

# Kontrola ilegalne primjene prirodnih spolnih hormona u stočarskoj industriji

---

Radmanić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:162576>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

LUKA RADMANIĆ

**KONTROLA ILEGALNE PRIMJENE PRIRODNIH  
SPOLNIH HORMONA U STOČARSKOJ INDUSTRIJI**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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

**Predstojnik klinike:** izv. prof. dr. sc. Juraj Grizelj

**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. doc. dr. sc. Silvijo Vince (zamjena)

*Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin i prof. dr. sc. Marku Samardžiji koji su svojim nesebičnim prenošenjem znanja i vještina, kao i znanstvenim i stručnim savjetovanjima pomogli u izradi ovoga rada. Zahvaljujem i cijelom osoblju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatskog veterinarskog instituta te svima ostalima koji su svojim predanim radom također doprinijeli mojem cjelokupnom studiranju i napredovanju.*

*Zahvaljujem i svojim kolegama i prijateljima s kojima sam zajedno tijekom ovih šest godina studija prolazio najljepše dane života. Oni su zajedničkim druženjima, učenjem i pozitivnim stavom uvelike pomogli u stjecanju novih znanja na jedinstven način, te obilježili moje studentsko razdoblje.*

*Posebna zahvala ide mojoj obitelji. Najveću zahvalnost iskazujem upravo njima jer su oni uvijek bili uz mene vjerujući u mene i moj uspjeh.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	- 1 -
2. PODJELA I SVOJSTVA PRIRODNIH SPOLNIH HORMONA .....	- 3 -
2.1. 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	- 3 -
2.2. PROGESTERON.....	- 4 -
2.3. TESTOSTERON.....	- 4 -
3. PRISUTNOST I NAČIN DJELOVANJA SPOLNIH HORMONA TE NJIHOVI FIZIOLOŠKI UČINCI U LJUDSKOM I ŽIVOTINJSKOM ORGANIZMU.....	- 7 -
3.1. 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	- 7 -
3.2. PROGESTERON.....	- 8 -
3.3. TESTOSTERON.....	- 9 -
4. TERAPEUTSKA PRIMJENA PRIRODNIH SPOLNIH HORMONA U FARMSKIH ŽIVOTINJA.....	- 12 -
4.1. TESTOSTERON.....	- 12 -
4.2. PROGESTERON.....	- 13 -
4.3. 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	- 13 -
5. ZLOUPORABA SPOLNIH HORMONA U ANABOLIČKE SVRHE KAO POSPJEŠIVAČA RASTA U INTENZIVNOJ STOČARSKOJ INDUSTRIJI.....	- 14 -
5.1. 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	- 15 -
5.2. TESTOSTERON.....	- 15 -
5.3. PROGESTERON .....	- 16 -
5.4. PRIMJER PROTOKOLA KORIŠTENJA.....	- 16 -
6. FIZIOLOŠKE RAZINE SPOLNIH HORMONA I PROSUDBA O ZLOUPORABI.....	- 17 -
7. KUMULACIJA HORMONA U ŽIVOTINJSKIM TKIVIMA I OSTACI (REZIDUE) U HRANI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA .....	- 19 -
7.1. NADZOR REZIDUA .....	- 19 -
7.2. TOKSIČNOST REZIDUA.....	- 20 -
7.3. KONCENTRACIJE SPOLNIH HORMONA U TKIVIMA .....	- 21 -

8. ZAKONODAVSTVO U KONTROLI ANABOLIČKE PRIMJENE PRIRODNIH HORMONA.....	- 23 -
8.1. ANALITIČKE METODE.....	- 23 -
8.2. DOPUŠTENE KONCENTRACIJE.....	- 24 -
9. ZAKLJUČCI.....	- 26 -
10. SAŽETAK.....	- 27 -
11. SUMMARY .....	- 28 -
12. LITERATURA.....	- 29 -
13. ŽIVOTOPIS .....	- 34 -

## 1. UVOD

Endokrini hormoni su jedan poseban sustav kemijskih glasnika, koje žlijezde ili specijalizirane stanice otpuštaju u krv, a utječu na staničnu funkciju na nekom drugom mjestu u tijelu. Mogu djelovati generalizirano na cijeli organizam ili specijalizirano samo na tkiva koja posjeduju njihove receptore. Različiti hormonski sustavi imaju ključnu ulogu u regulaciji gotovo svih tjelesnih funkcija, kao što su metabolizam, rast i razvoj, ravnoteža vode i elektrolita, razmnožavanje i ponašanje. Prema građi se dijele na polipeptide-bjelančevine, derivate tirozina te steroide (Guyton i Hall, 2006.).

Pod nazivom prirodni spolni hormoni podrazumijevaju se tvari steroidne građe koje primarno sintetiziraju spolne žlijezde. Ove tvari uključene su u endokrinu regulaciju rasta te razvoj primarnih i sekundarnih spolnih karakteristika u životinja i ljudi. Odavno je poznato da se spolni hormoni mogu izlučivati i iz drugih tkiva, osim spolnih žlijezda te da osim reproduktivnih imaju i brojne druge učinke u organizmu (Samardžija i sur., 2015.).

Egzogena primjena prirodnih spolnih hormona kao što su: estradiol, progesteron i testosteron tijekom prehrane životinja, kao i kod endogenih hormona, rezultira fiziološkom aktivnošću u organizmu te ima stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva. Zbog brojnih toksičnih učinaka potrošača uslijed konzumacije kontaminiranih proizvoda te moguće zlouporabe u anaboličke svrhe, nameće se potreba za provođenjem sustavnog nadzora i kontrole ovih toksikanata hrane životinjskog podrijetla, određivanjem njihovih ostataka, odnosno rezidua, u biološkom materijalu životinja tijekom tova i na klaonici te u krajnjim proizvodima. Jedan od ciljeva ovog rada je istražiti postupke i materijale kontrole ilegalne primjene prirodnih spolnih hormona u stočarskoj industriji odnosno proizvodnji hrane životinjskog podrijetla. Ovaj rad daje i pregled svojstava najzastupljenijih i najvažnijih prirodnih spolnih hormona: 17 $\beta$ -estradiola, progesterona i testosterona, njihovih fizioloških razina u različitim farmskih životinja, uporabe u terapijske svrhe te zlouporabe kao tvari s anaboličkim učinkom u cilju poboljšanja rasta, odnosno ostvarenja većih prinosa i profita u stočarskoj proizvodnji. U novije se vrijeme sve više pažnje posvećuje utjecaju tvari s hormonskim djelovanjem na ljudsko zdravlje, što je potaknuto i brojnim slučajevima vezanim za zlouporabu tvari s anaboličkim učinkom na farmske životinje (Hartmann i sur., 1998., Pleadin i sur., 2009., Pleadin i sur., 2011.a).

U stočarskoj proizvodnji upotrebljavaju se velike količine tvari s biološkom aktivnošću kod životinja, kao što su: vitamini, aditivi i elementi u tragovima, različiti lijekovi za

prevenciju i suzbijanje bolesti, a ovdje naravno spadaju i tvari koje imaju anabolički učinak. Anabolici su organsko kemijske tvari koje stimuliraju rast tkiva svojim utjecajem na metaboličke procese uključene u sintezu bjelančevina, što je posebno izraženo u stanicama skeletne muskulature. Anabolici imaju utjecaj i na druge metaboličke procese u organizmu, pa tako stimuliraju lipolitičke procese i smanjuju količinu masnog tkiva u organizmu, a ujedno i poboljšavaju konverziju i iskoristivost hrane (Meyer i Karg, 1989., Lone 1997.).

Zbog navedenih pozitivnih učinaka, anabolici su se počeli masovno koristiti u stočarskoj industriji još polovicom 20. stoljeća. Među prvima su se počeli koristiti stilbeni, odnosno njihovi derivati, soli i esteri, čija je upotreba ubrzo napuštena i zakonom zabranjena nakon što se uvidjelo da imaju teratogeno, mutageno i kancerogeno djelovanje (Martin i sur., 1978., Robboy i sur., 1982.).

Nakon toga u mesnoj industriji počele su se koristiti antitireoidne tvari, laktoni rezorcilne kiseline, beta-agonisti te prirodni i sintetski spolni hormoni koji imaju anabolički učinak i čijom upotrebom se može veoma unaprijediti rast životinja, čak i do 20% (Meyer, 2001.).



## 2. PODJELA I SVOJSTVA PRIRODNIH SPOLNIH HORMONA

Spolni hormoni  $17\beta$ -estradiol, progesteron i testosteron su kemijske tvari steroidne strukture koje se prirodno sintetiziraju u životinjskom i ljudskom organizmu te imaju niz važnih funkcija u organizmu. Sintetiziraju se ponajviše u spolnim žlijezdama te djeluju aktivacijom specifičnih gena. Osim utjecaja na razvoj primarnih i sekundarnih spolnih obilježja i reprodukciju, spolni hormoni djeluju i na pojačani rast (Griffin i Wilson, 1998., Meyer, 2001.).

Prirodni spolni hormoni se uobičajeno klasificiraju u četiri grupe s obzirom na njihovu kemijsku strukturu, a donekle i njihovu fiziološku aktivnost: androgeni, estrogeni, progestini i relaksini (Dukes, 1975.).

### 2.1. $17\beta$ -ESTRADIOL

Najvažniji estrogen je hormon  $17\beta$ -estradiol, a poznati su još estron, estriol i epiestriol. Svi spadaju u skupinu steroidnih hormona i sintetiziraju se iz kolesterola i acetata. Najvjerojatnije je da se estron i  $17\beta$ -estradiol mogu pretvarati jedan u drugoga, s tim da je češća pretvorba  $17\beta$ -estradiola u estron (Slika 1.). Jajnik izlučuje oba hormona, dok je estriol najvjerojatnije metabolički produkt ova dva hormona čija se sinteza odvija u jetri. Poznato je da samo jajnici (stanice granuloze i *thecae internae* folikula te u intersticiju) izlučuju veće količine estrogenih hormona, a tek neznatne količine kora nuzbubrežne žlijezde. Za vrijeme gravidnosti posteljica izlučuje i do 300 puta više estrogena od jajnika u vrijeme normalnog spolnog ciklusa. Ako se uzme u obzir ukupni estrogeni učinak, tada je učinak  $17\beta$ -estradiola oko tri puta jači od učinka estrona. Izlučuje se u manjim količinama u razdoblju prije spolne zrelosti, da bi se tijekom spolne zrelosti količina povećala oko 20 puta (Tomašković i sur., 2007.).

$17\beta$ -estradiol predstavlja najvažniji hormon u razvoju sekundarnih ženskih spolnih obilježja. Izlučuju ga uglavnom jajnici i žuto tijelo, ali u manjoj količini i testisi te nuzbubrežna žlijezda. Povećane količine ovog hormona mogu uzrokovati feminizaciju muškaraca, ginekomastiju i tumore, a u nekim slučajevima povišene razine utvrđene su i kod ciroze jetre.  $17\beta$ -estradiol ima indirektan i direktan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika i povećanu sintezu proteina (Van der Wal i Berende, 1983.).

## 2.2. PROGESTERON

Progesteron je steroidni ženski spolni hormon koji se sintetizira u jajnicima (*theca interna* i granulosa folikula, žuto tijelo), placenti te u manjoj količini u nuzbubrežnoj žlijezdi. Najvažniji je spolni hormon s progestinskom aktivnošću. Steroidni hormoni, kao što je progesteron, nalaze se u vrlo visokoj koncentraciji u krvi i u njoj se njihova koncentracija može odrediti.

Progesteron nastaje iz acetata koji sadrži samo dva atoma ugljika iz kojega, djelovanjem enzima preko međuspojeva nastaje kolesterol, a iz njega pregnenalon, koji je prekursor za sve steroidne hormone jajnika (Slika 1.). Njegova molekularna težina se bitno ne razlikuje od molekularne težine drugih steroidnih hormona (estrogena, testosterona i kortikosteroida) pa su im neke funkcije bliske. Povišenje koncentracije kortizola u cirkulaciji najvažniji je činitelj koji utječe na steroidogenezu u placenti. Sekrecija progesterona održava gravidnost kroz cijelo vrijeme njezina trajanja od koncepcije pa sve do porođaja (Samardžija i sur., 2010.).

U manjim ga koncentracijama ima i u muškaraca. Progesteron inducira prelazak endometrija u fazu izlučivanja, povećava viskoznost cervikalne sluznice, bazalnu temperaturu tijela i djeluje na razvoj mliječnih žlijezda u grudima. Ključan je za pravilan spolni ciklus krava i junica, ali i ostalih vrsta životinja te ljudi. Isto tako smanjuje izlučivanje GnRH i time spječava ovulaciju tijekom lutealne faze spolnog ciklusa mehanizmom negativne povratne sprege, a priprema i endometriju za prihvata (nidaciju) zametaka u razvoju te sprječava nekontrolirane kontrakcije miškulature maternice. Ubraja se u prirodne gestagene zajedno sa  $17\alpha$ -hidroksi progesteronom,  $20\alpha$ -hidroksi progesteronom i  $20\beta$ -dihidroksi progesteronom (Tomašković i sur., 2007.).

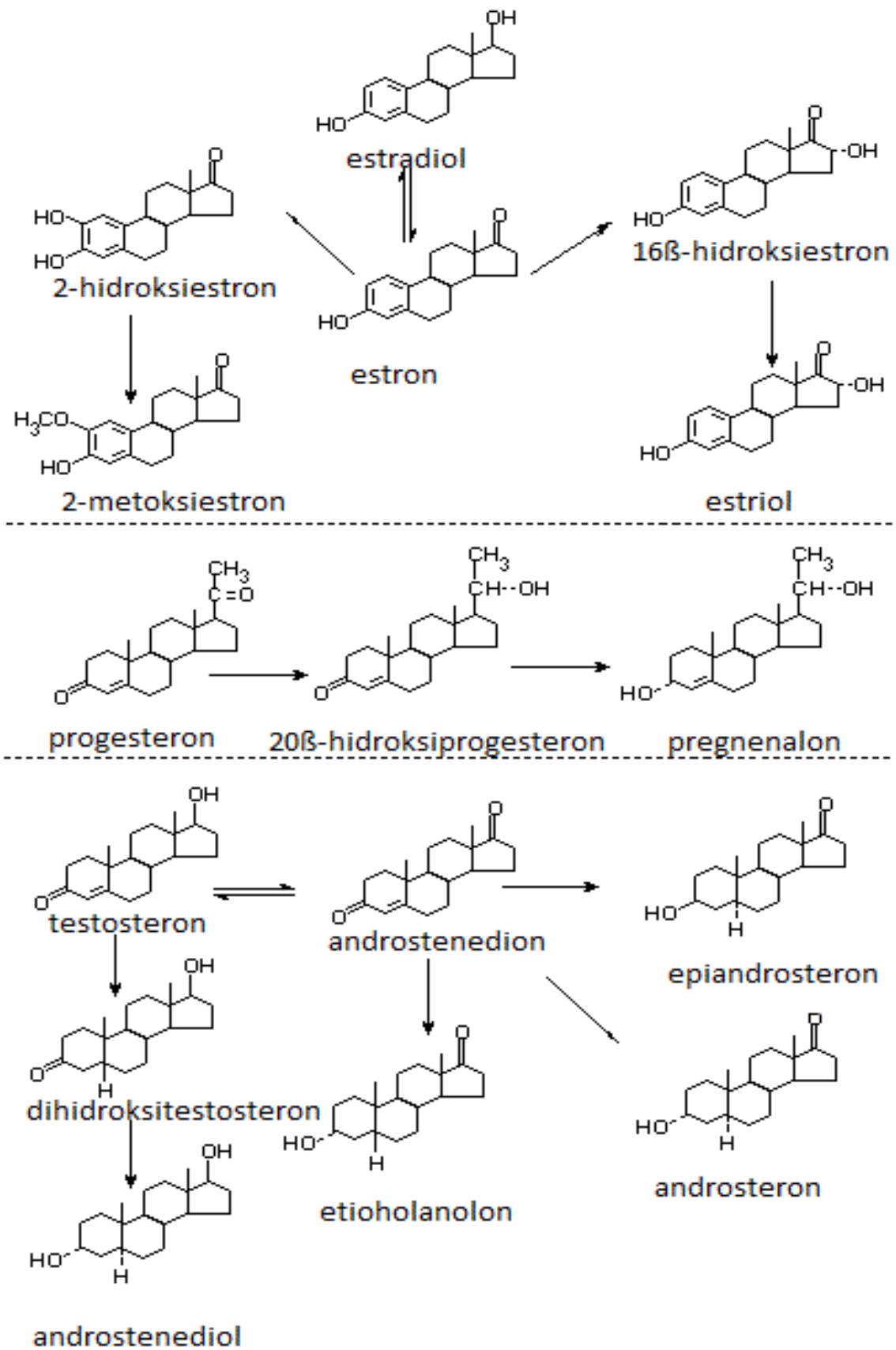
## 2.3. TESTOSTERON

Testosteron je najvažniji prirodni androgen, uz androsteron i dihidroandrosteron (Slika 1.). Inače se pod pojmom androgeni hormoni podrazumijevaju svi steroidni hormoni koji imaju maskulinizirajući učinak, a tu osim prije navedenih spadaju još i hormoni sintetizirani drugdje u tijelu osim u testisima. Na primjer, nuzbubrežne žlijezde izlučuju barem pet androgena, no iako je njihov učinak prilično neznatan kod pojave adrenalnih

tumora stanica koje izlučuju androgene, moguće je enormno povećanje koncentracije androgena te čak i njihov maskulinizirajući učinak u ženki (Guyton i Hall, 2006.).

Testosteron je prije svega muški spolni hormon kojeg izlučuju Leydigove stanice testisa, no u malim količinama ima ga i u ženki gdje ga izlučuju granulosa stanice jajnika, te nuzbubrežne žlijezde kod oba spola. Izlučuje se pod utjecajem luteinizirajućeg (LH) hormona. U krvi se nalazi oko 2% slobodnog testosterona, dok je ostatak vezan na bjelancevine albumin i globulin (SHBG-*sex hormone binding globuline*). Njegova glavna uloga je stimulacija i razvoj muških spolnih žlijezda i spolnih karakteristika, povećava libido i sintezu proteina, samim time podupire rast kostiju i mišića te utječe na ponašanje (Griffin i Wilson, 1998., Cergolj i Samardžija, 2006.).

Slično androgeno djelovanje kao i testosteron ima androsteron, hormon nuzbubrežne žlijezde. Androgeni kore nuzbubrežne žlijezde usko su povezani s funkcijom spolnih žlijezda, iako prema nekim autorima taj odnos do danas nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da zbog činjenice što nuzbubreg neprekidno izlučuje znatnu količinu androgenih tvari, one mogu biti preteča iz kojih testis sintetizira testosteron (Cergolj i Samardžija, 2006.).



Slika 1. Glavni metaboliti estradiola, progesterona i testosterona (www.inchem.org).

### 3. PRISUTNOST I NAČIN DJELOVANJA SPOLNIH HORMONA TE NJIHOVI FIZIOLOŠKI UČINCI U LJUDSKOM I ŽIVOTINJSKOM ORGANIZMU

#### 3.1. 17 $\beta$ -ESTRADIOL

Utjecaj 17 $\beta$ -estradiola na rast životinja ostvaruje se neposrednom stimulacijom povećanja mišićne mase preko estrogenih receptora. To je direktan učinak, ali utječe i indirektno stimulirajući sekreciju hormona rasta i povećavajući broj njegovih receptora u jetri te koncentraciju inzulinu sličnog faktora rasta I (IGF-I) u krvi (Meyer i Rapp, 1985., Meyer, 2001.).

Estrogeni sprječavaju i smanjuju aktivnost osteoklasta u kostima te na taj način smanjuju resorpciju i potiču njihov rast. U vrijeme puberteta, kad žena ulazi u reproduktivnu dob, njezin je rast tijekom nekoliko godina ubrzan. No, estrogeni imaju još jedan učinak na snažan rast kostiju, budući da uzrokuju spajanje epifiza i dijafiza na zonama rasta dugih kostiju. Taj je učinak estrogena u žena mnogo jači od sličnog učinka testosterona u muškaraca, a slično je i kod domaćih životinja. Zbog toga rast u žena obično prestaje nekoliko godina prije nego u muškaraca. U žena, kod kojih nedostaju estrogeni, epifize se s dijafizama ne spajaju u normalno predviđeno vrijeme pa je visina takvih žena obično desetak centimetara veća od standardne uobičajene visine (Guyton i Hall, 2006.). Najvažniji ekstragenitalni efekt estrogena ustanovljen je u vezi s metabolizmom kosti. Aplikacija velikih doza estradiola može kod sisavaca izazvati odlaganje kosti u medularnoj šupljini sve do inhibicije hematopoeze i pojave anemije. Uvriježeno je mišljenje da estrogeni ubrzavaju osifikaciju epifiznih ploča dugih kostiju skeleta pa na taj način ograničavaju rast skeleta u širinu (Dukes, 1975.).

Estrogeni imaju brojne metaboličke učinke. Djeluju na epitel buraga i crijeva te povećavaju konverziju i iskoristivost hrane. Potiču apoptozu osteoklasta i antagoniziraju osteoklastogene i proosteoklastične učinke paratireoidnog hormona (PTH) i interleukina-6 (IL-6), što sve dovodi do smanjenja resorpcije kostiju. Vaginalne infekcije u djevojčica često se mogu izliječiti davanjem estrogena jer se time povećava otpornost epitela rodnice. Kontinuirano izlaganje egzogenom estrogenu dovodi do cistične hiperplazije endometrija maternice. Estrogeni također povećavaju koagulabilnost krvi, najvjerojatnije putem djelovanja na jetru kada rastu razine faktora II, VII, IX i plazminogena, a padaju razine antitrombina III te se smanjuje adhezivnost trombocita. Kod dugoročne primjene

estrogena smanjuju se razine plazmatskog renina, angiotenzin konvertirajućeg enzima i endotelina-1. Zamijećena je i smanjena ekspresija AT-1 receptora za angiotenzin II. Pokazalo se da estrogeni imaju zaštitni učinak na razvoj ateroskleroze krvnih žila, jer interferiraju s inicijalnim koracima. Uzrokuju i manje povećanje ukupnih proteina, što je vidljivo u blago pozitivnom dušičnom balansu. To je ponajviše rezultat utjecaja na rast spolnih organa, kosti i nekih drugih tkiva i nikako se ne može mjeriti s utjecajem testosterona na anaboličke procese u metabolizmu proteina, iako Meyer (2001.) navodi da u goveda i ovaca estrogeni imaju jači anabolički učinak zbog većeg broja estrogenih receptora. Vidljiv je i utjecaj na pojačano odlaganje masti u potkožju pod utjecajem estrogena, stoga žene imaju znatno veću količinu masti u odnosu na muškarce. Osim gomilanja masti u potkožju, za žene je karakteristično i nakupljanje masti na bedrima i stražnjici. Imaju utjecaj i na debljinu kože koja je u žena tanja, mekša i prokrvljenija, a primjećen je i neznatan utjecaj na retenciju vode i elektrolita u distalnim tubulima bubrega (Guyton i Hall, 2006.).

Učinak  $17\beta$ -estradiola na rast životinja ovisi o vrsti životinje, dobi, spolu i primijenjenoj dozi te o unesenoj količini u odnosu na fiziološku razinu, a ukoliko se primjenjuje na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi ostatci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (Pleadin i sur., 2013.).

### 3.2. PROGESTERON

Najbitniji progestin je progesteron. U negravidnih ženki izlučuje ga žuto tijelo i njegova glavna uloga je da djeluje kao antagonist estrogenim hormonima, uzrokuje zatvaranje cervikalnog kanala pri kraju estrusa, potpomaže sekrecijsku fazu endometrija i jajovoda te smanjuje spontani motilitet miometrija. Progesteron potiče razvoj mliječnih žlijezdi na način da povećava broj i veličinu alveola te ih stimulira na sekreciju. Doduše do sekrecije dolazi pod utjecajem prolaktina, ali samo kod već unaprijed pripremljenih mliječnih žlijezda za što je neophodan progesteron (Guyton i Hall, 2006.).

Progesteron djeluje i na sekreciju hipofiznih gonadotropnih hormona (FSH i LH) na principu negativne povratne sprege, tako da kod gravidnih ženki sprječava ponovni estrus, odnosno ovulaciju. Progesteron svojim biološkim djelovanjem priprema spolne organe za početak i tijek gravidnosti. Nadalje, ima važnu ulogu prilikom ovulacije, razvoja alveolarnog sustava mliječne žlijezde te pojave majčinskog instinkta. Već nekoliko minuta

nakon sekrecije u jetri se metabolizira u druge steroide koji nemaju progestinski učinak (Samardžija i sur., 2010.).

### 3.3. TESTOSTERON

Testosteron sintetiziraju Leydigove stanice koje se nalaze u intersticiju testisa između *tubuli seminiferi* i tvore oko 20% mase adultnog testisa. Leydigovih stanica gotovo uopće nema kod mladih životinja sve do spolne zrelosti, a izrazito su aktivne kod novorođenčadi i nakon nastupa spolne zrelosti. Smatra se da se počinje izlučivati već u sedmom tjednu embrionalnog razvoja, a u to vrijeme izlučuje ga genitalni greben koji isto tako kod ženskih životinja izlučuje estrogene. Aplikacija visoke doze testosterona na gravidnim životinjama rezultira razvojem muških spolnih organa iako je fetus ženskog roda. Također, ukoliko se odstrane testisi u mladog fetusa, razvijaju se ženski spolni organi. Dakle, testosteron je bitan za razvoj muških spolnih organa, skrotuma i penisa, prostate i drugih akcesornih spolnih žlijezda te genitalnih kanala, a istovremeno vrši supresiju razvoja ženskih spolnih karakteristika. Njegovo izlučivanje je pod utjecajem gonadotropnih hormona hipofize. Jedan od njegovih bitnijih učinaka je utjecaj na maskulinizaciju tijela, odnosno povećanje mišićne tjelesne mase čak i do 50% u odnosu na ženke. Taj učinak se događa zbog anaboličkog učinka na metabolizam proteina.

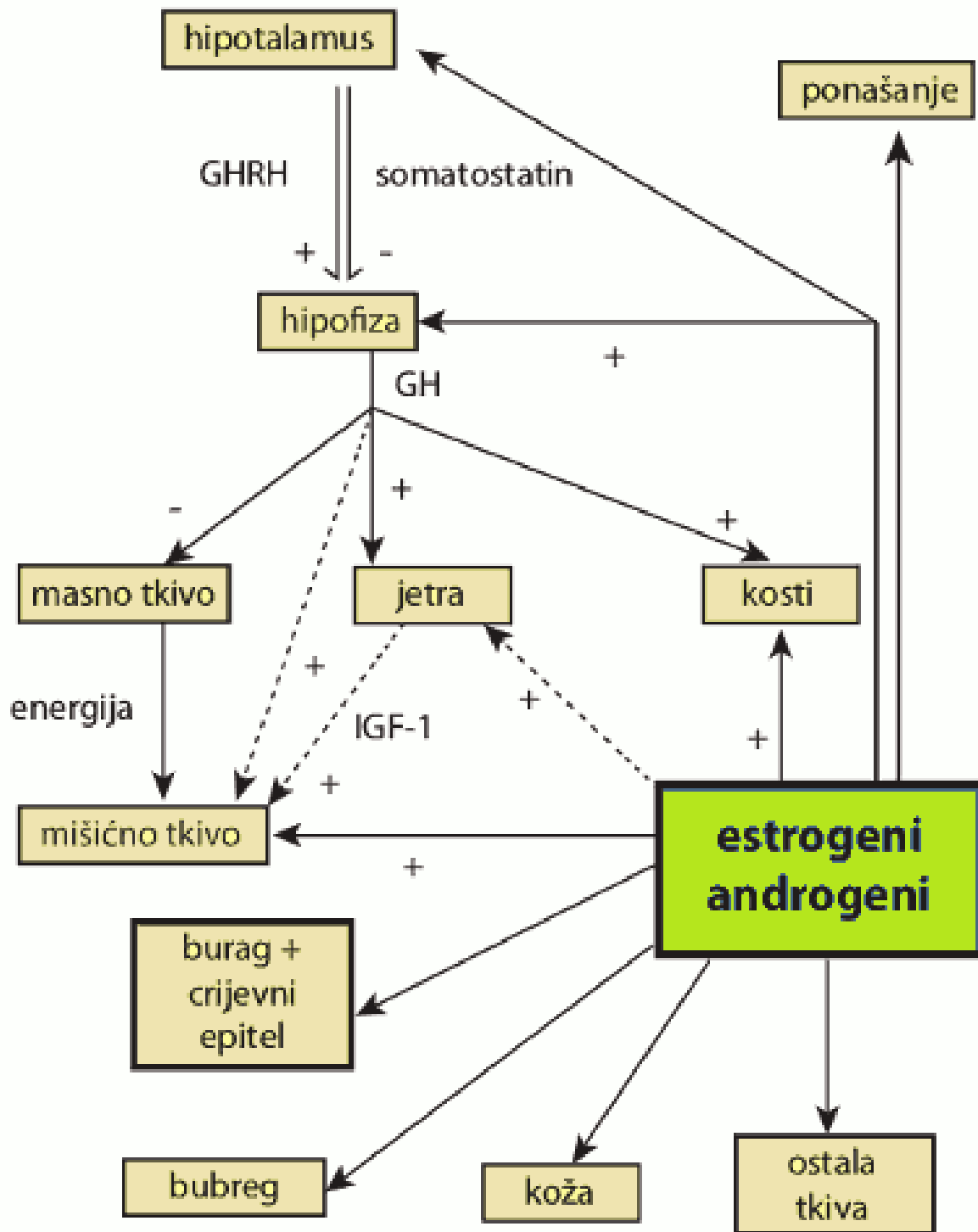
Na staničnoj razini, testosteron ulazi u ciljne stanice već nekoliko minuta nakon izlučivanja, gdje se najčešće metabolizira pod utjecajem enzima  $5\alpha$ -reduktaze u dihidrotestosteron koji se zatim veže za citoplazmatski receptor protein. Tako povezani zatim putuju do jezgre stanice gdje se vežu za nuklearni proteinski receptor i potiču DNK-RNK transkripciju. Unutar 30 minuta RNK polimeraza postaje aktivna i u ciljnim stanicama počinje gomilanje RNK, što je popraćeno progresivnim povećanjem staničnih bjelančevina. Nakon nekoliko dana povećava se i količina DNK, a posljedica toga je povećanje broja stanica u ciljnom tkivu. Gotovo na identičan način djeluju i estrogene i progestini.

Testosteron utječe i na razvoj kostiju, kosti postaju veće i deblje te pohranjuju više kalcijevih soli, ali zato brže dolazi do sraštanja epifiznih linija pa se time sprječava pretjerani rast u visinu. Utječe i na povećanje bazalnog metabolizma prilikom čega već i fiziološke koncentracije testosterona povećavaju bazalni metabolizam za 5-10%, dok povišene koncentracije povećavaju metabolizam i do 15%. Navedeno je najvjerojatnije

posljedica utjecaja na anaboličke procese, povećanje koncentracije određenih enzima te pojačani rad svih stanica. Indirektna posljedica toga je i utjecaj na eritropoezu pa tako mušjaci imaju znatno viši broj eritrocita od ženki. Testosteron isto tako povećava resorpciju elektrolita u distalnim tubulima bubrega za 5-10%. Ujedno, ima sposobnost stimulacije sinteze proteina u gotovo svim organima u tijelu, no ipak je taj utjecaj najveći u ciljnim tkivima koja su zaslužna za razvoj primarnih i sekundarnih muških spolnih karakteristika. Njegovo izlučivanje pod direktnim je utjecajem hipotalamusa, odnosno GnRH koji utječe na hipofizu i njezino izlučivanje FSH i LH. LH je primarni stimulans za izlučivanje testosterona u testisima, dok FSH stimulira spermatogenezu.

Njihovo izlučivanje funkcionira na sistemu negativne povratne sprege. Dakle visoke koncentracije testosterona inhibiraju izlučivanje GnRH, dok niske koncentracije testosterona potiču izlučivanje GnRH. Unatoč tome, brojni psihološki faktori mogu utjecati na izlučivanje GnRH u hipotalamusu pa tako mogu posredno imati utjecaj na brojne seksualne i reproduktivne funkcije bilo kod muškaka ili u ženki. Na primjer, smatra se da transport muškaka u lošim uvjetima smanjuje njegovu plodnost (Guyton i Hall, 2006.). Testosteron stimulira razvoj muških spolnih karakteristika i muških spolnih žlijezda, povećava libido i sintezu proteina te utječe na ponašanje (Griffin i Wilson, 1998.).





Slika 2. Anaboličko djelovanje spolnih hormona u životinja (Meyer, 2001., Samardžija i sur., 2015.).

## 4. TERAPEUTSKA PRIMJENA PRIRODNIH SPOLNIH HORMONA U FARMSKIH ŽIVOTINJA

Primjena steroidnih hormona s estrogenim, gestagenim i androgenim učinkom dopuštena je u veterinarskoj medicini jedino u terapijske svrhe i to samo u slučajevima poremećaja oplodnje ili tijekom graviditeta. Takva stroga pravila određena su zbog njihovog nepovoljnog učinka na zdravlje ljudi kada se navedeni hormoni koriste u anaboličke svrhe, što je strogo zabranjeno Direktivom Vijeća 88/146/EEC (Anonymous., 1988.).

Spolni se hormoni mogu koristiti u liječenju životinja. U prošlosti su se primjenjivali, a i danas se u nekim državama koriste u stočarskoj industriji kao pospješivači rasta, odnosno tvari s anaboličkim učinkom (Arts i sur., 1991.). Njihovom uporabom na farmskim životinjama dobiva se meso koje je boljih organoleptičkih svojstava s većim udjelom mišićnog tkiva i manjim udjelom masnog tkiva (Lone, 1997., Desphande, 2002., Stephany, 2010.) uz ostvarenje povećanog rasta i prinosa u proizvodnji mesa te bolju konverziju hrane (Meyer, 2001.).

Istraživanja pokazuju da ukoliko se spolni hormoni primjenjuju na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi, njihovi ostatci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača (FAO/WHO, 2000., Pleadin i sur., 2011.a, Pleadin i sur., 2013.). Njihov utjecaj na fiziološke procese u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu (Andersson i Skakkebaek, 1999.).

### 4.1. TESTOSTERON

Testosteron se najčešće primjenjivao u kombinaciji sa  $17\beta$ -estradiolom. Koristio se u stočarskoj proizvodnji u obliku subkutanih ušnih implantata da bi se povećao rast životinja i iskoristivost hrane. Razlog parenteralne primjene je činjenica da nakon peroralne primjene zbog brze konjugacije i metaboličke transformacije u jetri ima slabu bioiskoristivost, slično kao i progesteron i  $17\beta$ -estradiol te ga se primjenjuje u obliku supkutanih implantata. Testosteron se kod farmskih životinja jako rijetko koristi u terapijske svrhe, a opisani su samo pojedini slučajevi liječenja kod mišićne slabosti, slabog apetita i nedostatka natjecateljskog duha kod kastriranih konja te kod deficijencije testosterona kod kastrata. Poznata je uporaba i u kobilama koje se prečesto tjeraju (Samardžija i sur., 2015.).

## 4.2. PROGESTERON

Progesteron se u anaboličke svrhe primjenjivao s istom svrhom i na isti način kao i testosteron. Korištenjem gestagena imitira se djelovanje žutog tijela, odnosno lutealna faza spolnog ciklusa. Gestageni su terapijski najkorišteniji steroidni spolni hormoni, jer se koriste uglavnom za sinkronizaciju skupine krava i junica za pripremu umjetnog osjemenjivanja i prilikom problema s otkrivanjem estrusa, mogu se koristiti u krava i junica koje imaju aktivne jajnike, ali i onih u anestriji. Plodnost u prvom estrusu nakon njihovog korištenja nije zadovoljavajuća. Razlog tome je najvjerojatnije otežan transport spermija zbog hormonalne neravnoteže nakon vađenja gestagena iz plotkinja. Koriste se sljedeći gestageni: implantati, injekcije, PRID (*progesterone releasing intravaginal device*) i CIDR (*controlled internal drug release device*) spirale. Najčešće su u uporabi intravaginalne spužvice, tzv. PRID i CIDR spirale koje u sebi sadrže progesteron i estradiol benzoat, a vrlo često se koriste u kombinacijama s drugim hormonima (eCG, PGF<sub>2α</sub>). Implantati se češće koriste u krava i junica u obliku supkutanih ušnih implantata u kombinaciji s estradiolom (Samardžija i sur., 2010.).

## 4.3. 17β-ESTRADIOL

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

## 5. ZLOUPORABA SPOLNIH HORMONA U ANABOLIČKE SVRHE KAO POSPJEŠIVAČA RASTA U INTENZIVNOJ STOČARSKOJ INDUSTRIJI

Egzogeni spolni hormoni koriste se u svijetu već više od pola stoljeća zbog poboljšanog prirasta i iskoristivosti hrane kod farmских životinja. Osim prirodnih spolnih hormona, tri sintetičke kemijske supstance s estrogenim (zeranol), gestagenim (melengestrol acetat) i androgenim (trenbolon acetat) djelovanjem često su se primjenjivale u poticanju rasta stoke. Korištenjem prirodnih spolnih hormona tijekom uzgoja farmских životinja dobiva se meso boljih organoleptičkih svojstava, s manjom količinom masnog tkiva i većim udjelom mišićnog tkiva (Samardžija i sur., 2015.).

Anabolički se učinak ostvaruje direktnim i indirektnim mehanizmom djelovanja i pritom rezultirajući smanjenom ekskrecijom, odnosno pojačanom retencijom dušičnih spojeva te posljedičnom pojačanom sintezom proteina (Van Der Wal i Berende, 1983., Meyer, 2001.). Upravo je takav učinak ovih tvari u prošlosti bio izazov za njihovu nelegalnu primjenu. Učinkovitost ovisi o vrsti, pasmini, starosti i reproduktivnom statusu životinje te načinu primjene hormona (Michael i Baulieu, 1980.), a rast može biti povećan i do 20% (Meyer, 2001.).

Da bi se ustvrdila nelegalna primjena prirodnih ili sintetičkih hormonskih pripravaka u farmских životinja potrebno je poznavati fiziološke koncentracije spolnih hormona u životinja. Međutim, budući da se spolni hormoni fiziološki nalaze u organizmu, a njihova količina varira u ovisnosti o brojnim parametrima, prisutnost u tekućinama, tkivima i organima ne upućuje automatski na nelegalnu primjenu u farmских životinja. Zato se u cilju valjane prosudbe provode brojna istraživanja o fiziološkim razinama hormona u različitim životinjskih vrsta i u ovisnosti o brojnim čimbenicima (Pleadin i sur., 2011.b).

Od 1988. godine u Europskoj uniji Direktivom Vijeća 88/146/EEC (Anonymous., 1988.) zabranjeno je korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak u smislu njihova anaboličkog djelovanja u domaćih životinja (Heitzman, 1993.). S obzirom na stalni razvoj novih sintetskih tvari i moguću zlouporabu tzv. "koktela" s niskim udjelima aktivnih tvari iz ove skupine, potreban je kontinuirani nadzor njihove primjene tijekom tova životinja i na klaonici, s konačnim ciljem proizvodnje zdravstveno ispravne hrane životinjskog podrijetla i zaštite zdravlja potrošača (Pleadin i Bogdanović, 2017).

## 5.1. 17 $\beta$ -ESTRADIOL

Estrogeni u obliku 17 $\beta$ -estradiola ili estradiol benzoat-a su bili najviše korišteni, a progesteron, testosteron i pojedini sintetski hormoni općenito korišteni u kombinaciji s estrogenima, najviše u obliku tableta i implantata (Andersson i Skakkebaek, 1999.). Oralna ili parenteralna primjena 17 $\beta$ -estradiola, u ovisnosti o dozi i trajanju izloženosti, može uzrokovati povećanu pojavnost tumora u tkivima pokusnih životinja s velikom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (maternica, rodnica, vrat maternice, mliječne žlijezde), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre (Zimmerman, 1998.). S vremenom se uspjelo proizvesti steroidne hormone pa tako sintetički estradiol gotovo iste strukture, dietilstilbestrol (DES) ima jednak biološki učinak, a kemijski je potpuno različit od prirodnih estrogena. DES je za primjenu u veterinarskoj medicini već godinama zabranjen zbog kancerogenog djelovanja (Samardžija i sur., 2010.).

17 $\beta$ -estradiol ima indirektan i direktan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika, povećanje sinteze proteina, povećanje iskorištavanja hrane, a time i povećani rast životinja u stočarskoj industriji za oko 5-15% (Meyer, 2001.). Utjecaj ovog hormona s anaboličkim djelovanjem na rast životinja ovisi o vrsti i pasmini životinje, dobi, spolu i primjenjenoj dozi, a ostvaruje se neposrednom stimulacijom povećanja mišićne mase preko estrogenih receptora. Uobičajeno se davao u kombinaciji s drugim spojevima androgenog i gestagenog djelovanja (Meyer i Rapp, 1985.).

## 5.2. TESTOSTERON

Po pitanju testosterona, istraživanja su pokazala da pojava tumora i drugih promjena u životinja koje su bile tretirane testosteronom ima isključivu vezu s njegovim hormonskim djelovanjem. U kombinaciji sa 17 $\beta$ -estradiolom ima kancerogeno djelovanje i može uzrokovati mutacije gena u teladi (Toffolatti i sur., 2006.).

### 5.3. PROGESTERON

Primjena progesterona kao anabolika u veterinarskoj medicini je gotovo identična primjeni testosterona. Nakon peroralne primjene uglavnom je nedjelotvoran, jer ima slabu bioiskoristivost. Koristio se u stočarskoj proizvodnji u obliku supkutanih ušnih implantanata. Toksični učinci kao što su: tumori jajnika, mliječne žlijezde, rodnice i maternice pojavljaju se zbog dugotrajne primjene ovog hormona (Carr, 1998.).

### 5.4. PRIMJER KORIŠTENJA PRIRODNIH HORMONA U ANABOLIČKE SVRHE

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

## 6. FIZIOLOŠKE RAZINE SPOLNIH HORMONA I PROSUDBA O ZLOUPORABI

Fiziološke koncentracije spolnih hormona u domaćih životinja variraju ovisno o brojnim čimbenicima, kao što su: vrsta, pasmina, dob i spol, spolna zrelost (ranozrelost ili kasnozrelost), ali i o uvjetima uzgoja (Heitzman, 1994., Schilt i sur., 1996.). Na razinu spolnih hormona mogu utjecati i različite biljne vrste, odnosno njihovi metaboliti, koje se nalaze na pašnjacima ili u stočnim krmivima i koncentratima te se koriste u hranidbi farmskih životinja, poput: izoflavona, laktona rezorcilne kiseline, kumestana, zearelenona koji je doduše mikotoksin plijesni iz porodice *Fusarium*, itd. (Barnes, 2010.).

Uzimajući u obzir sve navedene faktore, jako je teško utvrditi standardne fiziološke razine ovih hormona. Steroidni hormoni su dobro topivi u lipidima te lako prolaze stanične membrane pa tako jednostavno prelaze iz krvi u mlijeko, a razina prijenosa ovisi i o brojnim faktorima, kao što je: vrsta životinje i hormona, koncentracija hormona u krvi, molekularna masa, relativna topljivost u vodi i lipidnoj fazi u tkivu i tjelesnim tekućinama te o nekim drugim čimbenicima. Stoga se kod primjene na farmskim životinjama svakako u obzir treba uzeti fiziološka razina hormona i njihovih metabolita za tu vrstu i kategoriju životinja, kao i činjenica da koncentracije uvelike variraju (Samardžija i sur., 2015.).

U koza, progesteron se metabolizira u mliječnim žlijezdama, a nastali metaboliti se uklanjaju putem venske cirkulacije vimena, a ne putem mlijeka. Za razliku od koza, mliječne žlijezde krava ne sintetiziraju niti metaboliziraju progesteron, a progesteron koji se izlučuje putem mlijeka čini manje od 3% ukupne proizvodnje u organizmu koza i krava. Unatoč tome razina progesterona je dva do četiri puta manja u plazmi nego u mlijeku, što se može objasniti njegovom relativno većom topljivošću u mastima u odnosu na vodeni medij u usporedbi s estrogenima i kortizolom. Koncentracija u mlijeku prelazi koncentraciju u krvi 4-5 dana prije teljenja. Količine progesterona koje se izlučuju prije porođaja u prosjeku su 31 µg/dan u mlijeku i 22 µg/dan u kolostrumu te 14 µg/dan tijekom rane laktacije (Erb i sur., 1977.).

Dostupni literaturni podatci pokazuju da kod krava razine 17β-estradiola variraju ovisno o fazi spolnog ciklusa te o stadiju gravidnosti. Podatci za junice koje još nisu gravidne pokazuju vrijednosti u plazmi od 0,3-2,2 ng/L (Nakada i sur., 2000.). Signifikatno veće razine utvrđene su u gravidnih krava u rasponu od 52-277 ng/L, uz variranje po danima prije teljenja (Heitzman i sur., 1979.). U istraživanju Shafie i sur. (1982.) određena je koncentracija 17β-estradiola u plazmi s maksimalnom vrijednosti od 20 ng/L tijekom folikularne faze ciklusa te

značajna povezanost razine  $17\beta$ -estradiola s godišnjim dobima. Jedino u plazmi gravidnih krava ili plazmi ilegalno tretiranih životinja utvrđene su razine  $17\beta$ -estradiola veće od 100 ng/L (Hoffmann i Evers, 1986.).

Koncentracije progesterona u plazmi krava kreću se u rasponu od 0,2-8 ng/mL, a tijekom gravidnosti u rasponu od 8-12 ng/mL (EMEA, 1999.). U ženske teladi dopuštena koncentracija progesterona je 0,4 ng/mL, a u muške teladi 0,1 ng/mL. Koncentracija testosterona karakteristična je ovisno o dobi životinje i kreće se u muške i ženske junadi do 0,1 ng/mL, a u bikova do 20 ng/mL, dok bi koncentracije hormona više od navedenih upućivale na zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe (Hoffmann i Evers, 1986.).



## 7. KUMULACIJA HORMONA U ŽIVOTINJSKIM TKIVIMA I OSTATCI (REZIDUE) U HRANI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA

Budući da prirodni spolni hormoni predstavljaju endogene hormone, mogu se smatrati normalnim prirodnim sastojkom hrane životinjskog podrijetla kao što su: mlijeko, mliječni proizvodi i jestiva tkiva. Međutim, povišene se koncentracije ovih tvari mogu pronaći u proizvodima dobivenim od farmskih životinja koje su bile ilegalno tretirane sa steroidnim hormonima kao promotorima rasta, odnosno anabolicima. Istraživanja pokazuju da uporaba prirodnih spolnih hormona tijekom hranidbe životinja može uzrokovati hormonsku aktivnost u organizmu gotovo identičnu fiziološkoj aktivnosti te imati stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva, ali i uzrokovati brojne toksične učinke kod potrošača kontaminirane hrane životinjskog podrijetla kao što je mlijeko, meso i jaja (Pleadin i sur., 2009., Pleadin i sur., 2011.a).

Zbog činjenice da kontinuirana primjena steroidnih spolnih hormona na farmskim životinjama može dovesti do kumulacije rezidua u proizvodima životinjskog podrijetla te opasnih posljedica za zdravlje ljudi (Lone, 1997., FAO/WHO, 2000.), njihova primjena, kao i primjena ostalih tvari s anaboličkim učinkom, u Europskoj uniji je zabranjena. Terapeutska uporaba ovih tvari ograničena je u farmskih životinja uglavnom na primjenu kod poremećaja u reprodukciji i tijekom gravidnosti (El-Zarkouny i Stevenson, 2004., Alnimer i Huseina, 2007., Colazo i sur., 2007.).

### 7.1. NADZOR REZIDUA

U Hrvatskoj je nadzor zlouporabe tvari s anaboličkim djelovanjem tijekom tova životinja i na klaonici reguliran preko Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR) koji je propisan od strane Ministarstva poljoprivrede. Analize tvari s anaboličkim učinkom provode se sukladno odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/2005), a rezultati analiza se u ovisnosti o ispitivanom parametru uspoređuju s najvećom dopuštenom količinom (NDK) ili najmanjom zahtijevanom granicom učinkovitosti izvedbe metoda (*MRPL-minimum required performance limit*), a u slučaju prirodnih hormona u odnosu na fiziološku razinu (Pleadin i sur., 2009.).

Budući da su spolni hormoni dio endokrinog sustava i nalaze se u biološkom materijalu životinja u fiziološkim razinama, njihov nalaz u životinjskim tkivima i tekućinama nije

pouzdan dokaz ilegalnog korištenja kao promotora rasta, a variranje koncentracija s obzirom na brojne čimbenike otežava identifikaciju zlouporabe ovih tvari u anaboličke svrhe i određivanje granica kod kojih se poduzimaju mjere od strane nadležnih tijela (Le Bizec i sur., 2009.). Da bi se moglo sa sigurnošću procijeniti radi li se o fiziološkoj koncentraciji hormona ili o njihovoj povišenoj koncentraciji zbog zlouporabe, uz podatke o razinama u biološkom materijalu, nužno je uzeti u obzir i podatke o životinji, kao i anamnestičke podatke (Pleadin i sur., 2011.a, Pleadin i sur., 2011.b).

## 7.2. TOKSIČNOST REZIDUA

Najveći broj istraživanja toksičnosti prirodnih steroidnih hormona govori o 17 $\beta$ -estradiolu i povezano je s njegovim hormonskim djelovanjem, vjerojatno zato jer je on od svih prirodnih spolnih hormona bio najviše primjenjivan i zlopotrebljavan. Njegovi mutageni, kancerogeni i teratogeni učinci dokazani su u brojnih životinjskih vrsta. Oralna, a osobito parenteralna primjena 17 $\beta$ -estradiola, ovisno o dozi i trajanju izloženosti, može prouzročiti povećanu pojavnost tumora kod tretiranih životinja i to u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, dojka), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre (Zimmerman, 1998.). Rast mliječnih žlijezda, orožnjavanje vaginalnog epitela i slični toksični učinci jasni su pokazatelji morfoloških promjena. Biokemijske promjene uzrokovane 17 $\beta$ -estradiolom (promjene u genskoj ekspresiji, prijenos signala i regulacija staničnog ciklusa) mnogo su suptilnije i samim time manje primjetljive od morfoloških promjena, iako su zasigurno jednako važne. 17 $\beta$ -estradiol, kao i ostali steroidni hormoni, u mliječnim žlijezdama prolaze barijeru krv-mlijeko, a podatci pokazuju da je dnevni unos ovog hormona putem konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda u ljudski organizam oko 60-70% od ukupnog unosa, a konzumacijom mesa, ribe i jaja oko 15-20% (Hartmann i sur., 1998.).

Suprotno tome, istraživanja pokazuju da je u većini slučajeva kod unosa mesa liječenih životinja u ljudski organizam, kada se ove tvari pravilno koriste u terapijske svrhe, beznačajan njihov učinak u usporedbi s fiziološkom endogenom produkcijom hormona u čovjeka. Istraživanja spolnih hormona u tkivima životinja nepotpuna su i nedostatna za mnoge životinjske vrste i pasmine te su u ovisnosti o brojnim čimbenicima. Da bismo dobili utemeljenije procjene zlouporabe potrebna su daljnja istraživanja ovih tvari i njihovih metabolita, budući da i metaboliti u organizmu imaju biološku aktivnost (Andresson i Skakkebaek, 1999.).

### 7.3. KONCENTRACIJE SPOLNIH HORMONA U TKIVIMA

Koncentracije spolnih hormona određene u jestivim tkivima farmских životinja prikazane su u Tablici 1. Najveće količine estrogena u mlijeku odnose se na biološki neaktivan  $17\alpha$ -estradiol (oko 160 ng/L), zatim estron (oko 30 ng/L), a najmanje na  $17\beta$ -estradiol (oko 10 ng/L) (Erb i sur., 1977.). Podatci govore o koncentracijama  $17\beta$ -estradiola od 10-20 ng/kg u govedem mesu (Kushinsky, 1983.) te u rasponu od 10-60 ng/L u neprerađenom mlijeku (Erb i sur., 1977., Hoffmann i Rattenberger, 1977.). S obzirom da je  $17\beta$ -estradiol lipofilni hormon, njegova koncentracija u mlijeku ovisi o količini, odnosno postotku masti. Osim toga, procesiranje namirnica životinjskog podrijetla nije ukazalo na značajan utjecaj tih procesa na razine  $17\beta$ -estradiola (Hartmann i sur., 1998.). Pleadin i sur. (2013.) odredili su vrlo niske koncentracije  $17\beta$ -estradiola u mesu i mlijeku te zaključili da je hranom životinjskog podrijetla moguć vrlo niski dnevni unos ovog hormona u ljudski organizam, kao što su pokazala i ranije provedena istraživanja (Hartmann i sur., 1998.). Koncentracije  $17\beta$ -estradiola u mesu bile su u rasponu od 10-21 ng/kg ( $13 \pm 5$  ng/kg), a u mlijeku od 10-35 ng/L ( $19 \pm 13$  ng/L).

Statističkom obradom rezultata nisu utvrđene statistički značajne razlike između analiziranih skupina uzoraka (Pleadin i sur., 2013.). Najveća prosječna fiziološka koncentracija progesterona određena je u masnom tkivu, s utvrđenim vrijednostima od 2,5  $\mu$ g/kg u bikova, 5,8  $\mu$ g/kg u teladi, 16,7  $\mu$ g/kg u junica i 239-360,2  $\mu$ g/kg u gravidnih krava. Manje koncentracije ovog hormona određene su u jetri, bubrezima i mišićnom tkivu (0,12-0,46  $\mu$ g/kg u teladi i junadi te 3,4-1,01  $\mu$ g/kg u gravidnih krava). U mlijeku i mliječnim proizvodima razina progesterona bila je proporcionalna s postotkom mliječne masti te ovisi o fazi ciklusa u mliječnim krava, s minimalnim koncentracijama u estrusu (manjim od 0,2-0,92  $\mu$ g/L), a najvećim razinama tijekom lutealne faze (0,2-30  $\mu$ g/L) i gravidnosti (20-35,7  $\mu$ g/L). Rezultati istraživanja pokazuju da nakon intravenoznog, intramuskularnog ili intravaginalnog liječenja goveda progesteronom, koncentracija ovog hormona u mlijeku visoko korelira s koncentracijama u plazmi te da su koncentracije progesterona u mlijeku povišene samo u prvih nekoliko mužnji nakon liječenja, ali ipak nisu puno veće od vrijednosti određenih u fiziološkim uvjetima (EMEA, 1999.).

Istraživanja pokazuju da i brojne druge namirnice sadrže hormonalno aktivne tvari u razinama značajno većim u odnosu na meso i mlijeko te da se jači i nepovoljniji utjecaj na zdravlje ljudi može očekivati unosom fitoestrogena koji se pojavljuje u biljkama u velikim količinama ili izlaganjem nekim okolišnim tvarima s hormonskim djelovanjem. Znanstvene

spoznaje o učinku mnogih tvari se svakodnevno mijenjaju i otkrivaju se njihovi mogući neželjeni učinci te je osim spolnih hormona kod pojedinih vrsta životinja važno pratiti i sudbinu drugih neistraženih tvari koje isto tako mogu imati anabolički učinak (Pleadin i sur., 2013.).

**Tablica 1.** Koncentracije spolnih hormona u jestivim tkivima farmskih životinja (Hoffmann Rattenberger, 1977., Henricks i Torrence 1977., Hoffmann 1980., Samardžija i sur., 2015.).

životinje/tkiva	estron (pg/mL)	17 $\beta$ -estradiol (pg/mL)	testosteron (pg/g)	progesteron (pg/g)
TELE mišić jetra bubreg mast		< 100 < 100 < 100 < 100	70 47 685 340	6
BIK mišić jetra bubreg mast			335 749 2783 10950	
JUNICA mišić jetra bubreg mast	20-40	12-13 38-71 40-71 6	92 193 595 250	16
KRAVA GRAVIDNA mišić mast	3870	370-860 2500-5500		336
VOL mišić jetra mast	6 20 23	14 14 10		

## 8. ZAKONODAVSTVO U KONTROLI ANABOLIČKE PRIMJENE PRIRODNIH HORMONA

U cijeloj Europskoj uniji pa tako i u Hrvatskoj, radi mogućeg štetnog utjecaja na zdravlje ljudi zabranjeno je korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak da bi se postiglo anaboličko djelovanje u farmских životinja, a uporaba prirodnih steroidnih spolnih hormona u terapijske svrhe je ograničena na slučajeve poremećaja u reprodukciji, odnosno poremetnje tijekom gravidnosti (Direktiva 1996/22/EC, Direktiva 2003/74/EC).

Da bi se spriječila zlouporaba korištenja spolnih hormona kao promotora rasta neophodno je provođenje sustavnog monitoringa i kontrole ostataka u biološkom materijalu farmских životinja, uzorkovanom za vrijeme tova životinja te na liniji klanja, a regulirano je putem godišnje propisanih Državnih programa monitoringa rezidua. U cijeloj Europskoj uniji pa tako i u Republici Hrvatskoj, korištenje spolnih hormona u veterinarskoj medicini dopušteno je isključivo u terapijske svrhe, uz ispravno dokumentiranje njihove primjene te je Naredbom o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmским životinjama (NN 51/2013) izričito zabranjena njihova uporaba u anaboličke svrhe.

Kemijske analize tvari s anaboličkim učinkom provode se u skladu s odredbama o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/2005) te se rezultati analiza u ovisnosti o testiranom parametru uspoređuju s obzirom na njihove utvrđene fiziološke razine (Pleadin i sur., 2009.).

Vrlo bitnu ulogu u nadzoru ovih tvari, osim nadležnih tijela, imaju i veterinarske službe koje svakako trebaju prikladno uzeti uzorak za analizu te evidentirati sve potrebne podatke o farmским životinjama. Jako važnu ulogu imaju i kontrolni laboratoriji koji provode analitičko određivanje ovih tvari primjenom prikladnih analitičkih metoda te temeljem vjerodostojnih podataka i utvrđenih fizioloških razina utvrđuju sukladnost s odrednicama propisanim zakonodavstvom (Samardžija i sur., 2015.).

### 8.1. ANALITIČKE METODE

Detekcija i kvantifikacija steroidnih prirodnih hormona provodi se korištenjem *screening* i potvrdnih metoda, uz kvalitativnu i kvantitativnu primjenu. Bez obzira koja se analitička metoda koristi, prethodno treba biti provjerena određivanjem validacijskih parametara, mora davati točne i precizne podatke te biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih

koncentracija spolnih hormona, odnosno imati niske limite detekcije (Pleadin i sur., 2009.). Od *screening* metoda najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) te radioimunoenzimska metoda (RIA – *radioimmunoassay*). ELISA metoda znatno ubrzava broj analiziranih uzoraka, a prihvatljiva je i ekološki budući da smanjuje uporabu organskih otapala, a i gospodarski, jer snižava cijenu korištenja. Prethodna istraživanja pokazuju da se pri korištenju komercijalno dostupnih kitova za imunoenzimsku metodu u kvantitativnim analizama spolnih hormona postižu vrlo niski limiti detekcije, odnosno visoka osjetljivost metode, ali ujedno i nedovoljna specifičnost, budući da dolazi do *cross*- reakcija s konjugiranim metabolitima i stereoizomerima. Rezultati isto tako pokazuju da kvaliteta ELISA kitova varira od proizvođača do proizvođača, a postoje i razlike i u različitim serijama kitova istog proizvođača.

S obzirom da *screening* metode mogu rezultirati „lažno pozitivnim“ rezultatima, potrebno je na uzorcima na kojima je *screening* metodom dobiven povišen rezultat, veći od utvrđenih fizioloških razina (sumnja na zlouporabu u anaboličke svrhe), provesti potvrdnu metodu koja će omogućiti selektivno određivanje ovih tvari. Nerijetko se potvrdne metode u analizama prirodnih hormona primjenjuje kao prvi i jedini analitički postupak bez prethodne primjene *screening* metoda. Kao prikladne potvrdne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju selektivno određivanje, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje prisutnosti hormona s anaboličkim učinkom spektrometrijom masa (MS) te LC ili GC uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom. LC/MS/MS tehnika ima općenito najznačajniju primjenu u analizama ostataka tvari s anaboličkim učinkom i ima prednost u odnosu na plinsku kromatografiju jer ne zahtijeva derivatizacijski korak prije analize (Pleadin i sur., 2011.a).

## 8.2. DOPUŠTENE KONCENTRACIJE

Propisane razine  $17\beta$ -estradiola za poduzimanje mjera zbog sumnje na zlouporabu definirane su Direktivom Vijeća 1996/22/EC i odnose se na plazmu goveda, a podijeljene su po dobi i spolu životinja. Kako bi se isključila mogućnost dobivanja velikog broja lažno pozitivnih rezultata, granica pri kojoj se poduzimaju mjere za  $17\beta$ -estradiol u plazmi, za oba spola i sve dobne skupine goveda, postavljena je na nešto veću razinu u odnosu na prosječne fiziološke razine i to do najviše 40 ng/L za negravidna i 4000 ng/L za gravidna goveda (Heitzman, 1994.). Kod koncentracija ovog hormona u plazmi goveda većih od navedenih,

sve upućuje na zlouporabu u anaboličke svrhe. Podatci pokazuju da je plazma najpouzdaniji matriks u detekciji razine hormona, ujedno i njihove terapijske primjene ili zlouporabe u anaboličke svrhe, s vrlo niskim limitima detekcije hormona te stoga i predstavlja uobičajeni matriks nadzora (Scippo i sur., 1994., Pleadin i sur., 2011.b).

Istraživanja anaboličkog učinka te nadzor zlouporabe spolnih hormona u većini europskih zemalja najznačajnija su za 17 $\beta$ -estradiol i to zbog utvrđene najizraženije anaboličke aktivnosti ovog hormona, naročito u goveda i ovaca. Granica pri kojoj se poduzimaju mjere sa sumnjom na anaboličku primjenu 17 $\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi je 0,04 ng/mL u muške i ženske teladi (Heitzman, 1994.). Samo u plazmi gravidnih krava ili plazmi ilegalno tretiranih životinja koncentracija 17 $\beta$ -estradiola može se kretati od 0,1-1 ng/mL. Prilikom procjene analitičkih rezultata koji se odnose na koncentracije spolnih hormona važno je uzeti u obzir i sve poznate čimbenike koji bi mogli utjecati na interpretaciju dobivenih rezultata te bi u slučaju sumnjivo pozitivnih uzoraka trebalo primjeniti neku od potvrđenih analitičkih metoda (Samardžija i sur., 2015.).

## 9. ZAKLJUČCI

Prirodni steroidni spolni hormoni (estrogeni, progestini, androgeni) imaju veliki anabolički potencijal, ali su nažalost nuspojave njihova interferiranja s hormonima koji se nalaze u fiziološkim koncentracijama u organizmu životinja prilično nepoželjne. To možda i ne bi bilo toliko problematično s aspekta tovnih životinja koje imaju relativno kratki životni vijek pa se većina nuspojave ne stigne manifestirati, ali je problematično s gledišta životinja koje služe za dugotrajniju proizvodnju, npr. mlijeka, jer tada nuspojave počinju dolaziti do izražaja i stvarati probleme, odnosno uzrokovati patofiziološke poremećaje i djelovati toksično kod takvih životinja. No, glavni i najbitniji razlog zabrane korištenja tih tvari kao anabolika je pojava njihove akumulacije u tkivima proizvodnih životinja te eliminacije preko tjelesnih tekućina što može rezultirati prisutnošću rezidua navedenih hormona i njihovih metabolita u hrani životinjskog podrijetla (mlijeko, meso, iznutrice, jaja). Rezidue ovih tvari i njihovih metabolita potrošači preko hrane mogu unijeti u organizam, a poznato je da imaju mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje te uzrokuju hormonalni disbalans, što može ugroziti zdravlje ljudi. Stoga je opravdana zabrana njihova korištenja kao promotora rasta u farmских životinja.

Kod terapijske primjene najčešće ne postoji alternativa pa se moraju primjeniti navedeni hormoni no veoma je bitno da se aplicira propisana terapijska doza, jer je utvrđeno da tada nema znatnijih odstupanja od fizioloških koncentracija u namirnicama životinjskog podrijetla. U budućnosti će se sigurno pronaći i neka alternativna sredstva za terapiju, a i sustavi kontrole će sigurno biti još učinkovitiji te će manipulacija i zlouporaba biti manje. Bitno je provoditi daljnja istraživanja i utvrditi fiziološke razine hormona za nepoznate vrste i kategorije životinja, a od posebnog značenja će biti utvrđivanje koncentracija metabolita tih hormona i istraživanje njihova utjecaja na organizam, jer se o tim tvarima jako malo zna, a moguće je da je njihov učinak još i bitniji od učinka samih hormona.



## 10. SAŽETAK

17 $\beta$ -estradiol, progesteron i testosteron su najbitniji predstavnici triju skupina prirodnih steroidnih spolnih hormona koji su se upotrebljavali kao promotori rasta u intenzivnoj stočarskoj industriji. Njihov učinak na prirast i poboljšanje organoleptičkih svojstava je veoma pozitivan pa su se stoga i primjenjivali dugi niz godina u tovu životinja, sve dok se nisu otkrile nuspojave njihova djelovanja. Naime, dugotrajno korištenje ovih tvari ima toksične, mutagene, teratogene i karcinogene učinke kod životinja, a kao posljedica anaboličke primjene ovih tvari kumuliraju se rezidue u životinjskim tkivima te se eliminiraju tjelesnim tekućinama, a ujedno i putem mlijeka. Potrošači time mogu biti izloženi ovim tvarima konzumirajući namirnice životinjskog podrijetla (mlijeko, meso, jaja), uzrokujući kod ljudi još veći broj nuspojava i štetnih posljedica nego kod životinja. Iz navedenih razloga još 1988. godine zabranjena je uporaba steroidnih spolnih hormona kao anabolika u cijeloj EU te je njihova primjena ograničena samo u terapijske svrhe za liječenje poremećaja reprodukcije i gravidnosti. Kod određivanja koncentracija hormona u hrani životinjskog podrijetla vrlo je bitno znati fiziološke koncentracije navedenih hormona kako bi mogli odrediti je li došlo do zlouporabe ili se radi o fiziološkim referentnim vrijednostima. Fiziološke koncentracije veoma variraju i ovise o mnogo čimbenika pa kod razmatranja rezultata treba uzeti u obzir i anamnestičke podatke te podatke o hranidbi i držanju životinja. Današnji sustavi kontrole su sve detaljniji, a dijagnostički testovi sve precizniji pa su i rezultati pretraga puno pouzdaniji, a hrana životinjskog podrijetla sigurnija za konzumaciju potrošača. S obzirom na stalni razvoj novih sintetskih tvari i moguću zlouporabu tzv. "koktela" s niskim udjelima aktivnih tvari s anaboličkim učinkom, potreban je kontinuirani nadzor njihove primjene tijekom tova životinja i na klaonici.

## 11. SUMMARY

### **Control of illegal use of natural sex hormones in farm animals**

The most important representatives of the three groups of natural steroid sex hormones that have been used as growth promoters in the intensive livestock industry are:  $17\beta$ -estradiol, progesterone and testosterone. Their effects on growth and improvement of the organoleptic properties are very positive, because that they have been applied in farm animals for a long time before their side effects were revealed. Long-term use of these substances has toxic, mutagenic, teratogenic and cancerous effects on animals. As a result of anabolic application, accumulation of residues occurs in animal tissues and the elimination of the substances is performed through the bodily fluids, including milk. Consumers could be exposed to these substances by consuming food products of animal origin (milk, meat, eggs), causing even more severe side effects and harmful repercussions in humans than in animals. Because of the mentioned reasons, anabolic use of steroid sex hormones was banned by law in 1988 in the whole EU. Their application is limited only to therapeutic purposes to treat reproductive and gestation disorders. For determining concentrations of steroid sex hormones in food of animal origin, it is essential to know physiological concentrations of the mentioned hormones, in order to know if the results are a consequence of abuse or physiological referent values. Physiological values can vary and it depends on many factors. So when we discuss the results, we have to consider anamnestic information and facts about feeding and animal accommodation. The current control systems are more detailed, the diagnostic tests are more precise, so the results are more reliable and animal food products are safer for consumers. Therefore, the constant development of new synthetic substances and possible abuse of so-called "cocktails" with low levels of active substances with anabolic effects and thus the continuous monitoring of their use is required during farm animal breeding and in slaughterhouses.

## 12. LITERATURA

1. ALNIMER, M. A., M. Q. HUSEIN (2007): The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 363-369.
2. ANDERSSON, A.-M., N. E. SKAKKEBAEK (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur. J. Endocrinol.* 140, 477-485.
3. ARTS, C. J. M., M. J. VAN BAAK, J. M. P. DEN HARTOG (1991): Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *J. Chromatography* 564, 429-444.
4. BARNES, S. (2010): The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Res. Biol.* 8, 89-98.
5. CARR, B. R. (1998): Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: J. D. Wilson, D. W. Foster, H. M. Kronenberg and P. R. Larsen (eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, W. B. Saunders Co., pp. 751-817.
6. CERGO LJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija (M. Samardžija, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
7. COLAZO, M. G., J. P. KASTELIC, J. A. SMALL, R. E. WILDE, D. R. WARD, R. J. MAPLETOFT (2007): Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *Can. Vet. J.* 48, 49-56.
8. Committee for Veterinary Medicinal Products (1999): Progesterone. EMEA/MRL/146/96: 1-4.
9. Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Official Journal of the European Union: Legis.* L125, 3.
10. DESHPANDE, S. S. (2002): Drug Residues, In: *Handbook of Food Toxicology*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 865-880.
11. Directive 2003/74/EC of the European parliament and of the council of 22 September 2003 amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. *Official Journal of the European Union: Legis.* L 262/17.

12. DUKES, H. (1975): Djuksova fiziologija domaćih životinja. Svjetlost, izdavačko poduzeće, Sarajevo, 8. izdanje, 1237-1245.
13. EL-ZARKOUNY, S. Z., J. S. STEVENSON (2004): Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. *J. Dairy Sci.* 87, 3306-3321.
14. ERB, R. E., B. P. CHEW, H. F. KELLER (1977): Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and blood, and excretion of estrogen in urine. *J. Anim. Sci.* 46, 617-626.
15. Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation (FAO/WHO) (2000): Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Estradiol-17 $\beta$ , progesterone and testosterone. The Fifty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 43.
16. GRIFFIN, J. E., J. D. WILSON (1998): Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Williams Textbook of Endocrinology, 9<sup>th</sup> ed., (ed.) Wilson, J. D. et al., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 819-876.
17. GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 11. izdanje, str. 1004-1007, 1016-1018.
18. HARTMANN, S., M. LACORN, H. STEINHART (1998): Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 62, 7-20.
19. HEITZMAN, R. J. (1993): Veterinary drug residues, 2<sup>nd</sup> edition, Commission of the European Communities, Brussels, pp. 7/15-7/40.
20. HEITZMAN, R. J. (1994): Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products: Reference Materials and Methods. Oxford: Blackwell Science.
21. HEITZMAN, R. J., D. J. HARWOOD, R. M. KAY, W. LITTLE, C. B. MALLINSON, I. P. REYNOLDS (1979): Effects of implanting prepuberal dairy heifers with anabolic steroids on hormonal status, puberty and parturition. *J. Anim. Sci.* 48, 859-866.
22. HENRICKS, D. M., A. K. TORRENCE (1977): Endogenous oestrogens in bovine tissues. *J. Anim. Sci.* 46, 652-658.
23. HOFFMANN, B., E. RATTENBERGER (1977): Testosterone concentrations in tissue from veal calves, bulls and heifers, and in milk samples. *J. Anim. Sci.* 46, 635-641.

24. HOFFMANN, B. (1980): Aspects of residue determination and safety control (metabolism and measurement of residues of growth promoters). International symposium on steroids in animal production, Warsaw.
25. HOFFMANN, B., P. EVERS (1986): Anabolic agents with sex-hormone-like activities: problems of residues. In: Drug Residues in Animals. Rico, A. G. (ed.), Academic Press, New York, pp. 111-146.
26. KUSHINSKY, S. (1983): Safety aspects of the use of cattle implants containing natural steroids. International Symposium on Safety Evaluation of Animal Drug Residues, Berlin.
27. Le BIZEC, B., G. PINEL, J.-P. ANTIGNAC (2009): Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chromat. A*, 1216, 8016-8034.
28. LONE, K. P. (1997): Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: Growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism mode of action, residues, methods and epidemiology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 93-209.
29. MARTIN, C. N., A. C. McDERMID, R. C. GARNER (1978). Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells. *Cancer Res.* 38, 2621-2627.
30. MEYER, H. H. D. (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.* 109, 1-8.
31. MEYER, H. H. D., M. RAPP (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 60, 294-300.
32. MEYER, H. H. D., H. KARG (1989): Growth stimulators for farm animals: mode of action, effects on meat quality and potential risk originating from residues. In: Proceedings of FAO/CAAS Workshop on Biotechnology in Animal Production and Health in Asia and Latin America, Beijing, pp. 49-58.
33. MICHEL, G., E. E. BAULIEU (1980): Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology* 107, 2088-2098.
34. NAKADA, K., M. MORIYOSHI, T. NAKAO, G. WATANABE, K. TAYA (2000): Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 beta, testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domest. Anim. Endocrinol.* 18, 57-69.
35. Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmskim životinjama (NN 51/2013).

36. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. *Meso* 11, 360-365.
37. PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ, N. VAHČIĆ (2013):  $17\beta$ -estradiol u govedem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44-49.
38. PLEADIN, J., N. PERŠI, B. ANTOLOVIĆ, B. ŠIMIĆ, I. KMETIČ (2011a): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 48-56.
39. PLEADIN, J., S. TERZIĆ, N. PERŠI, A. VULIĆ (2011b): Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. *Biotechnol. Anim. Husband.* 27, 147-159.
40. PLEADIN, J., T. BOGDANOVIĆ (2017): Anabolici u proizvodnji mesa - Učinci u farmskih životinja i opasnosti po zdravlje potrošača. *Meso* 19, 59-67.
41. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 02/2005).
42. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i ruralnog razvoja (NN 75/2008).
43. ROBBOY, S. J., O. TAGUCHI, G. R. CUNHA (1982): Normal development of the human female reproductive tract and alterations resulting from experimental exposure to diethylstilbestrol. *Hum. Pathol.* 19, 190-198.
44. SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. (M. Samardžija i M. Poletto, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
45. SAMARDŽIJA, M., B. VUDRAG, J. PLEADIN (2015) Spolni hormoni u farmskih životinja: fiziološke razine, terapijska i anabolička primjena. *Vet. stn.* 46, 281-293.
46. SCHILT, R., R. W. STEPHANY, C. J. M. ARTS, L. M. H. FRIJNS (1996): Estradiol levels in urine of veal calves as indicator of treatment: Possibility or fiction? Euroresidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, The Netherlands.
47. SCIPPO, M. L., G. DEGAND, A. DUYCKAERTS, G. MAGHUIN-ROGISTER (1994): Control of the illegal administration of natural steroid hormones in plasma of bulls and heifers. *Analyst.* 119, 2639-2644.

48. SHAFIE, M. M., H. MOURAD, A. BARKAWI, M. B. ABOUL-ELA, Y. MEKAWY (1982): Serum progesterone and oestradiol concentration in the cyclic buffalo. *Trop. Anim. Prod.* 7, 283-289.
49. STEPHANY, R. W. (2010): Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handbook of Exp. Pharmacol.* 195, 355-367.
50. TOFFOLATTI, L., G. L. ROSA, T. PATARNELLO, C. ROMUALDI, R. MERLANTI, C. MONTESISSA, L. POPPI, M. CASTAGNARO, L. BARGELLONI (2006.): Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones. *Dom. Anim. Endocrin.* 30, 38.
51. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
52. VAN DER WAL, P., P. L. M. BERENDE (1983): Effects of anabolic agents on food-producing animals. In: *Anabolics in animal production* (ed.) Meissonnier E, Mitchell-Vigneron J, Office International des Epizooties, Pariz, pp. 73-115.
53. ZIMMERMAN, H. J. (1998): Hepatic disease. In: *Toxicology of the liver*. Eds. Plaa, G. L., Hewitt, W. R., Taylor and Francis, USA, pp. 45-67.

### 13. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25.12.1991. u Varaždinu, a većinu svog života proveo sam u Kotoribi, selu na samom istoku Međimurja uz granicu s Republikom Mađarskom. Moja adresa prebivališta i danas je R. Boškovića 44, 40329 Kotoriba. U Kotoribi sam završio dječji vrtić i Osnovnu školu Jože Horvata. Nakon toga na red je došla srednja škola, a izbor je pao na Gimnaziju Josipa Slavenskog Čakovec, jednu od najboljih gimnazija u Hrvatskoj. Tamo sam maturirao 2010. godine s prosjekom ocjena 4.4. Iste godine upisao sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu kao 4. na upisnoj listi. Izbor fakulteta je bio logičan budući da sam odrastao uz puno vrsta životinja i već u osnovnoj školi znao sam da želim studirati veterinu. Trenutačno sam apsolvant s položenim svim kolegijima, prosjekom ocjena 4.600 i osvojenih 358 ECTS bodova te završavam diplomski rad. Dobitnik sam 4 dekanove nagrade za izvanredan uspjeh kao najbolji student u generaciji. Zajedno s kolegom radio sam znanstveni rad na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju pod naslovom „Usporedba mišića prsnog pojasa kune bjelice (*Martes foina*, ERX.) i psa (*Canis familiaris*)“. Rad je predan na natječaj za Rektorovu nagradu u akademskoj godini 2012./2013. te je objavljen i u časopisu Veterinar, godište 52. broj 1, svibanj 2014. godine. Bio sam demonstrator na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta. Upisao sam usmjerenje farmske životinje i konji, ponajviše iz razloga jer je to područje najmanje obuhvaćeno radom i programom Fakulteta, a podjednako me zanima i usmjerenje kućni ljubimci. U budućnosti planiram upisati postdiplomski specijalistički studij i specijalizirati se te usavršiti u području kojim se budem bavio. Dobro govorim engleski jezik te poznajem osnove njemačkog jezika. Do sada sam dobivao stipendije za izvrsnost Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta, Sveučilišta u Zagrebu te jedne veterinarske farmaceutske kompanije. Član sam: Hrvatskog kinološkog saveza, te Kinološkog društva „Međimurje“ i Matičnog kluba uzgajivača mali međimurski pas „međi“; Malonogometnog kluba „Klub 75“ Kotoriba; Udruge studenata Međimurja, SRD „Som“ Kotoriba. Uz sve obaveze na Fakultetu i izvan njega, radim preko studentskog ugovora u Tiskari Zagreb na poslovima u proizvodnji novina od prve godine Fakulteta, a radio sam i mnoge druge studentske poslove. Stručnu praksu u sklopu nastave u zadnjem semestru Fakulteta obavio sam u firmi Bioinstitut d.o.o. Čakovec. Do sada sam, u sklopu dodatne edukacije, prisustvovao na dva veterinarska kongresa: Veterinarski seminar male prakse (2014.) i Veterinarska znanost i struka (2015.).