.2. Popis uređaja i opreme rabljenih u eksperimentalnom radu

- analitička vaga, Mettler Toledo AG, Švicarska
- kvarcni sustav za pročišćavanje $HNO_3$ SubPUR, Milestone, Italija
- liofilizator Hetosicc, Heto, Birkerød, Danska
- aparat za rezanje kosti, višenamjenski alat Dremel 4000 s dijamantnom reznom pločom, Dremel Europe, Breda, Nizozemska
- visokotlačni mikrovalni uređaj za razaranje UltraCLAVE IV opremljen s integriranim programom i cryoLAB rashladnim sistemom, Milestone, Italija
- uređaj za masenu spektrometriju s induktivno spregnutom plazmom, ICP-MS, 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka
- teflonske bočice (FEP) za čuvanje konc. $HNO_3$, Nalgene, SAD
- teflonske epruvete 12 mL za razaranje uzoraka (PTFE) s čepovima, Milestone, Italija
- uređaj za pročišćavanje vode GenPur UV (Ultra pure water system), TKA Wasseraufberaitungssysteme GmbH, Njemačka
- vortex mješalica

### 2.1.3. Popis referentnih materijala

- referentni materijal životinjske kosti *Animal bone H-5*, International Atomic Energy Agency, Austrija

## 2.2. Metode rada

### 2.2.1. Prikupljanje uzoraka na terenu

Uzorci bedrenih kosti smeđeg medvjeda (*Ursus arctos* L.) korišteni za izradu ovog diplomskog rada su prikupljeni u suradnji s lovoovlaštenicima tijekom jeseni 2014. te proljeća i jeseni 2015. godine u lovištima Like i Gorskog kotara i dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Đure Hubera s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od ukupno 41 uzorkovanog medvjeda, 24 je legalno odstreljeno, 9 je stradalo na željeznici, 5 je stradalo na cestama, 2 su usmrćena interventnim odstrelom i 1 medvjed je eutanaziran (Tablica 3).

Od svake životinje je uz bedrenu kost uzet i rudimentarni pretkutnjak pomoću kojeg je određena dob brojanjem slojeva cementa koji okružuju korijen zuba (Stoneberg i Jonkel 1966). Uzorci su s informacijama o spolu, težini, GPS koordinatama lokacija smrti medvjeda i procijenjenoj dobi poslani na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje su pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C do analize u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu.

Smeđi medvjed u Hrvatskoj je 5. prosinca 2013. proglašen strogo zaštićenom vrstom temeljem Pravilnika o strogo zaštićenim vrstama („Narodne novine“, broj: 144/2013). Istodobno medvjed ostaje i na popisu divljači prema Zakonu o lovstvu te se izlučenje iz populacije (redovna i dodatna kvota odstrela te interventni odstrel; 100-150 medvjeda godišnje) odobrava sukladno članku 155., stavku 2. Zakona o zaštiti prirode, a gospodarenje provodi sukladno odredbama Zakona o lovstvu temeljem Plana gospodarenja smeđim medvjedom. Plan gospodarenja donesen je i primjenjuje se od 2005. godine, a revidirani Plan donesen je Odlukom Ministarstva regionalnog razvoja, šumarstva i vodnoga gospodarstva 4. veljače 2008. godine (Huber i sur. 2008).

Istraživanje opisano u ovom radu ni na koji način nije uvjetovalo smrt ili patnju smeđih medvjeda.

**Tablica 3.** Podaci o uzorkovanim medvjedima.

| broj životinje | datum smrti | uzrok smrti* | spol mužjak(m) ženka(ž) | dob (god.) | masa životinje (kg) | desna(D) ili lijeva(L) bedrena kost | dužina bedrene kosti (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 16.9.2014. | 1 | m | 1 | 78 | D | 31,4 |
| 2 | 5.10.2014. | 1 | m | 0,5 | 28,4 | L | 22,2 |
| 3 | 8.12.2015. | 2 | ž | 1 | 75 | L | 29,6 |
| 4 | 13.4.2015. | 2 | ž | 2 | 85 | D | 31,5 |
| 5 | 27.3.2015. | 2 | ž | 2 | 70 | L | 31,9 |
| 6 | 31.3.2015. | 2 | m | 4 | 260 | D | 41,2 |
| 7 | 31.3.2015. | 2 | m | 2 | 212 | D | 39,5 |
| 8 | 31.3.2015. | 2 | ž | 3 | 72 | D | 33 |
| 9 | 22.10.2015. | 2 | m | 1 | 75 | L | 32,5 |
| 10 | 25.10.2015. | 2 | m | 2 | 75 | L | 30,5 |
| 11 | 25.10.2015. | 2 | ž | 4 | 205 | D | 34,5 |
| 12 | 1.12.2015. | 2 | ž | 1 | 71 | D | 28,8 |
| 13 | 9.3.2015. | 2 | m | 5 | 202 | D | 38,8 |
| 14 | 1.4.2015. | 2 | ž | 2 | 52 | L | - |
| 15 | 13.11.2015. | 2 | m | 3 | 124 | L | 35,5 |
| 16 | 24.3.2015. | 2 | m | 3 | 190 | L | 40 |
| 17 | 29.3.2015. | 2 | m | 7 | 199 | L | 39,7 |
| 18 | 31.3.2015. | 2 | m | 2 | 150 | D | 38,3 |
| 19 | 31.3.2015. | 2 | m | 4 | 170 | D | 40,5 |
| 20 | 20.3.2015. | 2 | m | 3 | 97 | D | 37,1 |
| 21 | 23.3.2015. | 2 | m | 3 | 97 | L | - |
| 22 | 16.4.2015. | 2 | m | 4 | 94 | D | 39 |
| 23 | 19.9.2015. | 2 | m | 4 | 184 | D | 37,3 |
| 24 | 4.5.2015. | 2 | m | 2 | 70 | L | 31,2 |
| 25 | 13.4.2015. | 2 | m | 5 | 152 | D | 36,8 |
| 26 | 11.3.2015. | 3 | m | 2 | 76 | D | 32,8 |
| 27 | 21.5.2015. | 3 | ž | 4 | 70 | D | 33,1 |

**Tablica 3.** Nastavak.

| broj životinje | datum smrti | uzrok smrti* | spol mužjak(m) ženka(ž) | dob (god.) | masa životinje (kg) | desna(D) ili lijeva(L) bedrena kost | dužina bedrene kosti (cm) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 28 | 1.8.2015. | 3 | m | 1 | 58,7 | D | 29,3 |
| 29 | 13.10.2015. | 4 | m | 1 | 30 | D | 19 |
| 30 | 13.9.2015. | 1 | ž | 1 | 55 | L | 31 |
| 31 | 22.10.2015. | 2 | ž | 2 | 180 | D | 36,4 |
| 32 | 4.10.2015. | 5 | ž | 5 | 130 | D | 34 |
| 33 | 3.10.2015. | 1 | m | 0,5 | 30,9 | L | 24,7 |
| 34 | 3.10.2015. | 1 | m | 0,5 | 28,2 | L | 23,1 |
| 35 | 9.10.2015. | 3 | m | 1 | 46,2 | D | 27,3 |
| 36 | 17.10.2015. | 3 | ž | 1 | 60 | D | 29 |
| 37 | 27.10.2015. | 1 | ž | 6 | 200 | D | 37 |
| 38 | 1.11.2015. | 1 | ž | 10 | 100 | L | 34 |
| 39 | 1.11.2015. | 1 | ž | 0,5 | 31,3 | L | 23,7 |
| 40 | 1.11.2015. | 1 | m | 0,5 | 36,6 | L | 24,5 |
| 41 | 5.11.2015. | 4 | m | 3 | 195 | L | 38,2 |

*1 - željeznička nesreća, 2 - legalan odstrijel, 3 - automobilska nesreća, 4 - intervencijski odstrijel, 5 – eutanazija

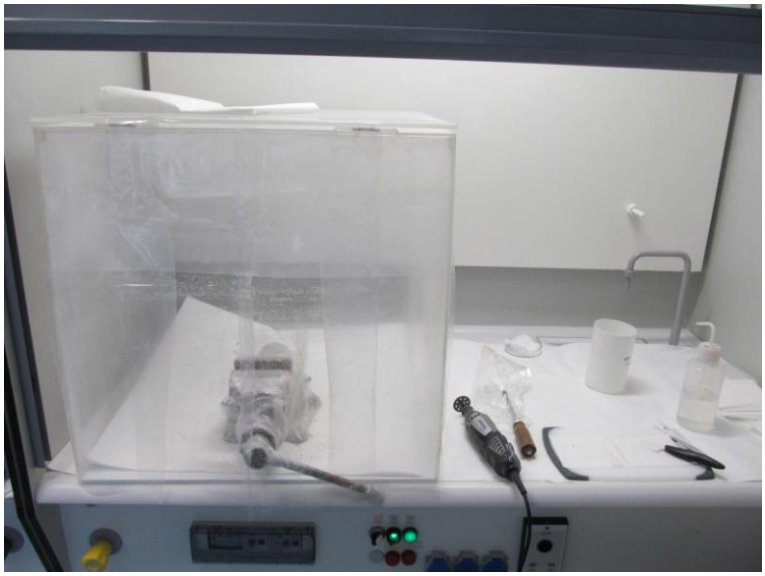
### 2.2.2. Uzorkovanje bedrene kosti

Prije uzorkovanja bedrene kosti izmjerena je njena dužina, određeno je radi li se o lijevoj ili desnoj kosti te je keramičkim nožem očišćena od mišićnog tkiva (Slika 2).

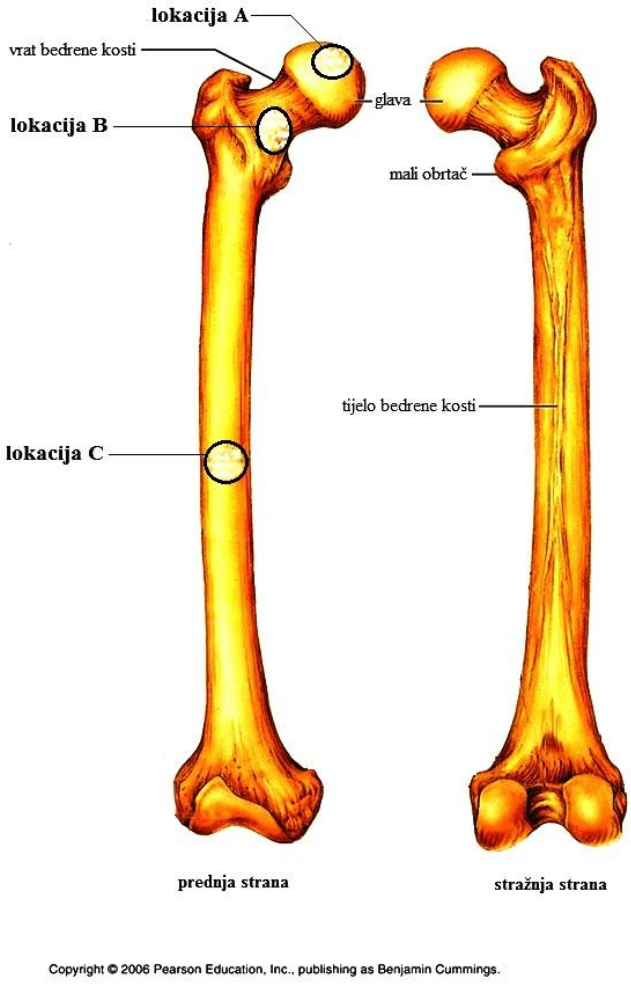


**Slika 2**. Bedrena kost smeđeg medvjeda prije čišćenja (autor : Maja Lazarus).

Očišćena kost učvršćena je uz pomoć mehaničkog vijka kako ne bi došlo do pomicanja prilikom rezanja. Mehanički vijak prethodno je obložen plastičnom folijom radi zaštite kosti od onečišćenja metalima. Kost je rezana u ventiliranom digestoru pomoću višenamjenskog alata Dremel 4000 s reznom pločom presvučenom dijamantnim prahom pri 15000 okretaja u minuti (Slika 3). Uzorci su rezani na poziciji glave bedrene kosti (lat. *caput femoris*; lokacija A), na vratu bedrene kosti kod malog obrtača (lat. *trochanter minor*; lokacija B) i na sredini tijela bedrene kosti (lat. *corpus femoris*; lokacija C). Pozicije uzorkovanja bedrene kosti prikazane su na Slici 4.



**Slika 3.** Ventilirani digestor s priborom za rezanje kosti (autor : Maja Lazarus).




**Slika 4.** Bedrena kost s oznakama 3 pozicije uzimanja uzoraka. Prilagođena slika preuzeta je od Pearson Education.

Svaka kost uzorkovana je na tri lokacije te su ukupno uzeta četiri uzorka sa svake bedrene kosti: dva uzorka spužvaste kosti i dva uzorka kompaktne kosti. Na lokaciji A (glava bedrene kosti) prvo je otklonjen površinski sloj hrskavice i kompaktne kosti, a zatim je izrezan uzorak spužvaste kosti oblika kocke sa stranicom približno 0,5 cm (Slika 5).



**Slika 5.** U prvom planu je izrezan uzorak spužvaste kosti na lokaciji glave kosti. U pozadini je uzorkovana kost na lokaciji vrata bedrene kosti (autor: Maja Lazarus).

Na lokaciji B (vrat bedrene kosti) izrezan je uzorak koji se sastoji od površinskog sloja kompaktne kosti te dubljeg sloja spužvaste kosti. Spužvasta kost odvojena je keramičkim nožem od kompaktne te su dobivena dva različita uzorka s iste lokacije.

Na lokaciji C (tijelo bedrene kosti) uzorkovana je kompaktna kost. Vanjska periostealna i unutarnja endostealna strana sastrugana je keramičkim nožem od ostataka površinskog tkiva, tj. koštane srži.

### 2.2.3. Priprema uzoraka za analizu metala

Četiri izrezana uzorka kosti su očišćena od površinskih nečistoća s ultračistom $H_2O$ i stavljena u plastične epruvete. Epruvete su prekrivene celuloznom vatom koja je učvršćena gumicom radi zaštite uzoraka od onečišćenja metalima prilikom liofilizacije. Liofilizacija uzoraka trajala je 24 sata. Nakon liofilizacije uzorci su izvagani i prebačeni u teflonske epruvete za razgradnju. Izvaganim uzorcima dodano je 2 mL koncentrirane pročišćene dušične kiseline i 2 mL ultračiste vode te su epruvete začepljene pripadajućim čepom od teflona. Uzorci su stavljeni u mikrovalni uređaj UltraCLAVE IV na razgradnju prema pripremljenom programu prikazanom u Tablici 4.

U svakom ciklusu razgradnje uz uzorke su stavljene i dvije epruvete sa slijepom probom (ista količina ultračiste vode od 2 mL i pročišćene dušične kiseline od 2 mL, ali bez uzorka) i jedna epruveta s referentnim materijalom kosti *(Animal bone H-5)* u koju je također stavljena ista količina pročišćene dušične kiseline i ultračiste vode. Slijepa proba i referentni materijal koriste se za kontrolu kvalitete metode razgradnje i mjerenja.

**Tablica 4.** Program za razaranje uzoraka u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV

| **Faza** | **t** / min | **T** / °C | **p** / Pa |
|---|---|---|---|
| 1. | 3,5 | 70 | $1\times10^7$ |
| 2. | 15 | 180 | $1\times10^7$ |
| 3. | 10 | 260 | $1{,}4\times10^7$ |
| 4. | 30 | 260 | $1{,}4\times10^7$ |
| 5. | 40 | 30 | $2\times10^6$ |

Nakon razgradnje uzorci su izvađeni iz mikrovalnog uređaja, ohlađeni na sobnu temperaturu i nadopunjeni do 5 g s ultračistom vodom. Potom su prebačeni u plastične epruvete. Prije mjerenja uzorci su se dodatno razrijedili s 10% dušičnom kiselinom.

### 2.2.4. Pranje laboratorijskog posuđa za razgradnju uzoraka i analizu elemenata

Kako bi se spriječilo vanjsko onečišćenje uzoraka metalima, laboratorijsko posuđe korišteno u pripremi uzoraka i analizi elemenata prije upotrebe je namakano nekoliko sati u detergentu. Potom je isprano vodovodnom i destiliranom vodom. Tako oprano posuđe uronjeno je u 10% $HNO_3$ na 24 sata te isprano ultračistom vodom. Teflonske epruvete korištene u postupku razaranja uzoraka, uz prethodno navedeni postupak pranja, prošle su još i postupak pranja s 50% $HNO_3$ na visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE .

### 2.2.5. Određivanje količina metala u bedrenoj kosti

Količine Ca, Zn, Sr i Pb u razgrađenim uzorcima bedrenih kosti su mjerene tehnikom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (eng. *ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). ICP-MS je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom.

Rezultati mjerenja Ca, Zn, Sr i Pb u standardnom referentnom materijalu kosti (*Animal bone H-5*) bili su unutar preporučenih vrijednosti čime je potvrđena pouzdanost rabljenih metoda i vjerodostojnost izmjerenih količina Ca, Zn, Sr i Pb u uzorcima (Tablica 5).
Granica detekcije metode (GDM) za pojedini element izračunata je kao srednja vrijednost koncentracije slijepe probe kojoj je pribrojen umnožak tri standardne devijacije 10 ponovljenih mjerenja slijepe probe. Dobivena koncentracija podijeljena je s masom tkiva kako bi se dobila vrijednost izražena na kg suhe tvari tkiva te umnožena s faktorom razrjeđivanja.

**Tablica 5.** Granice detekcije metode i rezultati mjerenja referentnog materijala životinjske kosti *Animal bone H-5* korištenog za kontrolu kvalitete.

| **element (mg/kg)** | **GDM** | ***Animal bone H-5*** | | **iskorištenje (%)** |
|---|---|---|---|---|
| | | **certificirana vrijednost (srednja vrijednost (raspon)** | **izmjerena vrijednost (SV±SD)[1]** | |
| Ca | 70 | 212000 (204000-220000) | 210918±1490 | 99 |
| Zn | 15 | 89 (84-95) | 93±0 | 105 |
| Sr | 0,076 | 96 (88-105) | 96±1 | 100 |
| Pb | 0,029 | 3,1 (2,6-3,7) | 3,2±0,1 | 102 |

[1]SV- srednja vrijednost, SD standardna devijacija

## 2.3. Statističke metode

Statističkom analizom u programu Statistica 13.0 provjerila se značajnost razlika između ispitivanih varijabli (prema tipu kosti, lokaciji) i grupa unutar varijabli (dob, spol). Ovisno o rezultatu provjere normalnosti raspodjele varijabli (Kolmogorov-Smirnovljev test) te homogenosti varijance (Leveneov test) između ispitivanih grupa unutar varijabli, primijenio se parametrijski (Studentov t-test za zavisne uzorke) ili neparametrijski (Mann-Whitney U test) test značajnosti razlika. Povezanost varijabli istražila se primjenom Spearmanovog koeficijenta korelacije ($r_S$). Razina značajnosti ($\alpha$) je 5 %.

# 3. Rezultati

## 3.1. Koncentracije metala u bedrenoj kosti smeđeg medvjeda

Rezultati mjerenja koncentracije Ca, Zn, Sr i Pb u dva tipa kosti (spužvasta i kompaktna) na tri lokacije bedrene kosti smeđeg medvjeda prikazani su u Tablici 6. Vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine i standardne devijacije 41 uzorka medvjeda, a izražene su u mg elementa/kg suhe težine kosti.

**Tablica 6.** Koncentracije metala (mg/kg suhe težine kosti) u dva tipa kosti na tri lokacije uzorkovanja bedrene kosti smeđeg medvjeda.

| **lokacija i tip kosti**[1] | **metal (SV ± SD)**[2] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Ca** | **Zn** | **Sr** | **Pb** |
| Asp | 133 046±25 334 | 148±37 | 28,9±9,1 | 3,97±2,37 |
| Bsp | 107 103±24 649 | 122±27 | 23,6±8,6 | 3,16±2,09 |
| Bk | 222 253 ± 24 893 | 197±24 | 48,5±12,3 | 4,47±2,08 |
| Ck | 241 968±23 401 | 186±29 | 52,3±13,3 | 3,64±1,48 |

[1]A - glava bedrene kosti, B - vrat bedrene kosti, C - sredina tijela bedrene kosti, sp - spužvasta kost, k - kompaktna kost

[2]SV - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija

Provjeravanje normalnosti distribucije rezultata je obavljeno Kolmogorov–Smirnov testom koji je pokazao da su vrijednosti Ca i Zn normalno distribuirane ($p>0,05$), za razliku od Sr i Pb koji su transformirani logaritmiranjem nakon čega je dobivena normalna distribucija.

## 3.2. Razlike u sadržaju metala između mužjaka i ženki

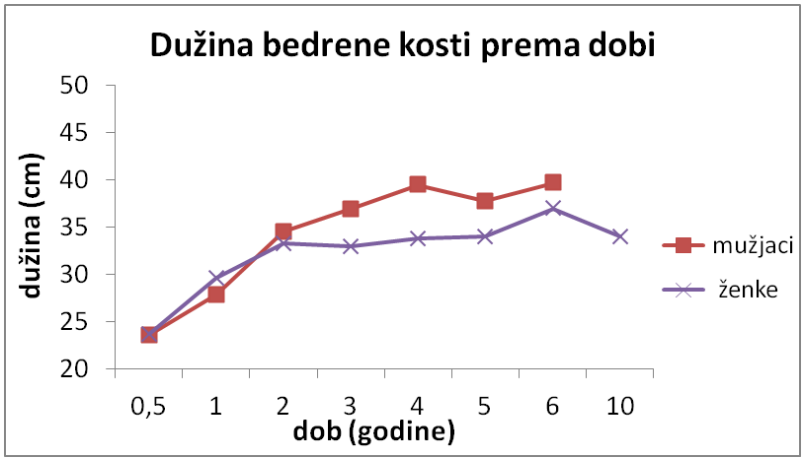
Razlike u sadržaju metala istraživane su u 15 ženki i 26 mužjaka prosječne starosti 2,7 godina. Raspon godina kod ženki kretao se između 0,5 i 10, a kod mužjaka između 0,5 i 7 godina.

Na Slici 6. su usporedno prikazane srednje vrijednosti dužina bedrene kosti u ženki i mužjaka smeđeg medvjeda prema porastu dobi smeđeg medvjeda.

U Tablici 7 su prikazane vrijednosti koncentracija Ca, Zn, Sr i Pb u ženki i mužjaka smeđeg medvjeda te rezultati testiranja razlika između spolova u koncentraciji metala u dva tipa kosti (spužvasta i kompaktna) uzorkovanih na tri lokacije bedrene kosti. Razlike su testirane

Studentovim t-testom, a Mann-Whitney U test je korišten u slučajevima nehomogenosti varijance (metali označeni zvjezdicom u tablici).

Oba testa su pokazala da između spolova nema statistički značajne razlike u koncentracijama metala u oba tipa kosti na ispitivanim lokacijama bedrene kosti.




**Slika 6.** Srednje vrijednosti dužina bedrene kosti mužjaka i ženki u odnosu na dob smeđeg medvjeda.

**Tablica 7**. Razlike u koncentraciji metala u bedrenoj kosti između mužjaka i ženki smeđeg medvjeda[1].

| element (mg/kg) | lokacija i tip kosti[2] | mužjaci (N=26) | ženke (N=15) | značajnost (p) |
|---|---|---|---|---|
| | | (SV±SD) | (SV±SD) | mužjaci *vs.* ženke |
| Ca | Asp* | 131 955±29 776 | 134 937±15 635 | NS |
| | Bsp | 222 587±29 010 | 221 673±16 343 | NS |
| | Bk* | 108 691±27 278 | 104 351±19 858 | NS |
| | Ck | 241 777±25 589 | 242 298±19 878 | NS |
| Zn | Asp | 139±28 | 162±46 | NS |
| | Bsp | 196±26 | 198±21 | NS |
| | Bk | 120±28 | 124±25 | NS |
| | Ck | 181±27 | 195±31 | NS |
| Sr | Asp | 1,44±0,15 | 1,43±0,11 | NS |
| | Bsp* | 1,68±0,11 | 1,65±0,10 | NS |
| | Bk | 1,36±0,18 | 1,31±0,11 | NS |
| | Ck | 1,71±0,11 | 1,69±0,11 | NS |
| Pb | Asp* | 0,520±0,156 | 0,595±0,257 | NS |
| | Bsp* | 0,611±0,144 | 0,618±0,214 | NS |
| | Bk | 0,430±0,169 | 0,451±0,294 | NS |
| | Ck | 0,514±0,149 | 0,560±0,173 | NS |

[1]N - broj životinja; SV - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija; NS - nisu statistički značajne razlike

[2]A - glava bedrene kosti, B - vrat bedrene kosti, C - sredina tijela bedrene kosti, sp - spužvasta kost, k - kompaktna kost

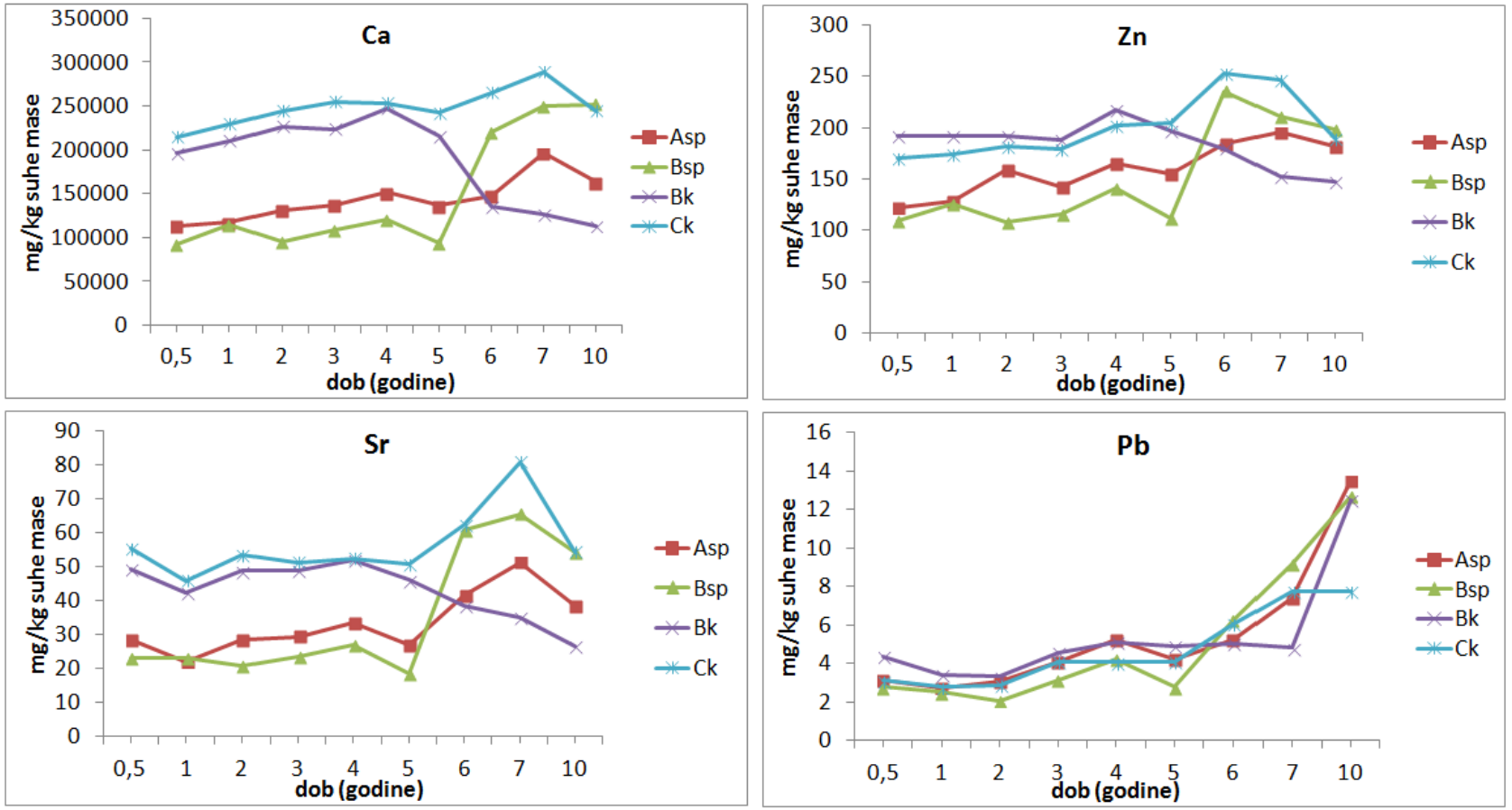
*zbog nehomogenosti varijance razlike između spolova u koncentraciji metala testirane Mann-Whitney U testom

## 3.3. Utjecaj dobi na sadržaj metala

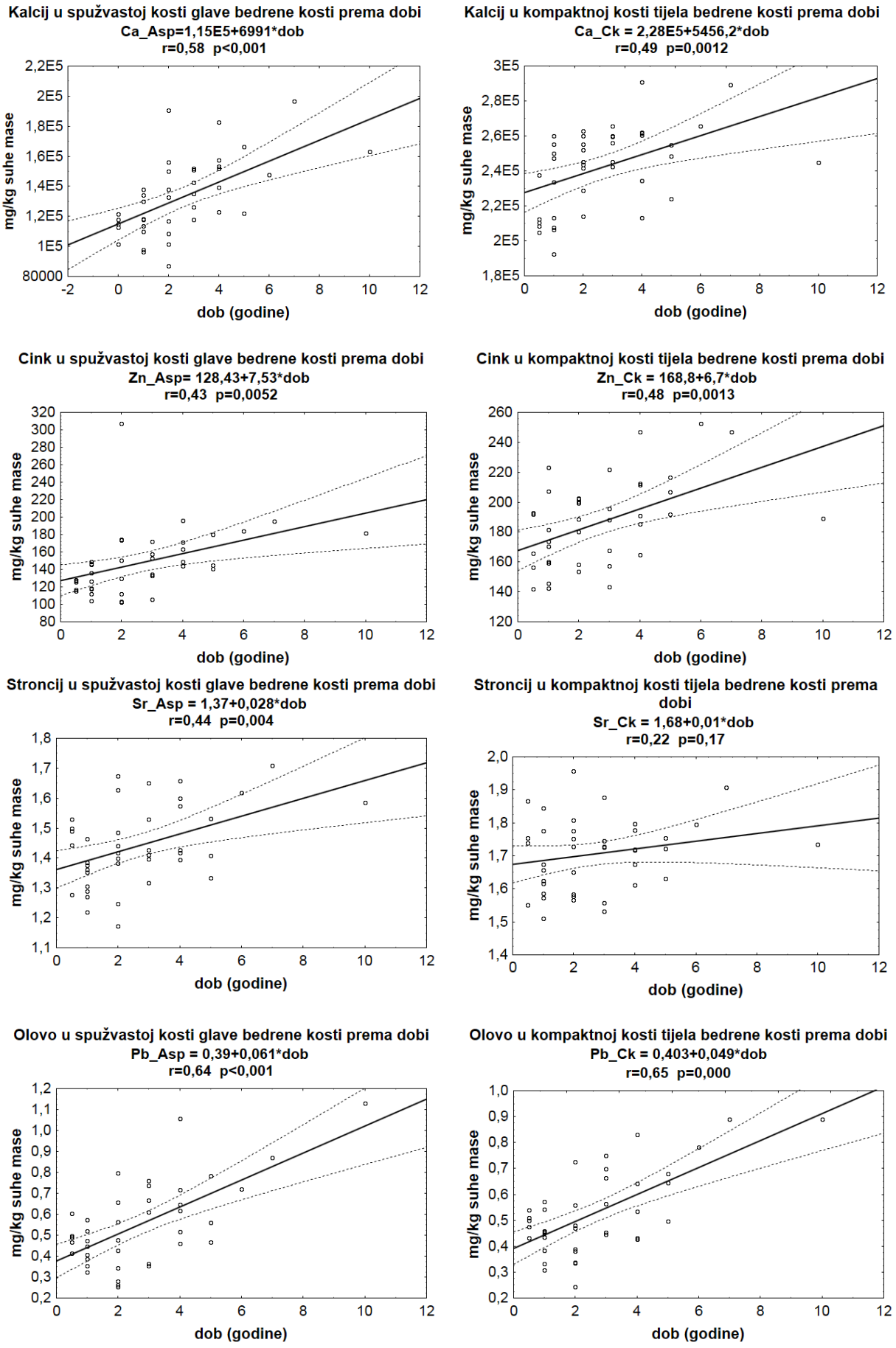
Na Slici 7. su usporedno prikazane srednje vrijednosti koncentracija elemenata Ca, Sr, Zn i Pb u spužvastoj kosti uzorkovane na glavi bedrene kosti i vratu bedrene kosti (lokacije A i B) te koncentracija u kompaktnoj kosti uzorkovane na vratu bedrene kosti i sredini tijela bedrene kosti (lokacije B i C) smeđeg medvjeda prema porastu dobi smeđeg medvjeda.

Slika 8. prikazuje odnos koncentracija Ca, Sr, Zn i Pb u spužvastoj kosti uzorkovanoj na glavi bedrene kosti (lokacija A) te u kompaktnoj kosti uzorkovanoj na sredini tijela bedrene kosti (lokacija C) smeđeg medvjeda i dobi životinja.

Nađena je umjerena pozitivna povezanost ($r_S$=0,5-0,7; $p<0,05$; Hinkle i sur. 2003) između dobi životinja i Ca i Pb u spužvastoj kosti glave bedrene kosti te dobi životinja i Pb u spužvastoj i kompaktnoj kosti vrata bedrene kosti i kompaktnoj kosti sredine tijela bedrene kosti. Slaba pozitivna povezanost ($r_S$=0,3-0,5; $p<0,05$; Hinkle i sur. 2003) je izračunata između dobi životinja i Zn i Sr u spužvastoj kosti glave bedrene kosti, Zn u spužvastoj kosti vrata bedrene kosti, Ca u kompaktnoj kosti vrata bedrene kosti te Ca i Zn u kompaktnoj kosti tijela bedrene kosti




**Slika 7**. Koncentracije elemenata Ca, Zn, Sr i Pb (srednja vrijednost) u odnosu na dob u spužvastoj (sp) i kompaktnoj kosti (k) uzorkovane na glavi bedrene kosti (A), vratu bedrene kosti (B) i sredini tijela bedrene kosti (C) smeđeg medvjeda




**Slika 8**. Odnos između koncentracije metala u spužvastoj kosti glave bedrene kosti (Asp) i

kompaktnoj kosti tijela bedrene kosti (Ck) te dobi smeđih medvjeda. Razina povezanosti izražena je Spearmanovim koeficijentom ($r_S$).

## 3.4. Raspodjela metala između kompaktne i spužvaste kosti

U Tablici 8 su prikazane razlike u koncentraciji metala (srednje vrijednosti i standardne devijacije) između spužvastog i kompaktnog tipa kosti na vratu bedrene kosti medvjeda. Primjena t-testa za zavisne uzorke pokazala je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji svih ispitivanih metala između spužvaste i kompaktne kosti. Veće koncentracije Ca, Zn, Sr i Pb nađene su u kompaktnom tipu u odnosu na spužvasti tip kosti na ispitivanoj lokaciji bedrene kosti (vrat).

**Tablica 8**. Rezultati testiranja razlika u koncentraciji Ca, Zn, Sr i Pb između spužvaste i kompaktne kosti uzorkovane na vratu bedrene kosti (lokacija B) smeđeg medvjeda.

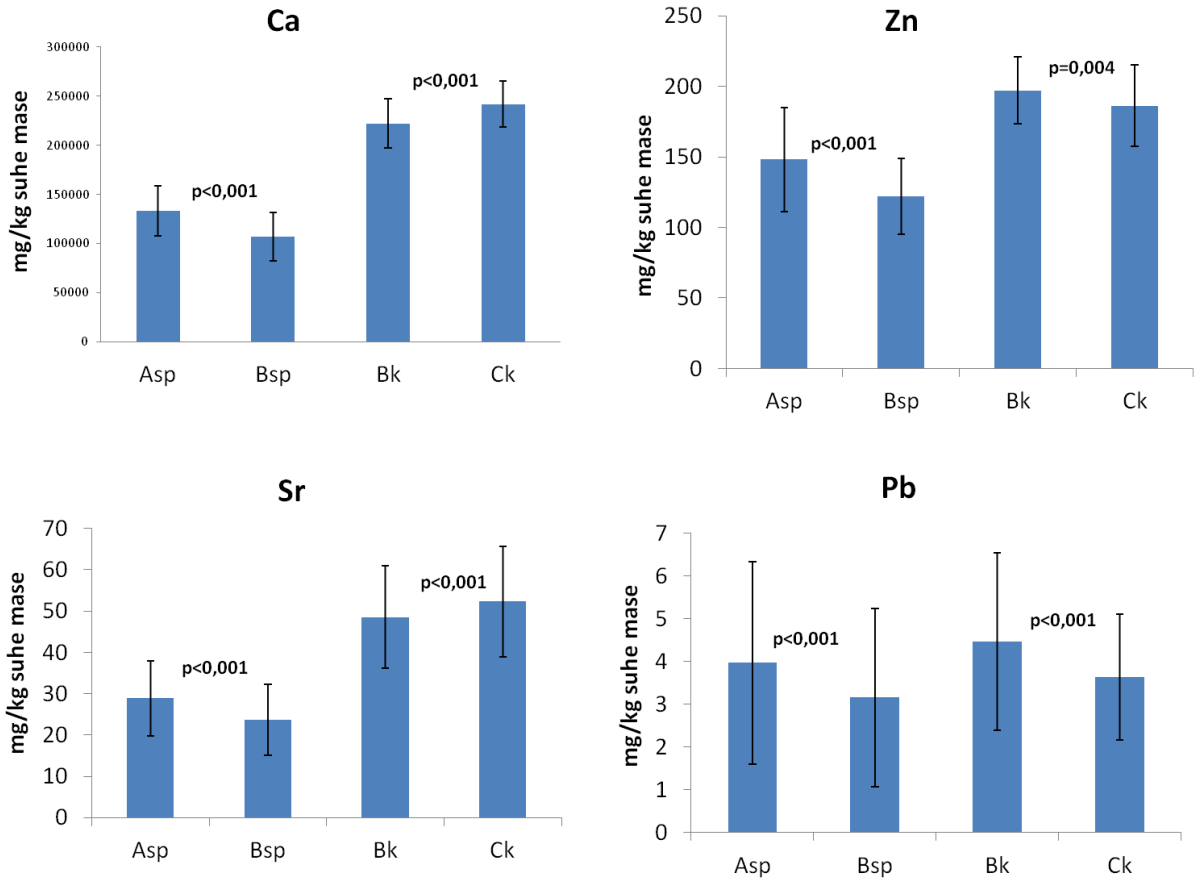
| element mg/kg | tip kosti | (SV±SD)[1] | t-vrijednost | značajnost (p) |
|---|---|---|---|---|
| Ca | spužvasti | 107 103±24 649 | | |
| | kompaktni | 222 253±24 893 | 23,45 | <0.001 |
| Zn | spužvasti | 122±27 | | |
| | kompaktni | 197±24 | 17,61 | <0.001 |
| Sr | spužvasti | 1,35±0,16 | | |
| | kompaktni | 1,67±0,11 | 19,09 | <0.001 |
| Pb | spužvasti | 0,438±0,219 | | |
| | kompaktni | 0,613±0,171 | 10,88 | <0.001 |

[1] SV - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija

## 3.5. Raspodjela metala u ovisnosti o poziciji na kosti

Raspodjela metala između kompaktne i spužvaste kosti na lokacijama glave bedrene kosti (lokacija A), vrata bedrene kosti (lokacija B) i sredine tijela bedrene kosti (lokacija C) prikazana je na Slici 9. (mg /kg suhe mase kosti).

Koncentracije Ca (t=6,59; p<0,001), Zn (t=4,74; p<0,001), Sr (t=6,25; p<0,001) i Pb (t=7,14; p<0,001) u spužvastoj kosti veće su na poziciji glave bedrene kosti (lokacija A) nego na lokaciji vrata bedrene kosti (lokacija B). U kompaktnoj kosti vrata bedrene kosti ima više Zn (t=3,1; p=0,004) i Pb (t=7,3; p<0,001) nego na središnjem dijelu tijela bedrene kosti (lokacija C). Ca (t=-6,34; p<0,001) i Sr (t=-5,17; p<0,001) ima više na središnjem dijelu tijela bedrene kosti nego na vratu kosti.




**Slika 9.** Koncentracije elemenata Ca, Zn, Sr i Pb (srednja vrijednost±standardna devijacija) u spužvastoj (sp) i kompaktnoj (k) kosti uzorkovane na glavi bedrene kosti (A), vratu bedrene kosti (B) i sredini tijela bedrene kosti (C) smeđeg medvjeda. Značajnost razlika (p- vrijednost) između lokacija uzorkovanja u istom tipu kosti testirana je t-testom za zavisne uzorke.

## 3.6. Povezanost toksičnih i esencijalnih metala

Rezultati testiranja povezanosti toksičnih metala Pb i Sr s esencijalnim Ca i Zn u spužvastom tipu kosti glave bedrene kosti i u kompaktnom tipu kosti sredine tijela bedrene

kosti su prikazani u Tablici 9 u obliku Spearmanovog koeficijenta ($r_S$) i pripadajuće razine značajnosti (p).

Pronađena je umjerena pozitivna povezanost ($r_S$=0,5-0,7; p<0,05; Hinkle i sur. 2003) između Ca, Zn i Pb u spužvastom tipu kosti glave bedrene kosti te između Ca, Zn i Sr u spužvastom tipu kosti glave bedrene kosti. Ca i Sr su slabo pozitivno povezani ($r_S$=0,3-0,5; p<0,05; Hinkle i sur. 2003) u kompaktnom tipu kosti sredine tijela bedrene kosti.

**Tablica 9.** Vrijednosti Spearmanovog koeficijenta povezanosti ($r_S$) toksičnih i esencijalnih metala u dva tipa kosti smeđeg medvjeda.

| **element** | **Sr** | | **Pb** | |
|---|---|---|---|---|
| | **spužvasti** | **kompaktni** | **spužvasti** | **kompaktni** |
| Ca | 0,62** | 0,31* | 0,62** | NS |
| Zn | 0,59** | NS | 0,57** | NS |
| Pb | NS | NS | | |
| Sr | | | | |

***statistička značajnost na razini p<0,05; ****statistička značajnost na razini p<0,001; NS nema statističke značajnosti

# 4. Rasprava

U ovom istraživanju prvi put su mjerene razine Ca, Zn, Sr i Pb u kosti smeđeg medvjeda ili ijedne druge vrste medvjeda u svijetu (Tablica 6). Također, ovo je jedno od rijetkih istraživanja u kojem su obuhvaćene i uspoređene razine elemenata u spužvastom tipu kosti i kompaktnom tipu kosti na istoj kosti, što je do sada istraženo kod crvene lisice u bedrenoj kosti za Zn, Sr, Pb (Lanocha i sur. 2012, Budis i sur. 2013).

S obzirom na to da ne postoje dostupni podaci o mjerenju elemenata u medvjeđim kostima, rezultati se uspoređuju s dostupnim istraživanjima drugih velikih i srednje velikih kopnenih sisavaca (Tablica 1). Izmjerena razina Ca i Zn u smeđih medvjeda je u rangu s vrijednostima nađenim u kosti divlje svinje i običnog jelena (Rodríguez-Estival i su. 2013), pirenejskog risa, mungosa, genetke, jazavca (Millán i sur. 2008), crvene lisice (Budis i sur. 2013) i losa (Bjorå i sur. 2001).

Izmjerena razina Zn u smeđeg medvjeda je veća nego kod običnog jelena s područja Hrvatske (Lazarus i sur. 2008). Razina Sr u smeđeg medvjeda u spužvastom tipu kosti je niža u usporedbi s istom regijom kosti kod crvene lisice, ali razine su slične u kompaktnom tipu kosti kod lisice i smeđeg medvjeda (Budis i sur. 2013).

Raspon Pb (1.17-13.5 mg/kg suhe težine) izmjeren u kosti smeđeg medvjeda je istog reda veličine kao i kod divlje svinje (Kuiters 1996; Rodríguez- Estival i sur. 2013), običnog jelena (Kuiters 1996) i pirenejskog risa (Millán i sur. 2008). Međutim, srednje vrijednosti izmjerene kod crvene lisice (Millán i sur. 2008; Lanocha i sur. 2012), mungosa, genetke, jazavaca (Millán i sur. 2008), običnog jelena (Lazarus i sur. 2008; Rodríguez- Estival i sur. 2013), i losa (Bjorå i sur. 2001) su otprilike 10 puta niže nego u smeđeg medvjeda. Izmjerena razina (srednja vrijednost) Pb u kosti smeđeg medvjeda je u rasponu normalne razine (1-7 mg/kg suhe težine) za kosti domaćih životinja (konj, svinja, govedo) (Puls 1994).

Za razliku od mekih tkiva smeđeg medvjeda ( Lazarus i sur. 2014, Lazarus i sur. 2017), u kosti nisu pronađene razlike između spolova u razinama elemenata kod smeđeg medvjeda s područja Hrvatske (Tablica 7). Isto je uočeno i za kosti španjolskih divljih mesoždera (Millan i sur. 2008). Mogući razlog izostanka razlika u razini elemenata u kostima između spolova je taj što je kost relativno inertno tkivo u usporedbi s npr. bubrezima i manje je vjerojatno da će reflektirati interakcije spolnih hormona s elementima kao što je to primjećeno za meka tkiva smeđeg medvjeda (Lazarus i sur. 2018).

Ženke smeđeg medvjeda rastu uglavnom do spolne zrelosti, dok se rast mužjaka produžuje i nakon spolnog sazrijevanja (Bartareau i sur. 2011). Spolni dimorfizam je uočen i u ovom istraživanju, u trendu rasta duljine bedrene kosti u odnosu na porast dobi smeđih medvjeda (Slika 6), kao i kod polarnih medvjeda u trendu porasta duljine tijela (Derocher i sur. 2005).

Rast i izgradnja kosti je intenzivna kod mladih životinja, a novo formirana kost manje je mineralizirana od one starije (Jee 1983). Pošto mineralizacija podrazumijeva ugradnju elemenata u kost, proporcionalan rast dobi i razine elemenata uočena u ovom istraživanju je očekivana. Kompaktni tip kosti ima veći mineralizirani volumen (Jee 1983) pa je povezanost razine elemenata i dobi više očita u kompaktnom tipu nego u spužvastom tipu kosti.

Dosljedno sklonosti nakupljanja u kostima (Ma 2011), Pb je pronađeno u višim razinama u odraslim jedinkama u usporedbi s mladim životinjama i povećavalo se u kostima sa starenjem medvjeda (Slika 7, Slika 8). U odraslih se veća količina (95 %) tjelesnog Pb skladišti u kosturu u odnosu na kostur mladunčeta (75 %) (ATSDR 2007, Ma 2011). Uočeni trend nakupljanja Pb u kostima s porastom starosti životinje u ovom istraživanju su u suglasnosti s nakupljanjem Pb u mekim tkivima smeđeg medvjeda iste populacije (Lazarus i sur. 2017).

Pronađene su značajno veće razine elemenata u kompaktnom tipu bedrene kosti u odnosu na spužvasti tip (Tablica 8, Slika 9) koje odražavaju različite strukturne i metaboličke značajke ovih regija kosti. U spužvastom tipu kosti koštane gredice različitih su dimenzija, a prostore između gredica ispunjava koštana srž. Kompaktna koštana tvar solidne je strukture koja nema šupljine ispunjene koštanom srži (Đudarić i sur. 2014, Jee 1983). Kompaktna tvar ima primarno mehaničku i zaštitnu funkciju kosti dok spužvasta obavlja metaboličku funkciju (Favus i Goltzman 2003). Kompaktna kost je manje metabolički aktivna nego spužvasta (Clarke 2008) što ima za posljedicu i veći mineralizirani volumen (80-90 %) u odnosu na spužvastu tvar (15-25 %) (Jee 1983). Stoga je niža razina Ca (kao i kod ljudi; Castellino i Castellino 1995) u spužvastom tipu kosti u usporedbi s kompaktnim tipom kosti medvjeda očekivana.

Također, niža razina Pb u u spužvastom tipu kosti smeđeg medvjeda je očekivana jer olovo lakše prelazi iz spužvaste kosti u krv zbog brzog remodeliranja spužvaste kosti u odnosu na kompaktni tip kosti u kojoj je poluživot olova 5-10 godina tj. oko 5 puta duži od onog u spužvastoj kosti (Gerhardsson 2004).

Manja mineralizacija spužvastog tipa kosti u usporedbi s kompaktnim tipom uzrok je manjeg sadržaja elemenata koji čine kost, primarno Ca, ali i Zn (Jee 1983).

Lokacija uzorkovanja bedrene kosti (glava *vs*. vrat i vrat *vs.* tijelo) oba tipa kosti, i spužvastog i kompaktnog, pokazala se kao značajan faktor razine elemenata u smeđih medvjeda (Slika 9). Ista razlika je utvrđena u eksperimentu s miševima i štakorima u razini Ca u različitim dijelovima femura. Kod miševa je pronađena viša razina Ca u tijelu bedrene kosti nego u glavi dok je kod štakora bilo više Ca u glavi nego u tijelu bedrene kosti (Zipkin 1970).

U istraživanju raspodjele Pb u bedrenoj kosti koze uočeno je da razina Pb varira između životinja, a kod nekih je postojala tendencija nakupljanja Pb prema kraju kosti (Cretacci i Parsons 2010) kao što je uočeno i u ovom istraživanju sa smeđim medvjedima.

Prema predloženom mehanizmu, elementi u tragovima (Zn, Sr i Pb) se ugrađuju u hidroksiapatit tijekom formiranja kosti kad se osteoid mineralizira napredovanjem fronte mineralizacije (Pemmer i sur. 2013). Pretpostavlja se da Pb ima tendenciju odlaganja na mjestima najveće mineralizacije tijekom rasta (Whittmers i sur. 1988).

Povezanost toksičnih metala Pb i Sr s esencijalnim Ca i Zn je ispitana u spužvastom tipu kosti glave bedrene kosti i u kompaktnom tipu kosti sredine tijela bedrene kosti (Tablica 9) jer su ove regije najčešće korištene u istraživanjima.

Spužvasti tip kosti glave bedrene kosti bolje odražava povezanost elemenata vjerojatno zbog bolje povezanosti s cirkulacijom i višeg stupnja remodeliranja koštane tvari ( Jee 1983). Oba toksična metala su umjereno pozitivno povezana s esencijalnim u spužvastom tipu kosti glave bedrene kosti dok su u kompaktnom tipu kosti sredine tijela bedrene kosti Ca i Sr slabo pozitivno povezani. Interakcija Sr i Ca je vjerojatno posljedica njihove kemijske sličnosti i mehanizma ugradnje Sr u kost tako što zamjenjuje ione Ca (ATSDR 2004; Dermience i sur. 2015). Povezanost Pb osim s Ca je uočena i sa Zn, elementom koji ima esencijalnu funkciju u normalnom razvoju i održavanju homeostaze kosti (Schwalfenberg i Genius 2015).

# 5. Zaključci

U ovom istraživanju po prvi put su izmjerene razine metala u kostima smeđeg medvjeda te ijedne druge vrste medvjeda u svijetu. Korištena bedrena kost smeđeg medvjeda pokazala se kao dobro indikatorsko tkivo za praćenje razine metala i procjenu dugoročne okolišne izloženosti toksičnim metalima (Pb i Sr) te njihov utjecaj na esencijalne elemente (Ca i Zn). Nisu pronađene razlike u sadržaju metala između mužjaka i ženki. Razina elemenata značajno je veća u kompaktnom tipu kosti u usporedbi sa spužvastim tipom bedrene kosti. Jedan od važnih faktora raspodjele elemenata je i pozicija na kosti. Uočeno je da je za istraživanje interakcija između elemenata bolji spužvasti tip kosti gdje su oba istraživana metala (Sr i Pb) pokazala pozitivnu povezanost s esencijalnim elementima kosti (Ca i Zn). Izmjerena razina Pb u kosti smeđeg medvjeda istog je reda veličine kao i kod drugih divljih sisavaca te u rasponu normalne razine za domaće životinje.

# 6. Literatura


Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): 2007. Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, URL:https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22. (pristup 26.5.2017.)

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): 2007. Toxicological profile for Strontium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, URL:https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=120. (pristup 26.5.2017.)

Aufderheide A.C., Wittmers L.E. Jr. (1992): Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. Neurotoxicology **13(4)**: 809-19.

Bartareau T.M., Cluff H.D., Larter N.C. (2011): Body length and mass growth of the brown bear (*Ursus arctos*) in northern Canada: model selection based on information theory and ontogeny of sexual size dimorphism. Canadian Journal of Zoology **89(11)**: 1128-1135.

Berglund M., Åkesson A., Bjellerup P., Vahter M. (2000): Metal-bone interactions. Toxicology Letters **112**–**113**: 219–225.

Bilandžić N., Dežđek D., Sedak M., Đokić M., Šimić B, Rudan N, Brstilo M., Lisicin T. (2012): Trace elements in tissues of wild carnivores and omnivores in Croatia. The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **88**: 94–99.

Bjorå R., Falch J.A., Staaland H., Nordsletten L., Gjengedal E. (2001): Osteoporosis in the Norwegian moose. Bone **29(1)**: 70-73.

Budis H., Kalisinska E., Lanocha N., Kosik-Bogacka D.I. (2013): The concentration of manganese, iron and strontium in bone of red fox *Vulpes vulpes* (L. 1758). Biological Trace Element Research **155**: 361–369.

Castellino N., Castellino P., Sannolo N. (1995): Inorganic lead exposure: Metabolism and intoxication. Fla: Lewis Publishers, Boca Raton Florida.

Clarke B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. Clinical Journal of the American Society of Nephrology **3(3)**: 131–139.

Cretacci Y., Parsons P.J. (2010): Localized accumulation of lead within and among bones from lead- dosed goats. Environmental Research **110(1)**: 26–32.

Čelechovská O., Literák I., Ondruš S., Pospíšil Z. (2006): Heavy metals in brown bears from the central European Carpathians. Acta Veterinaria Brno **75**: 501–506.

Dermience M., Lognay G., Mathieu F., Goyens P. (2015): Effects of thirty elements on bone metabolism. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **32**: 86–106.

Derocher A.E., Andersen M., OW (2005): Sexual Dimorphism of Polar Bears. Journal of Mammalogy **86**: 895–901.

Đudarić L., Cvek S.Z., Cvijanović O., Fužinac-Smojver A., Ćelić T., Martinović D. (2014): Osnove biologije koštanog tkiva. Medicina fluminensis. **50(1)**: 21–38.

Favus M.J. i Goltzman D. (2003): Regulation of Calcium and Magnesium U: Rosen C.J., Seeman E., (ur.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7th edn. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, D.C. USA, str. 104-108.

Gerhardsson L. (2004): Lead. U: Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppler M. (ur.) Elements and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance second edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA Weinheim, str. 879-901.

Hinkle D.E., Wiersma W., Jurs S.G. (2003): Applied statistics for the behavioral sciences, 5th edn, Houghton Mifflin, Boston.

Huber Đ., Jakšić Z., Frković A., Štahan Ž., Kusak J., Majnarić D., Grubešić M., Kulić B., Sindičić M., Majić Skrbinšek A., Lay V., Ljuština M., Zec D., Laginja R., Francetić I. (2008): Plan gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo regionalnog razvoja, šumarstva i vodnoga gospodarstva, Uprava za lovstvo i Ministarstvo kulture, Uprava za zaštitu prirode: Zagreb.

Jalšovec D. (2005): Sustavna i topografska anatomija čovjeka. Školska knjiga, Zagreb.

Jie L., Goyer R.A., Waalker M.P. (2008): Toxic Effects of Metals. U: Klaassen C.D. (ed) Casarett and Doull's Toxicology The Basic Scienc of Poisons, 7th edn. McGraw-Hill Companies, USA, str. 931-981.

Jee W.S.S. (1983): The skeletal tissues. U: Weiss L (ed) Histology: Cell and Tissue Biology, 5th edn. Elsevier Biomedical, New York, str. 206-254.

Junqueira C.L. i Carneiro J. (2005): Basic Histology: Text and Atlas. McGraw-Hill Professional, New York.

Kuiters A.T. (1996): Accumulation of cadmium and lead in red deer and wild boar at the veluwe, the netherlands. Veterinary Quarterly **18(3)**: 134-135.

Lanocha N., Kalisinska E., Kosik-Bogacka D.I., Budis H., Noga-Deren K. (2012): Trace metals and micronutrients in bone tissues of the red fox *Vulpes vulpes* (L., 1758). Acta Theriologica **57**: 233-244.

Lanocha N., Kalisinska E., Kosik-Bogacka D.I., Budis H., Sokolowski S., Bohatyrewicz A. (2013): Comparison of metal concentrations in bones of long-living mammals. Biological Trace Element Research **152(2)**: 195-203.

Lazarus M., Orct T., Blanuša M., Vicković I., Šoštarić B. (2008): Toxic and essential metal concentrations in four tissues of red deer (*Cervus elaphus*) from Baranja, Croatia. Food Additives & Contaminant Part A **25(3)**: 270-283.

Lazarus M., Prevendar Crnić A., Bilandžić N., Kusak J., Reljić S. (2014): Cadmium, lead, and mercury exposure assessment among Croatian consumers of free-living game. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **65**: 281- 292.

Lazarus M., Sekovanić A., Orct T., Reljić S., Kusak J., Jurasović J., Huber Đ. (2017): Apex predatory mammals as bioindicator species in environmental monitoring of elements in Dinaric Alps (Croatia). Environmental Science and Pollution Research **24(30)**: 23977-23991.

Lazarus M., Sekovanić A., Orct T., Reljić S., Jurasović J., Huber Đ. (2018): Sexual maturity and life stage influences toxic metal accumulation in Croatian brown bears. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **74(2)**: 339- 348.

Ma W.C. (2011): Lead in mammals. U: Beyer W.N., Meador J.P. (ur.) Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, str. 595–608.

McGee-Lawrence M.E., Wojda S.J., Barlow LN, Drummer T.D., Castillo A.B., Kennedy O., Condon K.W., Auger J., Black H.L., Nelson O.L., Robbins C.T., Donahue S.W. (2009): Grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*) and black bears (*Ursus americanus*) prevent trabecular bone loss during disuse (hibernation). Bone **45**: 1186–1191.

Millán J., Mateo R., Taggart M.A., López-Bao J.V., Viota M., Monsalve L., Camarero P.R., Blázquez E., Jiménez B. (2008): Levels of heavy metals and metalloids in critically endangered Iberian lynx and other wild carnivores from Southern Spain. Science of the Total Environment **399**: 193-201.

Nganvongpanit K., Buddhachat K., Piboon P., Klinhom S. (2016): The distribution of elements in 48 canine compact bone types using handheld X-ray fluorescence. Biological Trace Element Research **174**: 93–104.

Pemmer B., Roschger A., Wastl A., Hofstaetter J.G., Wobrauschek P., Simon R., Thaler H.W., Roschger P. , Klaushofer K. , Streli C. (2013): Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. Bone **57**: 184–193.

Pors Nielsen S. (2004): The biological role of strontium. Bone **35**: 583–588.

Puls R (1994): Mineral levels in animal health. Diagnostic data. Sherpa International, Clearbrook.

Rodríguez-Estival J., Martinez-Haro M., Monsalve-González L., Mateo R. (2011): Interactions between endogenous and dietary antioxidants against Pb-induced oxidative stress in wild ungulates from a Pb polluted mining area. Science of the Total Environment **409**: 2725–2733.

Rodríguez-Estival J., Álvarez-Lloret P., Rodríguez-Navarro A.B., Mateo R. (2013): Chronic effects of lead (Pb) on bone properties in red deer and wild boar: Relationship with vitamins A and D3. Environmental Pollution **174**: 142-149.

Scheuhammer A.M. (1991): Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. Environmental Pollution **71(2-4)**: 329-375.

Schwalfenberg GK, Genuis SJ (2015): Vitamin D, essential minerals, and toxic elements: Exploring interactions between nutrients and toxicants in clinical medicine. The Scientific World Journal **2015**: 318595.

Solgi E., Ghasempouri S.M. (2015): Application of Brown Bear (*Ursus arctos*) Records for Retrospective Assessment of Mercury. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, **78**: 342–351.

Stoneberg R.P., Jonkel C.J. (1966): Age determination of black bears by cementum layers. J Wildl Manage **30**: 411-414.

Wiechuła D., Jurkiewicz A., Loska K. (2008): An assessment of natural concentrations of selected metals in the bone tissues of the femur head. Science of the Total Environment **406**: 161-167.

Wittmers L.E. Jr., Aufderheide A.C., Wallgren J., Rapp G. Jr., Alich A. (1988): Lead in bone. IV. Distribution of lead in the human skeleton. Archives of Environmental Health **43(6)**: 381-391.

Woshner V.M., O'Hara T.M., Bratton G.R., Beasley V.R. (2001): Concentrations and interactions of selected essential and non-essential elements in ringed seals and polar bears of arctic Alaska. Journal of Wildlife Diseases **37**: 711–21.

Zipkin I. (1970): The Inorganic Composition of Bones and Teeth. U: Schraer H (ur.) Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects. Springer, Boston, MA, str. 69-89.

Zorčić Cvek S., Bobinac D., Đudarić L., Cvijanović O. (2015): The remodeling of the skeleton . Medicina Fluminensis **51**: 482–49.

Internetski izvori:

Slika 1:

http://www.lcie.org/Large-carnivores/Brown-bear (pristup 23.1.2018.)

Slika 4:

https://classconnection.s3.amazonaws.com/523/flashcards/1182523/png/femur1331054408726.png (pristup 2.6.2017.)

# 7. Životopis

Rođena sam 22. listopada 1992. u Bjelovaru . Osnovnoškolsko obrazovanje završila sam u OŠ Garešnica. Završila sam prirodoslovnu gimnaziju u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga 2011. godine i upisala preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, upisala sam 2015. godine. Pedagoško-psihološkodidaktičko-metodičku izobrazbu na Filozofskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisala sam 2017. godine. U okviru studija odradila sam stručnu praksu u Ekotoksikološkom laboratoriju Zoologijskog zavoda na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studijskog obrazovanja sudjelovala sam u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ 2012. i 2014. godine. Aktivna sam članica Udruge studenata biologije – BIUS, u čijem sam radu sudjelovala od 2013. godine kao članica, a od 2014. godine kao voditeljica Sekcije za alge. Sudjelovala sam u istraživačko-edukacijskim projektima „Grabovača 2014.“, „Papuk 2015.“ i „Insula Tilagus 2017.“. Sudjelovala sam na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja 2015. godine kao izlagač, a 2016. godine kao sudionik. Istraživanje za diplomski rad provela sam na Institutu za medicinska istraživanja u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam pod vodstvom dr.sc. Maje Lazarus v.znan.sur. i suvodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.