

Biokemijski mehanizmi sinteze spolnih hormona u domaćih životinja

Gamulin, Erika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:843863>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Erika Gamulin

BIOKEMIJSKI MEHANIZMI SINTEZE SPOLNIH HORMONA
U DOMAĆIH ŽIVOTINJA

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Marku Samardžiji i izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin što su omogućili izradu ovog rada pod svojim vodstvom. Hvala vam na izdvojenom vremenu i strpljenju, kao i na vašim stručnim i kvalitetnim savjetima koji su doprinijeli izradi ovog diplomskog rada.. Također se zahvaljujem na svojoj potrebnoj literaturi te ugodnoj suradnji.

Iznimnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na pruženoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom školovanja. Hvala vam što ste bili uz svaki moj prolaz i pad i što ste vjerovali u mene. Naučili ste me da upornost i trud može dovesti do krajnjeg cilja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PRINCIPI HORMONSKE REGULACIJE	2
3. SINTEZA I OSLOBAĐANJE HORMONA	5
4. STERIDOGENEZA	6
4.1. UVOD	6
4.2. TRANSKRIPCIJSKA KONTROLA STERIDOGENEZE	7
4.2.1. Hormonska regulacija ekspresije StAR mRNK u gonadama	7
4.3. BIOKEMIJSKI PROCES I POSTTRANSLACIJSKA REGULACIJA	8
4.3.1. Kompleks cijepanja bočnog lanca kolesterola	8
4.3.2. StAR	9
4.3.3. StAR neovisna steroidogeneza	12
5. STERIDOGENI ENZIMI	13
5.1. CITOKROM P ₄₅₀ STERIOD HIDROKSILAZA	13
5.2. 3 β -HIDROKSISTERIOD DEHIDROGENAZA/ Δ 5, Δ 4-IZOMERAZA (3PHSD)	13
5.3. FEREDOKSIN	14
5.4. ENZIM CIJEPANJA BOČNOG LANCA KOLESTEROLA (P450 _{scc})	14
5.5. 17 α -HIDROKSILAZA/C-17 α ,20 LIAZA (P450 _{c17})	14
5.6. 21-HIDROKSILAZA (P450 _{c21})	14
5.7. AROMATAZA (P450 _{aro})	15
5.8. 5 α -REDUKTAZA	15
5.9. 17-KETOSTERIOD REDUKTAZA (AKR1C3)	15
6. MUŠKI SPOLNI HORMONI – ANDROGENI	17
6.1. UVOD	17
6.2. KEMIJSKA GRAĐA	18
6.3. BIOSINTEZA ANDROGENIH HORMONA	18
6.4. KATABOLIZAM ANDROGENA	20
6.5. ENZIMI SINTEZE TESTOSTERONA	20
6.5.1. Testosteron 5 α -reduktaza	20
6.5.2. Aromataza	21
7. ŽENSKI SPOLNI HORMONI	22
7.1. ESTROGENI	22
7.1.1. Kemijska građa	22
7.1.2. Biosinteza estrogena	23
7.1.3. Metabolizam estrogena	24

7.2.	PROGESTERON	25
7.2.1.	Kemijska građa.....	26
7.2.2.	Biosinteza i metabolizam progesterona.....	26
7.2.3.	Regulacija sinteze progesterona i 17β -estradiola u krava	27
8.	ZAKLJUČAK	28
9.	SAŽETAK	29
10.	SUMMARY	30
11.	POPIS LITERATURE	31
12.	ŽIVOTOPIS	35

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet
Klinika za porodništvo i reprodukciju i Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Predstojnik Klinke: prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori: prof. dr. sc. Marko Samardžija
izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

1. UVOD

Goveda su, kao jedne od najrasprostranjenijih životinja diljem svijeta, predstavnici izuzetno gospodarski važnih životinja. Prema podacima Hrvatske poljoprivredne agencije, u Republici Hrvatskoj je u 2017. godini registrirano 467.853 grla goveda. Govedarstvo u Hrvatskoj ima dugu tradiciju te prostorne resurse koji omogućuju razvoj i primjenu reproduktivnog menagementa u svrhu najveće iskoristivosti životinje. Rasplodivanje goveda je osnova govedarstva, a detekcija estrusa predstavlja ishodište dobrog menagementa u govedarstvu. Krava je poliestrična životinja što znači da se ciklička aktivnost jajnika odvija neprekidno tijekom godine. Spolni ciklus krava i junica se sastoji od četiri osnovne faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (ARTHUR i sur., 1997.) Estrus je predstavlja fazu spolnog ciklusa koja je najviše podložna utjecaju čovjeka. Upravo zbog toga TOMAŠKOVIĆ i sur. (2007.) navode da su dva sustava regulacije uključena u proces rasplodivanja sisavaca: endokrini i živčani sustav koji imaju specifičnu ulogu. Endokrinologija rasplodivanja se bavi proučavanjem endokrinih žlijezda, hormona koje proizvode te njihove funkcije u reproduktivnom ciklusu životinje.

U svom radu STARLING (1909.) tvrdi kako su hormoni skupna oznaka kemijskih signalnih tvari. Hormoni se sintetiziraju i izlučuju iz endokrinih žlijezda u malim količinama; potom odlaze u krvotok gdje su dalje transportirani u udaljene ciljne organe (tzv. tkivna specifičnost) putem kojih se reguliraju biokemijski procesi u organizmu. U reproduktivnom pogledu, u sustavu kontroliranja sinteze hormona primarnu ulogu imaju: hipofiza, epifiza, gonade (jajnici i testisi) te posteljica (placenta) tijekom graviditeta. Uz navedene organe, postoje još i druge endokrine žlijezde koje imaju određeni utjecaj na endokrinologiju rasplodivanja kao što su: nadbubrežne žlijezde, štitnjača, maternica i hipotalamus. U ženskom organizmu stvaraju se dva, po fiziološkom djelovanju, različita tipa hormona: estrogeni (folikularni hormoni) i gestageni (hormoni žutog tijela). Jajnici imaju dvije osnovne funkcije: germinativna i endokrina. Jajnici novorođenog telea sadrže oko 150.000 primordijalnih folikula; svaki taj folikul sadrži jajnu stanicu koja je okružena jednoslojnim epitelom *theca interna*. Razvoj folikula je intraovarijski i sve do puberteta folikuli se razvijaju do stupnja u kojem će sadržavati *thecu internu*, a zatim započinje njihova artrezija. Spolni hormoni, njihova fiziološka sekrecija te djelovanje su osnova za reprodukciju. U ovom diplomskom radu biti će pobliže objašnjeni biokemijski procesi nastanka spolnih hormona i njihov učinak na organizam životinje.

2. PRINCIPI HORMONSKE REGULACIJE

U organizmu djeluju dva sustava sinergistički koji kontroliraju rast i djelovanje organa, tkiva i stanica, a to su: živčani i endokrinološki sustav. Živčana povezanost služi prijenosu informacija koje se provode u sekundama, dok je humoralna povezanost putem svojih medijatora mnogo sporija, ali glavna funkcija je uspostavljanje i održavanje određenih uvjeta u organizmu. Hormoni se dijele u četiri skupine prema mjestu nastanka i načinu djelovanja na ciljne organe:

- A) NEUROSEKRECIJSKI HORMONI – sintetiziraju ih neurosekrecijske živčane stanice, a do svojih ciljnih organa dopijevaju krvotokom („endokrini mehanizam regulacije“)
- B) GLANDULARNI HORMONI – sinteza se odvija u žlijezdama, potom ulaze u krvotok
- C) AGLANDULARNI HORMONI – sintetiziraju se u specijaliziranim stanicama koje mogu biti rasprostranjene u više tkiva; nazivaju se još i „tkivni hormoni“; do ciljnih organa dopijevaju difuzijom u intersticijskom prostoru („parakrini mehanizam regulacije“)
- D) MEDIJATORSKE TVARI – hormonima slični spojevi čija se sinteza odvija unutar mnogih stanica koje ih i izlučuju, ali djeluju samo lokalno jer se brzo razgrađuju (KARLSON, 1993.)

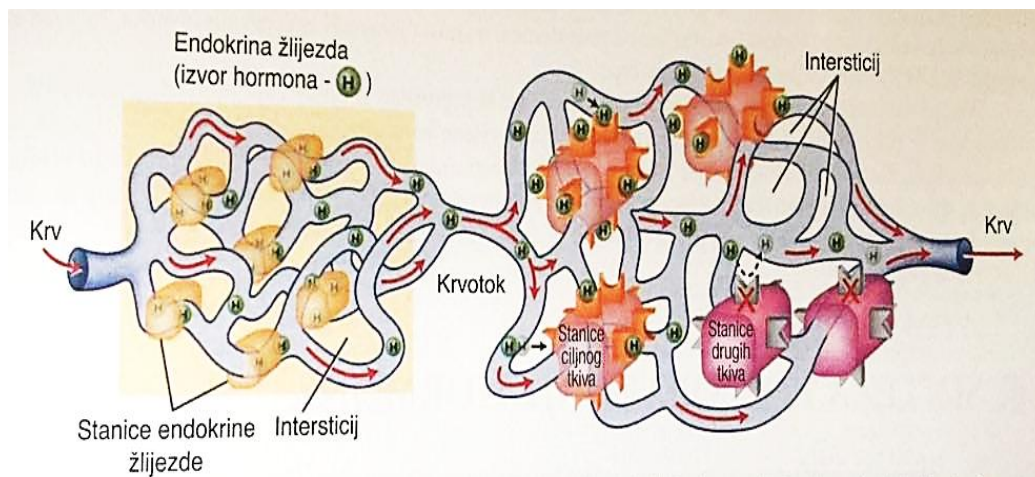
Podjela hormona prema kemijskoj strukturi je na oligopeptide i proteine (tzv. proteohormoni), derivate aminokiselina te steroide. Biosinteze peptidnih i steroidnih hormona se uvelike razlikuju, a glavne karakteristike će biti objašnjene u narednim poglavljima.

Poznate su dvije primarne reakcije djelovanja hormona: steroidni hormoni djeluju ponajprije na kontrolu aktivnosti gena, tj. transkripciju i hormoni koji reagiraju s nekim drugim membranskim receptorom da bi izazvali proizvodnju drugog glasnika koji tada prenosi djelovanje u unutrašnjost stanice (RUPIC, 2015.)

Steroidi su izvedeni iz strukture fenantrenog prstena na koji je pričvršćen pentanski prsten; to daje potpuno hidrogeniziran oblik, ciklopentano-perhidrofenantren ili strukturu sterana. U sustavima sisavaca, postoji šest obitelji steroidnih hormona koji se mogu klasificirati na strukturnoj i biološkoj (hormonskoj) osnovi. Oni su estrogini i progestini (ženski spolni steroidi), androgeni (muški spolni steroidi), mineralokortikoidi (aldosteron), glukokortikoidi (kortizol) i vitamin D. Svi navedeni steroidi nastaju iz kolesterola.

Glavna struktura prstena za kolesterol je potpuno zasićena kolestanska struktura prstena. Steroidni hormoni su topljivi u mastima tako da mogu ulaziti u sve stanice tijela, jer lipidne stanične barijere ne predstavljaju barijeru. Određene reakcije tkiva zahtijevaju prisutnost određenih receptora u stanicama za određeni steroidni hormon. Vezanje hormona za receptor je primarni zadatak u aktivnosti samog hormona. Interakcija vezanja prouzroči biološku reakciju hormona. Svi receptori su definirani kriterijem ograničenog kapaciteta vezanja – receptori su zasićeni što dovodi do ograničenja broja molekula hormona koje mogu ući u stanicu, kriterijem vezivanja s određenim hormonima te kriterijem stvaranja reakcije nakon vezivanja.

Steroidni hormoni u stanice ulaze putem pasivne difuzije te se vežu na stanice. Pri samom ulasku u ciljnu stanicu, steroid komunicira sa svojim receptorom te dolazi do stvaranja kompleksa steroid – receptor. Kompleks je aktiviran i mijenja ekspresiju gena. Ciljna stanica odgovara povećanjem RNK sinteze s prijenosom specifičnog mRNK koji ulazi u citoplazmu te dolazi to sinteze proteina. Učinak steroidnih hormona na ciljnim stanicama je izmijenjena funkcija stanica povezana s promjenom u uzorku proteinske sinteze.

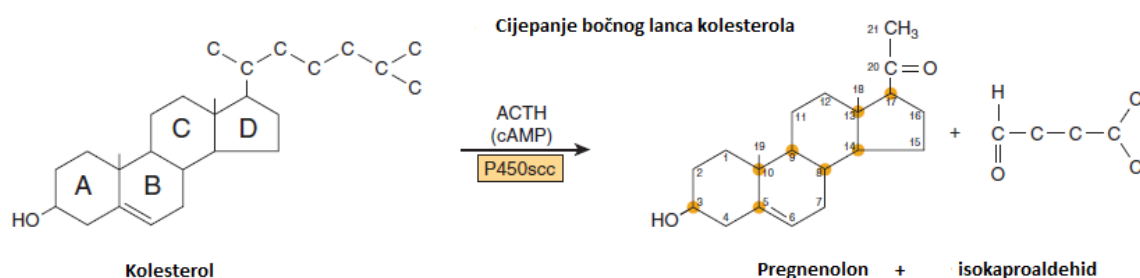


Slika 1. Vezivanje hormona na ciljna tkiva (RUPIC, 2015.)

Proteinski hormoni poput luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH) ne ulaze u ciljnu stanicu radi manifestacije svojih učinaka, nego radi komunikacije s njihovim receptorima lociranim na plazmatskim membranama stanice. Vezanje izaziva

mijenjanje konformacije receptora koji je integralni protein membrane. Prilikom toga, dolazi do aktivacije jednog ili više „drugih glasnika“.

„Drugi glasnici“ su tvari čija koncentracija unutar ciljane stanice poraste zbog djelovanja primarnog hormona, a opće značenje se im se očituje u tzv. efektu pojačavanja. Osnovna zadaća im je prijenos hormonskog signala kroz membranu i provođenje tog signala kroz metabolizam stanice. Smatraju se aktivatorima unutar staničnih enzima, proteinskih kinaza, koji će utjecati na kolesterol u mitohondiju i konverziju u pregnenolon.



Slika 2. Kolesterol se pretvara u pregnenolon putem enzima P450scc – cijepanje bočnog lanca kolesterola (RODWELL i sur., 2015.)

3. SINTEZA I OSLOBAĐANJE HORMONA

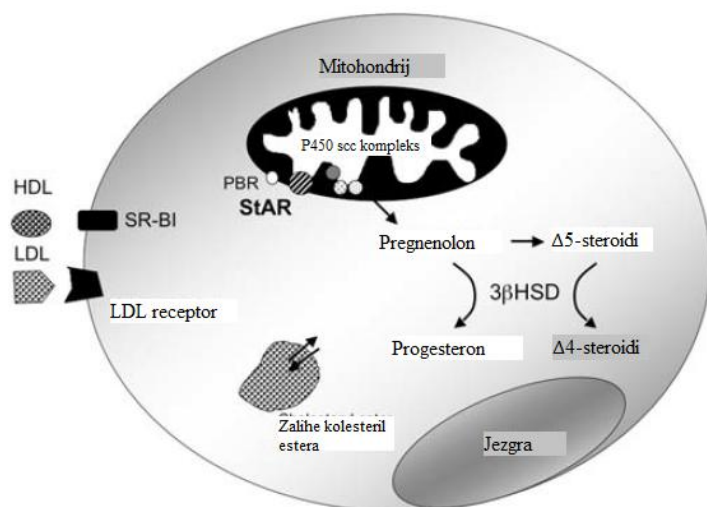
Regulacijski ciklus proizvodnje spolnih hormona je složen proces, a svi mehanizmi se odvijaju preko veze hipotalamus – hipofiza – jajnici. Kako navode TOMAŠKOVIĆ i sur. (2007.) važan utjecaj imaju i ekstrapitalamički centri (kora velikog mozga, talamus i primozak) na koje djeluju olfaktorni, zvučni, svjetlosni i taktilni utjecaji iz okoline. U adenohipofizi pod utjecajem hipotalamusa dolazi do sinteze gonadotropnih hormona (FSH i LH) uz pomoć specifičnih gonadotropnih releasing hormona (GnRH). GnRH su peptidni hormoni koji putem portalnog krvotoka dolaze u adenohipofizu. Hipotalamus je centar s dvije funkcije: epizodično – tonična i pulzatorna. Epizodično – tonični centar regulira sekreciju bazalne koncentracije gonadotropnih hormona, dok pulzatorni kontrolira porast koncentracije LH i posljedično izazivanje ovulacije. Gonadotropni hormoni djeluju na jajnike, folikuli rastu i sazrijevaju, pri čemu dolazi do porasta razine estrogenih hormona. Jajnici putem negativne povratne sprege inhibiraju djelovanje epizodično – toničnog centra što dovodi do smanjene sekrecije GnRH za gonadotropne hormone.

Sinteza ženskih steroidnih hormona ovisi o funkciji jajnika. Koncentracije progesterona se u luteolizi brzo smanjuju (GREENSPAN i BAXTER, 1994.). Razina estrogena kontinuirano se brzo povećava tijekom folikularne faze ciklusa smanjujući se s nadolaznim predovulacijskim povećanjem gonadotropina nakon što granulosa umjesto estrogena počne proizvoditi progesteron. Steroidi su eliminirani konjugacijom s glukaronskom kiselinom i/ili sulfatima kako bi formirali mono- ili diglukoronide ili sulfate. Navedeni konjugati su topljivi, a ekskrecija se odvija preko urina ili žuči. Konjugacija se pojavljuje većinom u jetri, a konjugati nemaju nikakve steroidne aktivnosti. Steroidi su zbog pretvorbe u spojeve koji se uvelike smanjili biološku aktivnost, neaktivni. Na ovaj se način steroidi brzo oslobađaju iz krvotoka. U većini slučajeva stupanj oslobađanja od steroida relativno je stalan tako da su koncentracije krvi relativno dobar pokazatelj fluktuacije u brzini proizvodnje.

4. STEROIDOGENEZA

4.1. UVOD

Steroidogeneza u reproduktivnim tkivima je važan proces i zbog toga je visoko reguliran na razini transkripcije, post-transkripcije i post-translacije (CHEDRESE, 2009.). Spolni steroidni hormoni sintetiziraju se u Leydigovim stanicama testisa, theca stanicama i granulosa stanicama folikula jajnika. Osim toga, druga mjesta biosinteze steroida obuhvaćaju placentu, koru nadbubrežne žlijezde i mozak. U steroidogenim stanicama kolesterol se transportira u mitohondrije putem steroidogenog akutnog regulacijskog hormona (StAR). Unutar mitohondrija, enzim citokrom P₄₅₀ (P₄₅₀scc) cijepa bočni lanac kolesterola i pretvara ga u pregnenolon – steroid iz kojeg nastaju ostali spolni steroidni hormoni (CHEDRESE, 2009.). Stoga, prisutnost P₄₅₀scc određuje stanicu kao steroidogenu. Leydig, theca, lutealni i placentalni trofoblasti posjeduju dodatno 3 β -hidroksisteroid-dehidrogenazu/ Δ 4- Δ 5 izomerazu (3 β -HSD) koji pretvara pregnenolon u progesteron. 3 β -HSD također pretvara 17 α -hidroksipregnenolon, dehidroepiandrosteron (DHEA) i androstenediol u 17 α -hidroksiprogesteron, androstenedion i testosteron. Steroidogeneza u gonadama je regulirana faktorima rasta i gonadotropinima, kao što je luteinizirajući hormon (LH). Razlog povećane proizvodnje steroida je povećana transkripcija steroidogenih enzima i steroidogeni akutni regulatorni protein (engl. Steroidogenic acute regulatory protein; StAR). Mijenja se poluživot nekih steroidogenih mRNK kao odgovor na hormonalne signale. Posttranslacijske modifikacije utječu i na aktivnost odabranih proteina uključenih u steroidogenezu (CLARK i sur., 2001.). Ovaj dio opisuje transkripcijsku i posttranslacijsku regulaciju proteina koji posreduju u prvim koracima steroidogeneze u stanicama gonada: StAR, P₄₅₀scc i 3 β -HSD.



Slika 3. Steroidogeneza i sinteza progesterona iz kolesterola (CHEDRESE, 2009.)

4.2. TRANSKRIPCijsKA KONTROLA STEROIDOGENEZE

4.2.1. Hormonska regulacija ekspresije StAR mRNK u gonadama

S obzirom na važnost StAR-a u pokretanju steroidogeneze, njezina regulacija postala je središte opsežnih studija. LH ili njegov homolog stimulira StAR mRNK ekspresiju u mnogim steroidogenim stanicama uključujući theca, luteiniziranu granulozu, luteal i Leydigove stanice.

Tijekom razvoja folikula u jajnicima, StAR mRNK i proteini su izraženi u theca-intersticijskim stanicama većine vrsta, ali ne u stanicama granuloze dok ne počne veće izlučivanje LH. PESCADOR i sur.. (1996.) dokazali su da su krave jedan od mogućih izuzetaka, gdje je jedna studija pokazala da se StAR mRNK izražava u stanicama granuloze većih antralnih folikula. Međutim, BAO i GARVERICK (1998.) su u svojoj studiji na govedima dokazali da je StAR ekspresija ograničena na stanice granuloze nerazvijenih antralnih folikula. S povećanjem LH, StAR se dramatično povećava i nastavlja biti snažno izražen u diferenciranim theca i stanicama granuloze koje tvore *corpus luteum*. Steroidogene stanice granuloze održavaju se i povećavaju StAR ekspresiju nakon ovulacije.

Folikulostimulirajući hormon (FSH) potiče ekspresiju StAR mRNK u granuloznim stanicama koje prolaze kroz luteinizaciju, ali čini se da to ne čini u neluteinizirajućim folikulima. U granulozu stanicama, FSH može oponašati djelovanje LH na StAR gen. Ovisno o vrsti i tipu stanica, određeni faktori rasta mogu ili izravno djelovati na razine StAR mRNK ili promijeniti djelovanje gonadotropina na transkripciju StAR gena. Na primjer, IGF-1 (inzulinu sličan faktor rasta 1) umjereno potiče ekspresiju StAR mRNK u granulozu stanica u svinja i dodatno povećava gonadotropnu i cAMP stimulaciju StAR-a (SEKAR i sur., 2000.). IGF-1 povećava i akumulaciju StAR mRNK prouzročenu hCG-om u primarnim Leydigovim stanicama štakora i mišjim tumoroznim (mLTC-1) Leydigovim stanicama. S druge strane EGF (epidermalni faktor rasta) ne utječe na ekspresiju StAR gena u granuloznim stanicama svinja; međutim, može suzbiti FSH ili cAMP stimulaciju StAR mRNK. EGF zato povećava razine StAR transkripcije u mLTC-1 stanicama i pri najvećim koncentracijama povećava hCG i cAMP stimulaciju StAR mRNK (MANNA i sur., 2002.). Ove studije otkrivaju da gonadotropini i faktori rasta imaju neke zajedničke učinke na StAR gen, dok su drugi specifični za pojedine stanice. Brojni drugi hormoni i faktori rasta također pozitivno ili negativno reguliraju razine StAR mRNK u steroidogenim stanicama gonada (CHEDRESE, 2009.).

4.3. BIOKEMIJSKI PROCES I POSTTRANSLACIJSKA REGULACIJA

4.3.1. Kompleks cijepanja bočnog lanca kolesterola

Prvi enzimski korak u steroidogenezi je pretvorba kolesterola u pregnenolon pomoću P450_{scc} (MILLER, 2005.). Enzim, nekad poznat kao 20,22-desmolaza, provodi ovaj korak u matriksu s unutarnje membrane mitohondrija. Pregnenolon je proizvod tri uzastopne monooksigenacije koje su katalizirane uz pomoć P450_{scc}: 2 hidroksilacije bočnog lanca kolesterola do nastanka, najprije 22R-hidroksikolesterola, a zatim 20 α ,22R-dihidroksikolesterola i konačno cijepanje veza između ugljika 20 i 22 kako bi se oslobodili pregnenolon i 4-metilpentanska kiselina (isocaproic acid). Svaki korak zahtijeva 2 redukcijska ekvivalenta dobivena od flavoproteina NADPH-adrenodoksin reduktaze/feredoksin reduktaze, željezo-sumporni protein adrenodoksin/adrenalni feredoksin. Zajedno s P450_{scc} tvore CSCC (kompleks cijepanja bočnog lanca kolesterola). Adrenodoksin reduktaza koristi NADPH kako bi smanjila svoju skupinu flavin adenin dinukleotid (FAD) i vezala adrenodoksin. Zatim, ovaj enzim prenosi 2 elektrona iz FADH₂ u skupinu željezo-sumpor adrenodoksina. To potiče disocijaciju adrenodoksina na mjestu vezanja reduktaze i oslobađanje molekule za interakciju s P450_{scc} (LAMBETH i sur., 1982.).

Vezivanje kolesterola pomoću P450_{scc} potiče vezanje adrenodoksina i prijenos elektrona iz adrenodoksina na hem prsten za prvu reakciju hidoksilacije. Smanjeni adrenodoksin, po mogućnosti, veže oksidirani P450_{scc}-supstrat te tako potiče napredovanje reakcije cijepanja bočnog lanca. Budući da je P450_{scc} prisutan u suvišku u odnosu na druge sudionike CSCC, dostupnost reduciranog adrenodoksina i učinkovitost prijenosa elektrona određuje koliko se brzo odvija reakcija cijepanja bočnog lanca. Prema tome, adrenodoksin i adrenodoksin reduktaza prisutni su u višim količinama u steroidogenim tkivima nego u drugim vrstama tkiva u tijelu (BRENTANO i sur., 1992.).

Poput P450_{scc}, razine adrenodoksina povećavaju se stimulacijom cAMP putova u citotrofoblastima (dio trofoblasta), stanicama kore nadbubrežne žlijezde, stanicama jajnika fetusa i ljudskim fetalnim stanicama nadbubrežne žlijezde i testisa. Razine adrenodoksina i adrenodoksin reduktaze istodobno rastu s P450_{scc} u kultiviranim štakorskim granuloznim stanicama, a razine adrenodoksina i P450_{scc} rastu tijekom lutealne faze u jajnicima krava te na taj način osiguravaju zalihe redukcijskih ekvivalenata (RODGERS i sur. 1986.). Adrenodoksin se povećava s P450_{scc} u stanicama jajnika fetusa i ljudskim fetalnim stanicama nadbubrežne žlijezde i testisa. Usporedno, razina adrenodoksin reduktaze u ljudskoj posteljici

je toliko niska da ograničava brzinu proizvodnje pregnenolona. Stvaranje mitohondrijske NADPH povezano je s poticanjem trofičkih hormona tako što se povećava kalcij. Sastav lipida unutarnje membrane mitohondrija dodatno utječe na aktivnost P450_{scc}. Posebno je fosfolipidni kardiolipin uključen u poboljšanje vezanja kolesterola pomoću P450_{scc} i u stvaranju kontaktnih mjesta za kolesterol na enzimu.

Sinteza steroida je regulirani proces. Kod nedostatka stimulacije, stanice mogu proizvesti malo ili ništa steroida unatoč prisutnosti P450_{scc}. Dodavanje hidroksiliranog oblika kolesterola kao što je 22R-hidroksikolesterol, koji se slobodno raspršuje u mitohondrije, odmah se pretvara u steroid. To pokazuje da je CSCC konstantno aktivan i ograničava ga samo opskrba kolesterol supstrata. Ovo je ograničavajući korak u stvaranju steroida i provodi ga StAR (STOCCO i CLARK, 1996.).

4.3.2. StAR

Radi se o specifičnom proteinu koji prenosi kolesterol, a smatra se esencijalnim posrednikom prijenosa kolesterola u mitohondrij i posljedične aktivacije P450_{scc} (NORMAN i HENRY, 2014.). Nakon stimulacije trofičkih hormona, StAR se brzo sintetizira i odlazi u mitohondrije, gdje posreduje u prijenosu kolesterola iz vanjske mitohondrijske membrane u unutarnju - siromašnu kolesterolom i P450_{scc}. Egzogeno izražavanje ovog proteina u Leydigovim tumorskim stanicama rezultira proizvodnjom steroida u odsutnosti stimulacije. Ako se stanice potiču na stvaranje steroida u prisutnosti inhibitora sinteze proteina, StAR nije proizveden (KRUEGER i ORME-JOHNSON, 1983.), kolesterol se ne prenosi na unutarnju membranu te je steroidogeneza zaustavljena (FERGUSON, 1963.).

Stoga, akutna faza steroidogeneze ovisi o intermembranskom prijenosu kolesterola putem StAR-a. Produžena konstantna stimulacija, rezultira bogatom opskrbom kolesterola u unutarnjoj membrani. U ovoj fazi stupanj steroidogeneze ovisi o kapacitetu sustava, npr. razini P450_{scc} i dostupnosti redukcijских ekvivalenata. Djelovanje StAR-a proizlazi iz stimulacije putova povezanih s cAMP, protein kinazom C, kloridom i kalcijem. Proizvodnju StAR-a zbog stimulacije cAMP uvelike je potaknuto oslobađanjem arahidonske kiseline. Dok je funkcija StAR-a prilično jednostavna, mehanizam djelovanja ostaje neobjašnjen. StAR je proizveden kao 285-aminokiselinski prekursor s prividnom molekulskom masom od 37kDa (KRUEGER i ORME-JOHNSON, 1983.). Njegov N-terminalni signalni slijed usmjerava

StAR u mitohondrij. Tijekom ulaska, signalni slijed se „razbija“, što dovodi do nastanka zrelih oblika StAR-a od 30 kDa. Jednom kad se nađe unutar mitohondrija, više ne podržava prijenos kolesterola. Ustvari, blokira ulazak StAR-a u mitohondrij tako što briše N-terminal, ali to ne sprječava StAR da potiče steroidogenezu. StAR mora poticati prijenos kolesterola na unutarnju membranu mitohondrija i P450scc dok je izvan mitohondrija. Smatra se da stalna sinteza steroida zahtijeva i stalnu sintezu StAR-a. Kolesterol prisutan u cirkulacijskom sustavu veže se za lipoprotein male gustoće (LDL) te se unosi preko LDL receptora u stanice kore nadbubrežne žlijezde gdje se otpušta. Moguće je, također, da se kolesterol biosintetizira *de novo* iz acetata u endoplazmatskom retikulumu. Slobodni kolesterol može biti esterificiran s acil-koenzimom A kolesterol aciltransferaza (ACAT) i pohranjen u kapljicama lipida. U kori nadbubrežne žlijezde, ACTH stimulira lipazu osjetljivu na hormone (engl. hormone sensitive lipase; HSL) koja izaziva da slobodni kolesterol bude iskorišten u mitohondriju kao supstrat za enzim koji cijepa bočni lanac kolesterola. Određeni StAR proteini pomažu u prijenosu hidrofobnog kolesterola iz vanjske u unutarnju mitohondrijsku membranu gdje se nalazi P450scc (enzim cijepanja bočnog lanca). Stoga, uz pomoć StAR-a, kolesterol se metabolizira u pregnenolon. (NORMAN i HENRY, 2014.)

Postoje različita objašnjenja o tome kako StAR prouzroči prijenos kolesterola. Jedan primjer govori da StAR djeluje s kofaktorima kao što je periferni benzodijapenski receptor (PBR) i anionski kanal ovisan o naponu (VDAC), dok *in vitro* istraživanja pokazuju da StAR može samostalno transportirati kolesterol (BOSE i sur., 2008.).

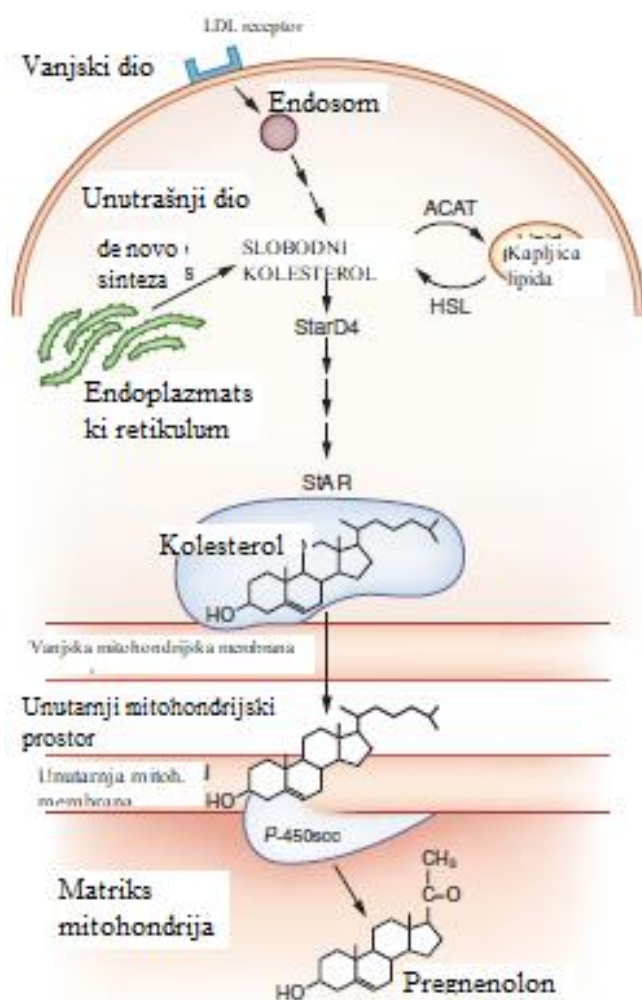
Poznato je da je C-terminalni kraj StAR-a nužan za njegovu funkciju. Ova regija sadrži tzv. lipidnu prijenosnu domenu povezanu sa StAR-om (START), motiv koji je očuvan u velikoj obitelji proteina (PONTING i ARAVIND, 1999.). Sve StAR inaktivacijske mutacije, koje se nazivaju i START domena1 (StarD1), utječu na ovu regiju. Protein slabije kristalizira, ali RTG-ska kristalografska analiza homologa, MLN64, ukazuje da START domena1 oblikuje strukturu koja omogućava vezni džepić za kolesterol. Stoga, StAR može vezati kolesterol na vanjsku membranu i osloboditi ga unutar mitohondrija preko nepoznatog mehanizma na mjestima kontakta između membrana.

Za intermembranski prijenos kolesterola putem StAR-a potrebna je ATP hidroliza i netaknuti elektrokemijski potencijal kroz cijelu unutarnju mitohondrijsku membranu. Ova je aktivnost pojačana fosforilacijom StAR-a preko protein kinaze A (PKA). Djelovanje forbol estera na steroidogene stanice potiče StAR produkciju putem aktivacije proteinske kinaze C, ali StAR nije fosforiliran i steroidogeneza ostaje slaba. Međutim, istodobno dodavanje niskih razina cAMP analoga, prouzroči da se stvoreni StAR fosforilizira i izrazito potiče steroidogenezu u

odsutnosti daljnjih povećanja razina StAR proteina. Mehanizam kojim fosforilacija mijenja aktivnost StAR-a je nepoznat, ali jedno istraživanje pokazuje da povećava stabilnost StAR proteina (CLARK i sur., 2001.).

Modifikacija se, vjerojatno, događa prije unosa. Pretpostavlja se da je PKA vezana za vanjsku membranu mitohondrija putem vezanja njegove R2A regulacijske podjedinice s proteinom 121 A-kinaze (AKAP121) (DYSON i sur., 2008.). Ovakva PKA može pomoći dovesti početni StAR u kontakt s mitohondrijem preko svoje povezanosti s vanjskom membranom.

Postoji i druga, dosad nepoznata modifikacija StAR-a čija je važnost zasad nejasna. Fosforilacija i druga reakcija modifikacija su neučinkovite. Značajan dio StAR-a ostaje nemodificiran ili ima samo jednu promjenu (CHEDRESE, 2009.)



Slika 4. Uloga StAR proteina u cijepanju bočnog lanca kolesterola (NORMAN i HENRY, 2015.)

4.3.3. StAR neovisna steroidogeneza

Steroidogene stanice sadrže druge, obično manje putove za pokretanje sinteze steroida neovisno o StAR-u. Ovi se putovi ne smatraju podložni akutnoj regulaciji i bitni su za osnovnu ili temeljnu sintezu steroida. U određenim slučajevima, ti putovi su važni, kao što je u ljudskoj posteljici, koja proizvodi progesteron u odsutnosti StAR ekspresije. Ukoliko StAR nije prisutan, smatra se da ga može zamijeniti njegov homolog MLN64 (engl. metastatic lymph node 64 protein) ili StARD3 (engl. StAR-related lipid transfer domain protein 3) (STOCCO, 1996., ALPY i sur., 2001.), ali to još uvijek nije dokazano.

Hidroksilirane molekule kolesterola, koje se nazivaju i oksisteroli, uključene su u određeni način steroidogeneze neovisne o StAR-u. Oksisteroli su hidrofilniji od kolesterola i stoga se mogu slobodnije kretati po obje mitohondrijske membrane za izravno pretvaranje u steroid. Budući da se mnoge kolesterolne hidroksilaze smještaju u endoplazmatski retikulum, nije im potreban StAR. Proizvodnja steroida iz oksisterola može biti fiziološki značajna, kao kod testisa gdje rezidentni makrofagi proizvode 25-hidroksikolesterol, koji se potom pretvara u testosteron u susjednim Leydigovim stanicama. Pretpostavlja se da ovaj proces može pomoći izravnom razvoju testisa u ranom životu. Mozak također stvara visoke razine 24-hidroksikolesterola. Oksisterol se smatra važnim za proizvodnju neurosteroida, iako je nakon modifikacije hidroksilna skupina obično sulfatirana (PRASAD i sur., 1984.).

Nakon što se pregnenolon sintetizira, može se dalje metabolizirati pomoću 3β -HSD ili citokroma P450 17α -hidroksilaze/ $17,20$ -liaze (P450c17), ovisno o vrsti i tipu stanice. Oba se enzima nalaze na endoplazmatskom retikulumu, ali se 3β -HSD nalazi i u matriksu unutarnje mitohondrijske membrane. Tamo se povezuje s CSCC, čime se olakšava proizvodnja progesterona. (CHEDRESE, 2009.)

3β -HSD općenito pretvara Δ^5 -3 β -hidroksisteroide u hormonski aktivne Δ^4 -3-ketosteroide. Ovaj proces, koji ovisi o NAD^+ , odvija se u dva koraka: katalizirana dehidrogenacija i izomerizacija dvostruke veze u molekuli steroida, pri čemu je prvi korak s dehidrogenazom ograničen brzinom (PAYNE i sur., 1997.). Poput većine steroidogenih enzima, ona je konstitutivno aktivna. Međutim, nisu sve izoforme jednako aktivne. U glodavaca za razliku od čovjeka, određene izoforme, koje se prije svega javljaju u nesteroidogenim tkivima, samo su $NADPH$ -ovisne 3-ketosteroidne reduktaze koje inaktiviraju steroidne hormone (MASON i sur., 2004.). To čini istraživanje regulacije i uloge ove enzimske obitelji složenijima.

5. STEROIDOGENI ENZIMI

5.1. CITOKROM P₄₅₀ STEROID HIDROKSILAZA

Citokrom P₄₅₀ enzimi su odgovorni za oksidacijske reakcije. P450 enzim je sastavljen od oko 500 aminokiselina i jednog hem-a (molekula koja sadrži željezo i porfirinski prsten). Ovi enzimi prisutni su u jetri, kori nadbubrežne žlijezde, jajniku, testisima, bubregu, placenti, plućima i određenim dijelovima mozga.

Oksidacijsko-redukcijska reakcija katalizirana s P450 funkcionira na slijedeći način: kisikov atom hidroksilne skupine, prikazan kao "krajnji produkt hidroksilacije", može se izvesti iz H₂O ili molekularnog kisika (O₂). Poznato je da je hidroksilni kisik izveden isključivo od molekularnog kisika u svim steroidnim citokrom P450 hidroksilazama. Takvi enzimi su označeni kao oksidaze mješovite uloge. Naziv mješovite uloge znači da jedan atom supstrata kisika (O₂) završava u steroidu, a drugi kao dio vode.

Sve steroidne P450 hidroksilaze su vezane za membranu i prisutne su ili u mitohondriju ili endoplazmatskom retikulumu. Ovisno o tome gdje se nalazi postoje dva načina prijenosa elektrona od NADPH na enzim citokrom P450. Ako se nalazi u mitohondriju postoje tri zasebna dijela: a) flavoprotein dehidrogenaza poznata kao feredoksin oksidoreduktaza, koja prihvata elektrone od NADPH, b) protein željeza koji se ne nalazi u hemu, nazvan feredoksin, koji prihvata elektrone od flavoproteina i prenosi ga na c) protein citokrom P450 hidroksilazu. Ako se nalazi u endoplazmatskom retikulumu, nedostaje feredoksin pa flavoprotein dehidrogenaza prenosi elektrone izravno na citokrom P450 enzim (NORMAN i HENRY, 2014.)

5.2. 3 β -HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZA/ Δ 5, Δ 4-IZOMERAZA (3PHSD)

Drugi prevladavajući steroidni enzim su hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD). Odgovoran je za pretvorbu pregnenolona u progesteron, 17 α -hidroksipregnenolona u 17 α -hidroksiprogesteron, DHEA u androstenedion, androstenediola u testosteron. Svaki HSD sadrži 290-380 aminokiselina koji se koristi za prihvatanje ili davanje elektrona kofaktorima NADH (NADH/NAD⁺ ili NADPH/NADP⁺). Stoga steroidni supstrat daje 2 elektrona NAD⁺. Ključna enzimatska transformacija u biosintezi steroida je cijepanje bočnog lanca kolesterola kojeg prati pretvaranje 5-en,3 β -hidroksisteroida u 4-en,3-oksosteroid. To je posredovano enzimom koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu. Isti enzim je uključen u nadbubrežne žlijezde, jajnike, testise i posteljicu. 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza/ Δ 5, Δ 4 izomeraza ima obavezan kofaktor NAD⁺ (NORMAN i HENRY, 2014.).

5.3.FEREDOKSIN

Feredoksin je protein koji predstavlja prijenosnik elektrona za sumpor/željezo u hidroksilaciji steroida. Sadrži i ugljikov-terminal i amino-terminal. N-terminal ekstenzija služi kao vodeća sekvenca koja olakšava ulazak feredoksin peptida u mitohondrij. Feredoksin prihvata elektrone feredoksin oksidoreduktaze, koja zatim difundira u matriks mitohondrija do P450 hidroksilaze gdje daje par elektrona (NORMAN i HENRY, 2014.)

5.4. ENZIM CIJEPANJA BOČNOG LANCA KOLESTEROLA (P450_{scc})

Primarni enzim koji katalizira cijepanje bočnog lanca kolesterola i tako potiče steroidogenezu je P450_{scc} koji stvara pregnenolon kao svoj produkt. P450_{scc} spada u liaze, koje predstavljaju enzimi koji cijepaju veze između ugljika nosioca hidroksidnih skupina.

P450_{scc} provodi 3 enzimatska koraka koja su povezana s unutarnjom mitohondrijskom membranom. To uključuje odvojene 20R- i 22R-hidroksilacije koje prati cijepanje bočnog lanca na 2 ugljika koji nose novostvorene hidroksilne skupine. Svaki od ovih koraka je oksidacijsko-redukcijska reakcija te su potrebni elektroni dobiveni od NADPH.

5.5. 17 α -HIDROKSILAZA/C-17 α ,20 LIAZA (P450_{c17})

17 α -Hidroksilaza/C-17 α ,20 Liaza (P450_{c17}) predstavlja još jedan enzim koji obavlja i reakciju hidroksilacije i cijepanje C-C (ugljkove) veze, a koji se nalazi na tri mjesta: *zona reticularis* nadbubrežne žlijezde, Leydigovim stanicama testis i theca i granuloza stanicama jajnika (NORMAN i HENRY, 2014.).

5.6. 21-HIDROKSILAZA (P450_{c21})

Hidroksilacija posredovana enzimom 21-hidroksilaza (P450_{c21}) važna je za pretvorbu progesterona u deoksikortikosteron u zoni glomerulosa (mineralkortikoidi) i 17-hidroksi-progesterona u 11-deoksikortizol u zoni fasciculate (glukokortikoid). P450_{c21} se nalazi u endoplazmatskom retikulumu. Njegov nedostatak na genima dovodi do pojave CAH-a (kongenitalne adrenalne hiperplazije) (NORMAN i HENRY, 2014.).

5.7. AROMATAZA (P450aro)

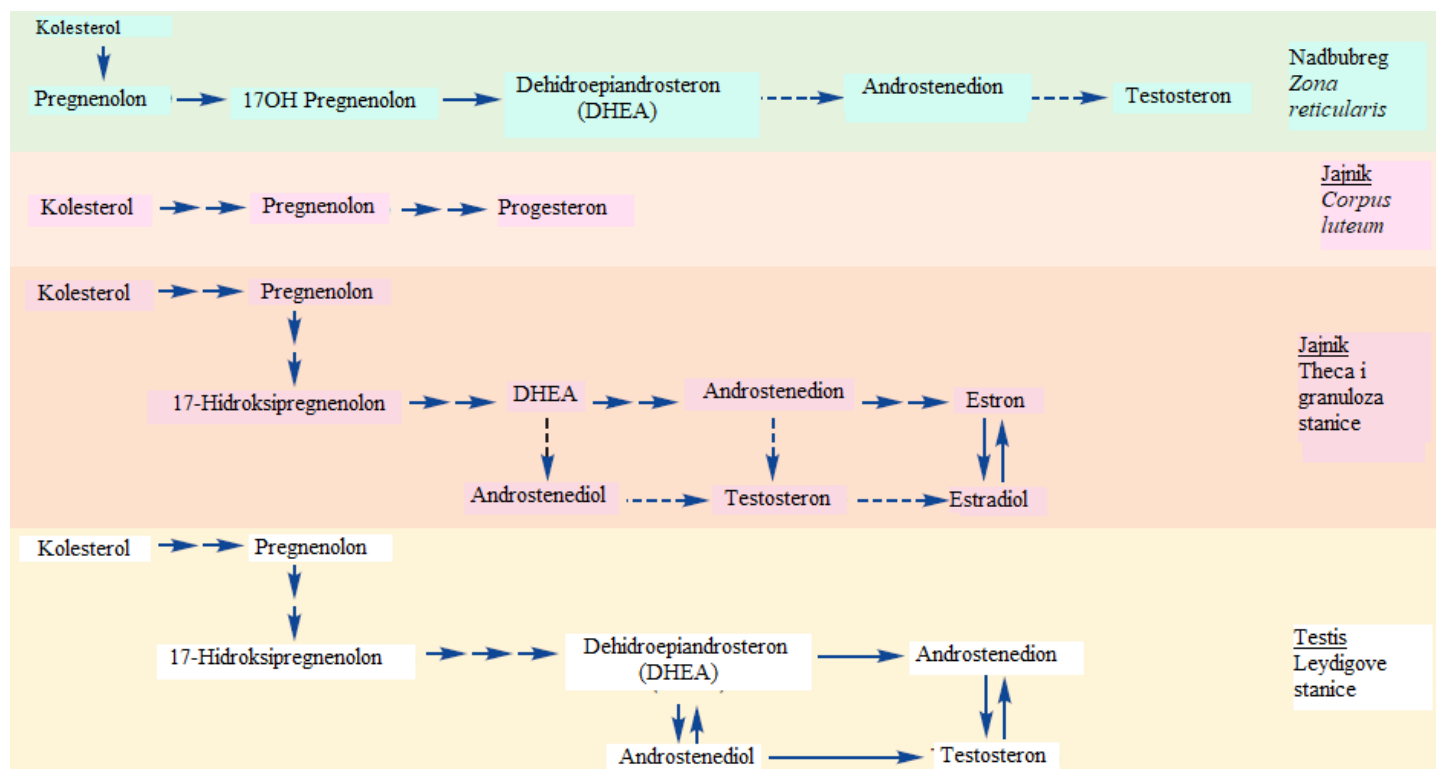
Aromatizacija prstena A, bilo testosterona u estradiol ili androst-4-en-3,17-diona u estron, posredovana je pomoću P450aro. P450aro je prisutan u endoplazmatskom retikulumu jajnika i placente, a u određenoj količini u mozgu, kostima i masnom tkivu (NORMAN i HENRY, 2014.).

5.8. 5 α -REDUKTAZA

Pretvorba testosterona u dihidrotestosteron je posredovana s 5 α -reduktazom. 5 α -reduktaza je NADPH ovisan enzim koji ne pripada P450, a prisutan je u nuklearnoj membrani ciljnih stanica za testostosterone, kao što su: sjemene vrećice, koža epididimisa, folikuli dlake i jetra. Nalazi se u nižim koncentracijama u negenitalnoj koži, testisima i bubrezima (NORMAN i HENRY, 2014.).

5.9. 17-KETOSTEROID REDUKTAZA (AKR1C3)

17-ketosteroid reduktaza (AKR1C3) predstavlja enzim koji ne pripada P450, a nalazi se u endoplazmatskom retikulumu. Za njegovo djelovanje potreban je NADPH, a katalizacijske reakcije su pritom reverzibilne. Nalazi se u testisima, jajnicima i placenti (NORMAN i HENRY, 2014.).



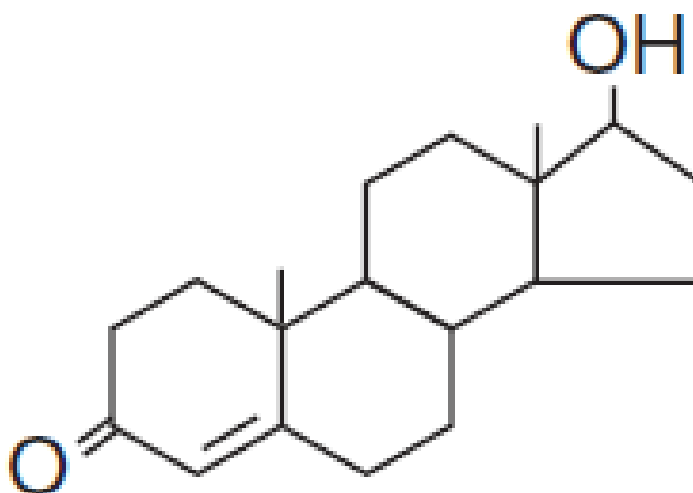
Slika 5. Putovi sinteze steroidnih hormona (NORMAN i HENRY, 2014.)

6. MUŠKI SPOLNI HORMONI – ANDROGENI

6.1. UVOD

Pojam androgen se odnosi na prirodni ili sintetički spoj koji potiče ili regulira razvoj i održavanje obilježja mužjaka. Androgeni se većinom sintetiziraju u testisima, iako i ženke stvaraju manje količine, koje su važne za pozitivnu ravnotežu proteina, održavanje jakih mišića i kostiju te pridonose libidu. Najvažnija dva androgena kojeg izlučuju testisi su: testosteron i 5α -dihidrottestosteron (5α -DHT). Osim njih postoje i dva slabija androgena koji se ponajprije sintetiziraju u kori nadbubrežne žlijezde, a u manjoj mjeri u testisima i jajnicima. To su dehidroepiandrosteron (DHEA) i androstenedion koji se metaboliziraju u testosteron i druge androgene. Istraživanja pokazuju da se najviši nivo testosterona (9.44 ± 5.47 ng / mL) bilježi u plazmi jednogodišnjih muških grla goveda (PLEADIN i sur., 2011.). Postoji zajednički androgeni receptor (AR) na koji se vežu svi androgeni iako se genomski razlikuju. Testosteron je najobilniji, a 5α -DHT najjači androgen (ima veći afinitet za vezivanje na AR) (CHEDRESE, 2009.).

Najvažniji androgeni hormon je testosteron, kojeg stvaraju Leydigove stanice smještene između sjemenih kanalića. Testosteron potiče stvaranje spermija, razvoj spolnih karakteristika mužjaka i rast kostiju i mišićne mase (anaboličko djelovanje). Također, testosteron utječe na psihološki razvoj kod mužjaka kao i na seksualni nagon (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006., SJAASTAD i sur., 2006.).



Slika 6. Kemijska struktura testosterona (RODWELL i sur., 2015.)

6.2. KEMIJSKA GRADA

Hipofiza izlučuje LH koji stimulira intersticijske stanice testisa na stvaranje androgena. Manje se količine stvaraju i u nadbubrežnoj žlijezdi, jajnicima i posteljici. Po kemijskoj strukturi to su steroidi s 19 C – atoma. Imaju dvostruku kovalentnu vezu između C- 4 i C- 5 ili između C- 5 i C – 6 atoma, dok je ta veza reducirana kod dihidrotestosterona (DHT). Metaboliti testosterona (androstandioli) imaju reduciranu dvostruku vezu i hidroksilnu skupinu na C – 3, a metaboliti androstendiona još i ketoskupinu na C – 18. Biološki su najaktivniji testosterona i dihidrotestosteron, a tu aktivnost određuje hidroksilna skupina na C -17 u β – položaju (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).

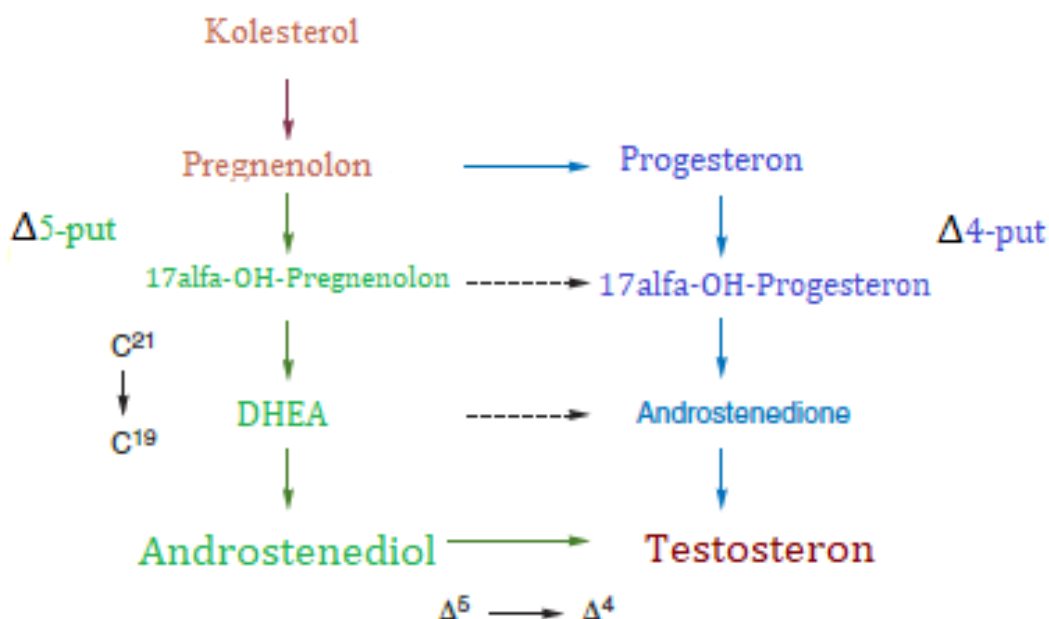
6.3. BIOSINTEZA ANDROGENIH HORMONA

Androgeni se sintetiziraju u Leydigovim stanicama testisa iz acetata i supstrata kolesterola, ugrađenog iz cirkulacije u obliku lipoproteina niske gustoće (LDL). Luteinizirajući hormon (LH) stimulira biosintezu testosterona tako što povećava količinu i prijenos kolesterola. Kolesterol se doprema iz vanjske u unutarnju membranu mitohondrija uz pomoć steroidnog akutnog regulacijskog proteina (StAR). U mitohondriju, kolesterol se pretvara u pregnenolon - prekursor koji je potreban za stvaranje svih steroidnih hormona. Nakon toga se kolesterol s 27 C-atoma cijepa dva puta kako bi se dobio testosteron s 19 C-atoma. Ovaj proces odvija se kroz 5 enzimatskih koraka:

- 1) redukcija bočnog lanca kolesterola uz enzim citokrom P_{450} (P_{450SCC}) kako bi nastao pregnenolon s 21 C-atoma. Ovaj je korak reguliran pomoću LH, koji kontrolira ukupnu sintezu testosterona.
- 2) hidroksilacija/izomerizacija steroida je katalizirana putem 3β -hidroksisteroid-dehidrogenaze/ Δ^4 - Δ^5 izomeraze (3β -HSD). Zbog aktivnosti izomeraze, 3β -HSD preusmjerava sintezu steroida sa Δ^5 -puta na Δ^4 -put. Tako, uporabom 4 različita supstrata: pregnenolona, 17α -pregnenolona, DHEA i androstenediola, 3β -HSD može sintetizirati progesteron, 17α -progesteron, androstenedion i testosteron (CHEDRESE, 2009.).

Kod Δ^5 puta događa se pretvaranje pregnenolona do testosterona, cijepanjem ugljika 20 i 21 koje se događa prije oksidacije 3β -hidroksilne skupine te premještanje duple veze s Δ^5 na Δ^4 mjesto. Kod Δ^4 puta, ova su dva koraka zamijenjena. Δ^5 put prevladava kod ljudi, a Δ^4 put kod glodavaca (NORMAN i HENRY, 2014).

- 3) progesteron se hidroksilira u 17α -hidroksiprogesteron pomoću 17α -hidroksilaze.
- 4) 17α -hidroksilaza pretvara 17α -hidroksiprogesteron s 21 C-atoma u androstenedion s 19 C-atoma.
- 5) 17β -hidroksisteroid dehidrogenaza (17β -HSD) pretvara androstenedion u testosteron (CHEDRESE, 2009.).

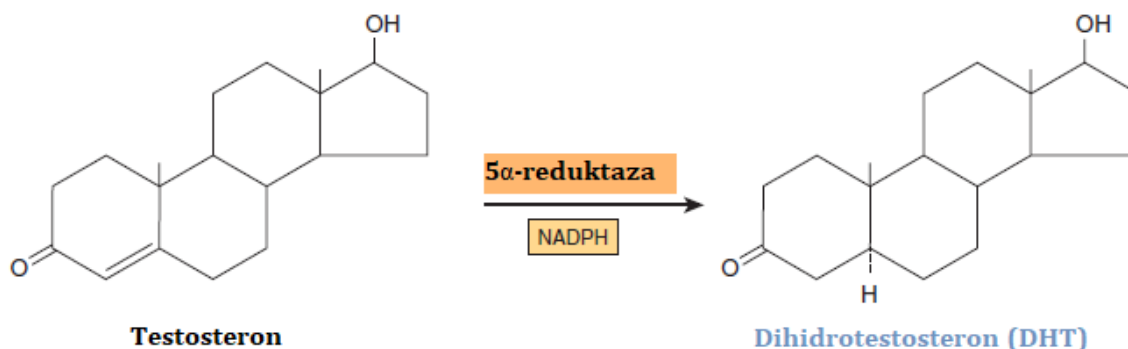


Slika 7. Biosinteza androgena, Δ^5 i Δ^4 put (NORMAN i HENRY, 2014.)

Testosteron ulazi u cirkulaciju vezan za serumski albumin i za globulin koji veže spolne hormone (engl. sex hormone binding globuline; SHBG), glikoprotein koji se većinom stvara u jetri (GRIFFIN i WILSON, 1998.). Oko 2% se disocira od proteina i difuzijom izravno ulazi u stanicu. Testosteron se pretvara u snažniji androgen 5α -DHT pomoću 2 izoenzima: 5α -reduktaza-1 i 5α -reduktaza-2. 5α -reduktaza-1 je kodirana sa SRD5A1 genom smještenog na kromosomu 5 (5p15) i široko je izražen u perifernim tkivima, uključujući kožu, jetru i određene dijelove mozga. 5α -reduktaza-1 pretvara cirkulirajući testosteron u 5α -DHT koji je potreban za rast tkiva posredovan androgenima. 5α -reduktaza-2 je kodirana s 5 eksona strukturalne SRD5A2 gena smještenog na kromosmu 2 (2p23) i ograničen je na izražavanje u tkivima ovisnim o androgenima kao što su genitalije. 5α -reduktaza-2 je odgovorna za lokalno pretvaranje gonadnog testosterona u 5α -DHT. Stoga, izražavanje SRD5A2 gena potrebno je

za normalan razvoj vanjskih genitalija mužjaka i stvaranje urogenitalnog sinusa tijekom fetalne diferencijacije (CHEDRESE, 2009.).

Testosteron je aromatiziran i u estradiol-17 β pomoću citokrom P450 aromataze (P450arom) u perifernom tkivu. Estradiol-17 β je glavni steroidni hormon ženki koji je u manjim količinama potreban mužjacima za održavanje zdravih kostiju, živčano i srčano zdravlje, spermatogenezu i zdrav libido (CHEDRESE, 2009.).



Slika 8. Dihidrotosteron se stvara iz testosterona uz enzim 5 α -reduktazu (RODWELL i sur., 2015.)

6.4. KATABOLIZAM ANDROGENA

Ukupno gledajući, oko 80% cirkulirajućeg 5 α -DHT i estradiol-17 β kod mužjaka dobiveno je perifernom konverzijom. Jetra pretvara cirkulirajuće androgene (testosteron i DHT) u različite metabolite, uključujući androsteron i etiolanolon. Nakon konjugacije s glukuronskom ili sumpornom kiselinom, androgeni metaboliti se izlučuju mokraćom kao 17-ketosteroidi, a predstavljaju 20-30% ukupnih 17-ketosteroida mokraće. Ostatak 17-ketosteroida u mokraći potječe kao metabolizam nadbubrežnih steroida (CHEDRESE, 2009.).

6.5.ENZIMI SINTEZE TESTOSTERONA

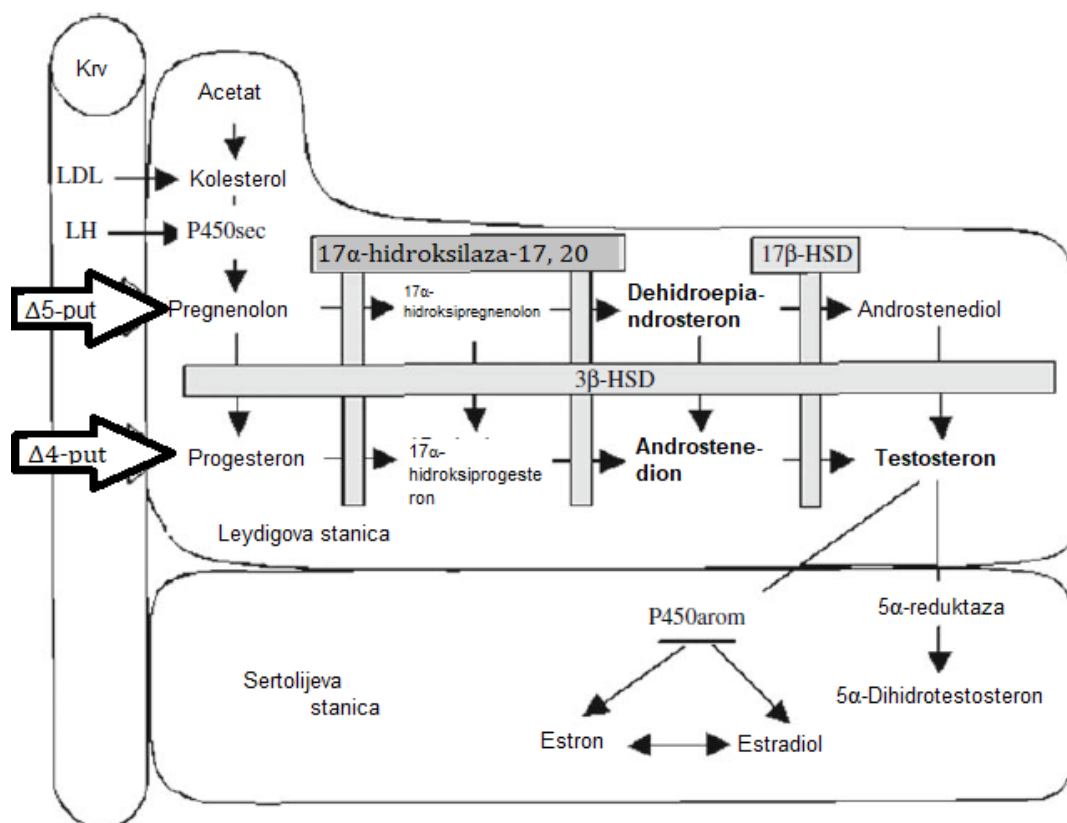
6.5.1. Testosteron 5 α -reduktaza

Enzim odgovoran za pretvorbu testosterona u DHT je Δ 4-3-ketosteroid-5 α -oksidoreduktaza koja zahtijeva NADPH kao kofaktor. U glodavaca i ljudi, postoje dva oblika 5 α -reduktaze. Tip 1 5 α -reduktaza je izražena u koži, jetri i mozgu i smatra se da je odgovorna za

inaktivaciju katabolizma testostosterone. Tip 2 5α -reduktazu nalazimo u prostati i drugim muškim spolnim žlijezdama, folikulima dlaka, jetri i mozgu. Ovo je enzim koji katalizira aktivnost povećanog stvaranja DHT-a. Dvije se reduktaze nalaze na različitim genima. DHT ima veći afinitet prema androgenskom receptoru od testostersona i veću sposobnost u poticanju promjena u ekspresiji gena kada se veže za androgenski receptor (NORMAN i HENRY, 2014.).

6.5.2. Aromataza

Aromatizacija testostersona u estradiol događa se u nekoliko tkiva, uključujući masno tkivo, testise (Sertolijeve i Leydigove stanice), mozak, kosti, jetru i krvne žile. U ovim tkivima androstenedion može biti aromatiziran stvarajući slabi estrogen estron, koji se zatim može metabolizirati u estradiol redukcijom 17-keto skupine putem 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (NORMAN i HENRY, 2014.).



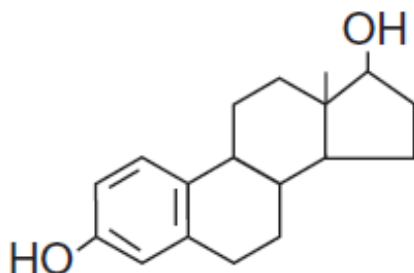
Slika 9. Put biosinteze tesostersona (CHEDRESE, 2009.)

7. ŽENSKI SPOLNI HORMONI

Glavni predstavnici ženskih spolnih hormona su 17β -estradiol i progesteron. Sintetiziraju se iz kolesterola i to putem *corpus luteum* jajnika i placente. Produkcija progesterona od strane *corpus luteum* i estradiola od strane theca i granulosa stanica događa se na slijedeći način; kolesterol je polazna točka za proizvodnju i progesterona i estradiola. Postoje dva puta od dehidroepiandrosterona (DHEA) do 17β -estradiola. Glavni put je preko androst-4-en-3, 17diona i estrona. Drugi put je preko androste-5-en-3 β , 17β -diola i testosterona te predstavlja manji put (NORMAN i HENRY, 2014.).

7.1. ESTROGENI

Estrogeni su ženski spolni hormoni odgovorni za razvoj i održavanje ženskih spolnih organa i sekundarnih spolnih karakteristika. Djeluje zajedno s progesteronom tijekom graviditeta, a osim toga povoljno djeluje na gustoću kostiju (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).



Slika 10. 17β -Estradiol (RODWELL i sur., 2015.)

7.1.1. Kemijska građa

Estrogeni su steroidi s 18 C-atoma i aromatiziranim prstenom A. Nemaju metilnu skupinu na C-10, dok na C-17 imaju ketoskupinu ili hidroksilnu skupinu, a neki imaju hidroksilnu skupinu i na C-16. Svi imaju hidroksilnu skupinu na C-3. Biološku aktivnost hormona uvjetuju fenolni prsten i keto skupina odnosno hidroksilna skupina na C-17. Supstituenti na bilo kojem drugom C-atomu smanjuju njihovu biološku aktivnost pa su estriol s hidroksilnom skupinom na C-16 ili 2-metoksiestron s metoksi-skupinom na C-2 vrlo slabo biološki aktivni, a najaktivniji estrogen je estradiol (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).

17β – estradiol i estron se najvjerojatnije mogu pretvarati jedan u drugog. Oba hormona izlučuju jajnici, a metabolički produkt navedena dva hormona je estron čija se sinteza odvija u jetri. Tijekom graviditeta posteljica izlučuje i do 300 puta više estrogena od jajnika u vrijeme

normalnog spolnog ciklusa. Izlučuje se i u manjim količinama prije spolne zrelosti, da bi se tijekom spolne zrelosti količina povećala oko 20 puta. 17β – estradiol je najvažniji hormon u razvoju sekundarnih spolnih karakteristika. Uglavnom ga izlučuju jajnici te žute tijelo, a u manjoj količini i testisi i nadbubrežna žlijezda (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

7.1.2. Biosinteza estrogena

Estrogeni nastaju na jedinstvenom putu biosinteze steroidnih hormona iz acetata preko kolesterola, pregnenolona, progesterona i androgena. Prsten A testosterona i androstendiona aromatizira se uz enzime iz skupine citokrom P_{450} arom (aromataze). Pri tome se najprije hidroksilira CH_3 -skupina na C-19, što katalizira enzim 19-hidroksilaza. Time nastaju 19-hidroksitestosteron i 19-hidroksiandrostendion, na koje dalje djeluje enzim 19-oksidaza, koja ih prevodi u 19-oksotestosteron, odnosno 19-oksoandrostendion. Na 19-oksotestosteron djeluje enzim C-10,19-liaza pa se odcjepljuje C-19 i vodik na C-1 kao formaldehid, a između C-1 i C-10 nastaje dvostruka veza. Nastali 3-okso-androst-1(10),4-dien spontano se aromatizira u estradiol. Na analogan način nastaje iz androstendiona estron.

Biosinteza u gravidnih jedinki razlikuje se od one u jedinki u reproduktivnoj dobi. U gravidnih životinja je glavni izvor estrogena posteljica. Dok se u jajniku najvećim dijelom stvara estradiol, koji se metabolizira u svoj krajnji produkt estriol, posteljica najvećim dijelom luči već stvoreni estriol. No, ona nema potrebnih enzima za sintezu estrogena iz acetata, kolesterola i pregnenolona, nego se koristi već stvorenim testosteronom i androstendionom u organizmu majke ili fetusa. U posteljici se samo obavlja aromatizacija prstena A za koju ona posjeduje potrebne enzime. Posteljica ne posjeduje ni enzim 16α -hidroksilazu, koja se nalazi u nadbubrežnoj žlijezdi i jetri fetusa. Posteljica prima već gotovi DHEA-S hidroksiliran na C-16, koji je potreban za stvaranje estriola. Izlučivanje estriola tijekom gravidnosti postupno raste i do tisuću puta. Osim enzima potrebnih za aromatizaciju prstena A, posteljica posjeduje i vrlo aktivnu sulfatazu i 5-en- 3β -hidroksisteroid-dehidrogenazu/izomerazu potrebne za hidrolizu 16α -hidroksidehidroepiandrosteron-sulfata i pretvorbu $\Delta 5$ u $\Delta 4$ derivat. Budući da se u fetusu stvara preteča 16α -hidroksidehidroepiandrosteron-sulfat, a u posteljici nastavlja daljnja pretvorba u estriol, smatra se da fetoplacentna jedinica stvara estriol. Zato će poremećaji u fetusu ili u posteljici rezultirati smanjenim stvaranjem estriola pa je izlučivanje estriola u mokraći dobar pokazatelj fetoplacentnog statusa (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).

7.1.3. Metabolizam estrogena

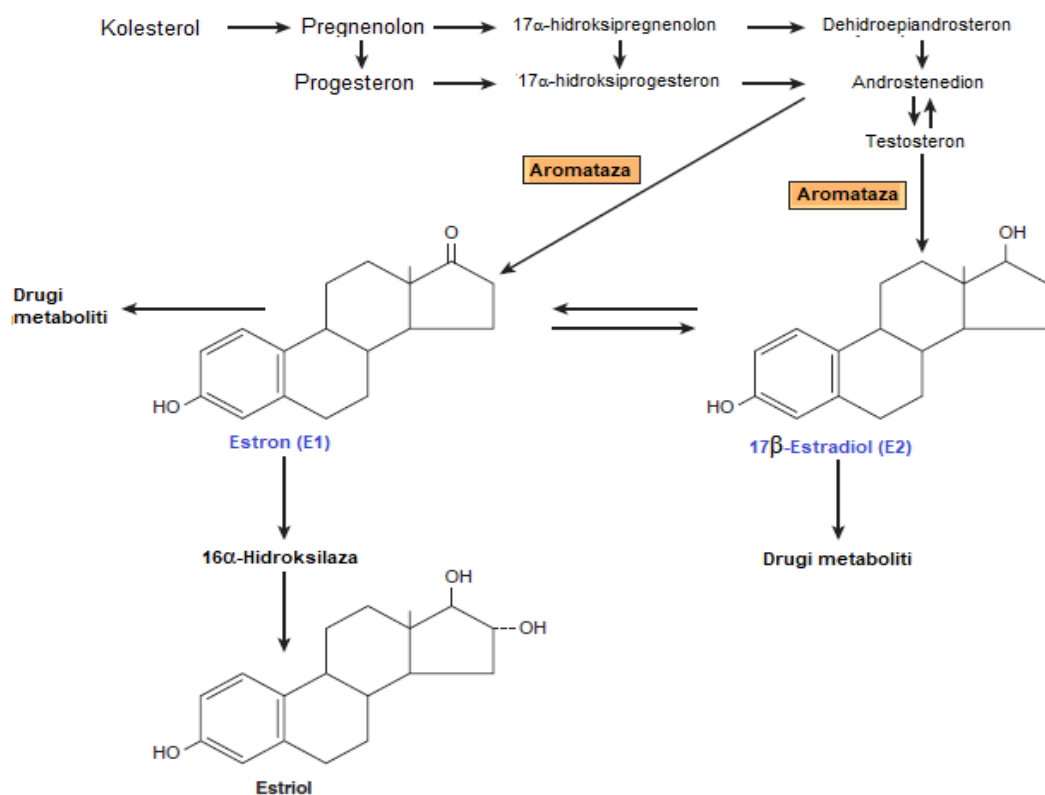
Metabolizam estrogena složeni je proces u kojem se stvara niz derivata, a obavlja se u jetri. Dolazi do slijedećih reakcija:

- oksidoredukcija 17 β -hidroksilne skupine uz enzim estradiol 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenazu (reverzibilna reakcija estron $\leftrightarrow$ estradiol)
- hidroksilacija na C-2 uz kasniju metilaciju (nastaju katekol-estrogeni 2-hidroksiestron, 2-hidroksiestradiol, 2-hidroksiestriol i njihovi odgovarajući metoksi-derivati)
- daljnja hidroksilacija ili stvaranje ketona na C-6 α , C-6 β , C-7 α , C-14 α , C-15 α , C-16 α , C-16 β i C-18

Osim tih, glavnih putova poznati su i sljedeći:

- demetilacija metoksiderivata estradiola, estrona i estriola
- epoksidacija čiji su krajnji produkti estriol i epiestriol

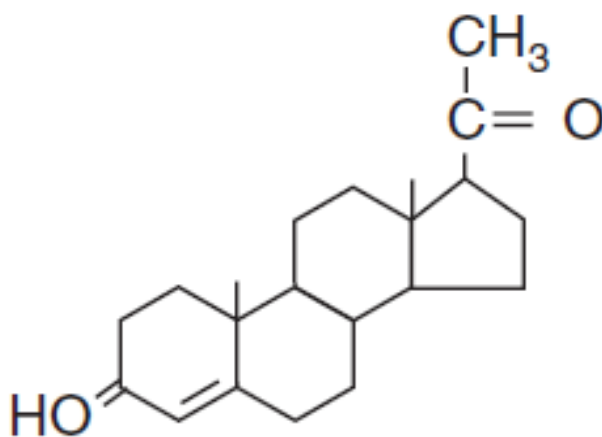
Krajnji metabolički produkti konačno se konjugiraju u jetri s glukuronskom ili sumpornom kiselinom pa postaju bolje topljivi u vodi i mogu se izlučiti mokraćom (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).



Slika 10. Biosinteza estrogena (RODWELL i sur., 2015.)

7.2. PROGESTERON

Progesteron je ženski spolni hormon koji zajedno s estrogenima sudjeluje u regulaciji ciklusa. U negravidnih ženki progesteron se stvara i izlučuje iz žutog tijela (*corpus luteum*), a u gravidnih je glavni izvor hormona posteljica. Nešto malo progesterona stvara se i u nadbubrežnoj žlijezdi i testisima (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.). Njegova je uloga da djeluje kao antagonist estrogenim hormonima, povećava viskoznost cerviksa, povećava bazalnu temperaturu tijela, potiče razvoj mliječnih žlijezda (MEYER, 2001.). Bitan je za pravilan spolni ciklus krava i junica. Smanjuje izlučivanje GnRH te time sprječava ovulaciju tijekom lutealne faze spolnog ciklusa mehanizmom negativno povratne sprege, a i priprema endometrij za nidaciju (prihvat) zametka u razvoju te sprječava nekontrolirane kontrakcije miškulature maternice. Svojim biološkim djelovanjem priprema spolne organe za početak i tijek gravidnosti (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).



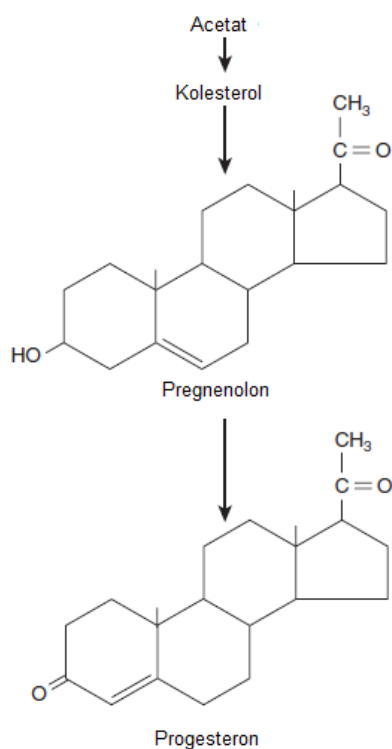
Slika 11. Kemijska struktura progesterona (RODWELL i sur., 2015.)

7.2.1. Kemijska građa

Progesteron je steroid s 21 C-atomom. Sadržava ketoskupinu na C-3 i dvostruku vezu između C-4 i C-5, koji su bitni za njegovu biološku aktivnost. Na položaju C-17 ima postranični lanac $-\text{CO}-\text{CH}_3$ (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).

7.2.2. Biosinteza i metabolizam progesterona

Progesteron nastaje iz acetata preko kolesterola i pregnenolona. Metabolizira se kao i ostali steroidni hormoni redukcijom dvostruke veze između C-4 i C-5 i keto skupina na C-3 i C-20. U redukciji sudjeluju isti enzimi kao kod metabolizma kortikosteroida. Najprije se reducira dvostruka veza uz enzime 4-en-5 α i 4-en-5 β reduktazu i nastaju dva izomera, pregnandion i allo-pregnandion. Nakon toga reducira se keto skupina na C-3 uz 3 α i 3 β -hidroksisteroid-dehidrogenazu. Nastaju pregnanolon i allo-pregnanolon. Konačno se reducira i keto skupina na C-20 uz 20 α i 20 β -hidroksisteroid-dehidrogenazu. Nastali su metaboliti izomerni pregnandioli, među kojima prevladava 5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol, koji se konjugira s glukuronskom kiselinom i izlučuje mokraćom (ČVORIŠĆEC i ČEPELAK, 2009.).



Slika 12. Biosinteza progesterona (RODWELL i sur., 2015.)

7.2.3. Regulacija sinteze progesterona i 17 β -estradiola u krava

U lutealnim stanicama krava, progesteron može izravno utjecati na sintezu tako što povećava aktivnost 3 β -HSD. Učinak progesterona na vlastitu sekreciju poklapa se s povećanom ekspresijom gena za 3 β -HSD, StAR i citokrom P450scc. Prema tome, progesteron regulira vlastitu sintezu tako što utječe na aktivnost enzima koji sudjeluju u lutealnoj steroidogenezi i tako što utječe na ekspresiju gena za te enzime (REKAWIECKI i KOTWICA, 2007.)

Prema istraživanju provedenom u radu (PLEADIN i sur., 2011.), koncentracije progesteron i 17 β -estradiola utvrđene su pomoću kvantitativne ELISA metode u uzorcima plazme goveda raznih pasmina sa nekoliko farmi u Hrvatskoj u razdoblju 2006-2009. godine. Koncentracije spolnih hormona bile su statistički značajno više u plazmi jednogodišnjih grla u odnosu na plazmu teladi. Najviši nivo 17 β -estradiola i progesterona zabilježen je u plazmi ženskih jednogodišnjih grla. Rezultati su pokazali da koncentracije steroidnih hormona variraju u zavisnosti od starosti i spola životinja.

8. ZAKLJUČAK

Spolni hormoni odgovorni su za razvoj reproduktivnog sustava jedinki te njihov fiziološki učinak u organizmu. Steroidni spolni hormoni ostvaruju svoju funkciju na jedan od dva načina. Prvi je organizirajući učinak koji se odnosi na kontrolu hormona ranog razvoja gdje igraju ključnu ulogu u strukturi i funkciji određenih organa, dok je drugi direktni učinak kojim djeluju na spolni ciklus i ponašanje. Steroidi, da bi mogli ostvariti svoje djelovanje, moraju se vezati za hormonske receptore. Njihovi učinci posredovani su polaganim genomskim mehanizmima preko staničnih receptora i brzim negenomskim mehanizmima preko receptora vezanih za membranu i signalizacijskim kaskadama. Regulacijski ciklus proizvodnje spolnih hormona je složen proces, a uvelike ovisi o samoj funkciji gonada koji su glavni proizvođači tih steroida.

Progesteron, testosteron i estradiol imaju višestruke uloge u spolnim ciklusima, a njihova funkcija primarno ovisi o fiziološkoj sintezi samih hormona. U ovom radu opisani su biokemijski mehanizmi nastanka pojedinih steroidnih spolnih hormona na koje utječe veliki broj čimbenika s krajnjim ciljem fiziološkog djelovanja hormona u organizmu životinja.

9. SAŽETAK

Spolni hormoni su steroidi koji se preko višestrukih biokemijskih mehanizama sintetiziraju u gonadama. U sustavima sisavaca, postoji šest obitelji steroidnih hormona koji se mogu klasificirati na strukturnoj i biološkoj (hormonskoj) osnovi. To su: estrogeni i progestini (ženski spolni steroidi), androgeni (muški spolni steroidi), mineralokortikoidi (aldosteron), glukokortikoide (kortizol) i vitamin D. Svi navedeni steroidi nastaju iz kolesterola.

Glavna struktura prstena za kolesterol je potpuno zasićena kolestanska struktura prstena. Steroidni hormoni su topljivi u mastima, tako da mogu ulaziti u sve stanice tijela, jer lipidne stanične barijere ne predstavljaju pravu barijeru. Regulacijski ciklus proizvodnje spolnih hormona je složen proces, a svi mehanizmi se odvijaju preko osovine hipotalamus – hipofiza – jajnici. Biosinteza hormona uvjetuje spolni ciklus životinje, ali i ovisi o spolnom ciklusu same jedinke, odnosno biosinteza kod gravidnih razlikuje se od one u reproduktivnoj dobi. U gravidnih životinja je glavni izvor estrogena posteljica. Muški spolni hormoni (androgeni) su steroidi s 19 C-atoma, a ženski s 18 C-atoma (estrogeni) i 21 C-atomom (progesteron). Androgeni se sintetiziraju u Leydigovim stanicama iz kolesterola, progesteron u žutom tijelu (*corpus luteum*), a estrogeni u jajnicima i žutom tijelu, manje u testisima i nadbubrežnoj žlijezdi. Tijekom biosinteze pregnenolon je važan prekursor koji je potreban za stvaranje svih steroidnih hormona. Reakcije kataliziraju enzimi kao što su: P450_{scc}, StAR, 5 α -reduktaza. Najaktivniji estrogen je 17 β -estradiol, a testosteron 5 α -dihidrotestosteron (5 α -DHT). Progesteron, testosteron i estradiol imaju višestruke uloge u spolnim ciklusima, a njihova funkcija u organizmu u ovisnosti je o fiziološkoj sintezi samih hormona.

Ključne riječi: spolni hormoni, androgeni, estrogeni, progesteron, biokemija

10. SUMMARY

Biochemical mechanisms of sex hormones synthesis in domestic animals

Sex hormones are steroids synthesized by gonads through multiple biochemical mechanisms. In mammalian systems, there are six families of steroid hormones that can be classified on both a structural and a biological (hormonal) basis. They are the estrogens and progestins (female sex steroids), androgens (male sex hormones), mineralocorticoids (aldosterone), glucocorticoids (cortisol) and vitamin D. They are all derived from cholesterol. The parent ring structure for cholesterol is the fully saturated ring structure cholestane. Steroid hormones are fat-soluble so they can enter all body cells because lipid cellular barriers are not a barrier for them. Regulatory cognitive production of sex hormones is a complex process, and all mechanisms take place through the hypothalamus-pituitary-ovarian linkages. The hormone biosynthesis determines the sex cycle of the animals, but also depends on the sex cycle of the same individuals, therefore the biosynthesis in pregnancy is different from the one in the reproductive age. Pregnancy is characterized by a massive increase in the production of both progesterone and estrogen. The increase in progesterone and estradiol production occurs only in the placenta. Male sex hormones (androgens) are steroids with 19 C-atoms, and female with 18 C-atoms (estrogens) and 21 C-atoms (progesterone). Androgens are synthesized in Leydig's cells from cholesterol, progesterone in the corpus luteum, and estrogen in the ovaries and corpus luteum, while less amounts are produced in the testicles and the adrenal gland. In the mitochondria, cholesterol is converted into pregnenolone, the precursor steroid required for synthesis of all steroid hormones. The reactions catalyze enzymes such as: P450_{scc}, StAR, 5 α -reductase. The most active estrogen is 17 β -estradiol, and testosterone 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT). Progesterone, testosterone and estradiol have multiple roles in sex cycles, and their function will depend on the physiological synthesis of the hormones themselves.

Key words: sex hormones, androgens, estrogens, progesterone, biochemistry

11. POPIS LITERATURE

ALPY, F., M. E. STOECKEL, A. DIERICH (2001): The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 4261-4269.

ARTHUR, G. H., D. E. NOAKES, H. PEARSON, T. J. PARKINSON (1997): *Veterinary reproduction and obstetrics*, 7th edition, W. B. Saunders Company, London.

BAO, B., H. A. GARVERICK (1998): Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor gene in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1903-1921.

BOSE, M., R. M. WHITTAL, C. G. GAIROLA (2008): Molecular mechanism of reduction in pregnenolone synthesis by cigarette smoke. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 56-64.

BRENTANO, S. T., S. M. BLACK, D. LIN (1992): cAMP post-transcriptionally diminishes the abundance of adrenodoxin reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4099-4103.

CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): *Veterinarska andrologija* (M. Samardžija, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu.

CHEDRESE, P. (2009): *Reproductive endocrinology; A molecular approach*. Springer Science.

CLARK, B. J., V. RANGANATHAN, R. COMBS (2001): Steroidogenic acute regulatory protein expression is dependent upon post-translational effects of cAMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell. Endocrinol.* 173, 183-192.

ČVORIŠĆEC, D., I. ČEPELAK (2009): *Štrausova medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb.

DYSON, M. T., J. K. JONES, M. P. KOWALEWSKI (2008): Mitochondrial A-kinase anchoring protein 121 binds type II protein kinase A and enhances steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biol. Reprod.* 78, 267-277.

FERGUSON, J. J., Jr. (1963): Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J. Biol. Chem.* 238, 2754-2759.

GREENSPAN, F. S., J. D. BAXTER (1994): *Basic & clinical endocrinology*, 4th edition, Appleton & Lange.

GRIFFIN, J. E., J. D. WILSON (1998): Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: WILSON J. D. et al., (ed), *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th edition, W. B. Saunders company, Philadelphia, pp. 819-876.

KARLSON, P. (1993): *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, 8. izdanje.

KRUEGER, R. J., N. R. ORME-JOHNSON (1983): Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J. Biol. Chem.* 258, 10159-10167.

LAMBETH, J. D., D. W. SEYBERT, J. R. LANCASTER (1982): Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 45, 13-31.

MANNA, P. R., I. T. HUHTANIEMI, X. J. WANG (2002): Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol. Reprod.* 67, 1393-1404.

MASON, J. I., B. E. HOWE, A. F. HOWIE (2004): Promiscuous 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases: testosterone 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of mouse type I and VI 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr. Res.* 30, 709-714.

MEYER, H. H. D. (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scan.* 109, 1-8.

MILLER, W. L. (2005): Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*. 146, 2544-2550.

NORMAN, A. W., H. L. HENRY (2014): *Hormones*, Third edition, Academic Press.

PAYNE, A. H., I. G. ABBASZADE, T. R. CLARKE (1997): The multiple murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids*, 62, 169-175.

PESCADOR, N., K. SOUMANO, D. M. STOCCO (1996): Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 55, 485-491.

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

PONTING, C. P., L. ARAVIND (1999): START: a lipid-binding domain in STAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 24, 130-132.

PRASAD, V. V., L. PONTICORVO, S. LIEBERMAN (1984): Identification of 24-hydroxycholesterol in bovine adrenals in both free and esterified forms and in bovine brains as its sulfate ester, *J. Steroid. Biochem.* 21, 733-736.

REKAWIECKI, R., J. KOTWICA (2007): Molecular regulation of progesterone synthesis in the bovine *corpus luteum*. *Veterinarni Medicina*. 52, 405-412.

RODGERS, R. J., M. R. WATERMAN, E. R. SIMPSON (1986): Cytochromes P450_{scc}, P450(17) α , adrenodoxin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during the ovarian cycle. *Endocrinology*. 118, 1366-1374.

RODWELL, A. W., D. A. BENDER, K. M. BOTHAM, P. J. KENNELLY, P. A. WEIL (2015): Harper's illustrated biochemistry, 30th Edition, McGraw Hill.

RUPIC, V. (2015.): Reprodukcijska domaćih životinja, Zrinski d.d.

SEKAR, N., H. A. LAVOIE, J. D. VELDHUIS (2000): Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 141, 3983-3992.

SJAASTAD, O. V., O. SAND, K. HOVE (2016): Physiology of Domestic Animals, Third Edition, Scandinavian Veterinary Press.

STARLING, E. (1909): The fluids of the body, University of California Libraries.

STOCCO, D. M., B. J. CLARK (1996): Regulation of the acute production of steroid in steroidogenic cells. *Endo. Rev.* 17, 221-44.

TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu.

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. rujna 1991. u Dubrovniku. Osnovnu školu Lapad i Biskupijsku klasičnu gimnaziju Ruđera Boškovića pohađala sam u Dubrovniku. Nakon završene srednje škole upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine.