

# Izloženost potrošača egzogenim estrogenima putem hrane i mogući utjecaj na ljudski razvoj i zdravlje

---

**Kralj, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:178:764132>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-08-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Nikolina Kralj**

**Izloženost potrošača egzogenim estrogenima putem hrane i mogući  
utjecaj na ljudski razvoj i zdravlje**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2016.**

Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet  
Klinika za porodništvo i reprodukciju  
Predstojnik: izv. prof. sc. Juraj Grizelj

Mentori: prof. dr. sc. Marko Samardžija  
izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

## **ZAHVALA**

Posebno se zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Marku Samardžiji i izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin, na stručnom vodstvu i velikoj pomoći kod izrade i pisanja ovog rada.

Također, htjela bih se zahvaliti svojoj obitelji i dečku Krunoslavu na podršci tijekom cijelog školovanja te kolegi dr. med. vet. Goranu Domitranu na motivaciji i stručnoj pomoći.

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. PREDGOVOR .....  | 1  |
| 2. UVOD .....   | 2  |
| 3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE.....                                       | 3  |
| 3.1. Androgeni .....  | 3  |
| 3.2. Progestini .....   | 4  |
| 3.3. Estrogeni .....  | 5  |
| 3.3.1. Sinteza estrogena .....                                    | 6  |
| 3.3.2. Sekrecija estrogena .....                                  | 6  |
| 3.3.3. Mehanizam djelovanje estrogena .....                       | 7  |
| 3.3.4. Fiziološki učinci estrogena .....                          | 7  |
| 3.3.5. Fiziološke razine estrogena .....                          | 8  |
| 3.3.6. Terapeutska primjena estrogena .....                       | 10 |
| 3.3.6.1. Primjena estrogena kod urinarne inkontinencije .....     | 10 |
| 3.3.7. Fitoestrogeni .....  | 11 |
| 3.3.7.1. Fitoestrogen zearalenol .....                            | 12 |
| 3.3.8. Uporaba estrogena u anaboličke svrhe .....                 | 13 |
| 3.3.9. Sintetski estrogeni .....                                  | 14 |
| 3.3.9.1. Dietilstilbestrol (DES) .....                            | 14 |
| 3.3.10. Estradiol .....   | 16 |
| 3.3.10.1. Goveda .....  | 16 |
| 3.3.10.2. Konji .....   | 16 |
| 3.3.10.3. Svinje .....  | 17 |
| 3.3.10.4. Ovce .....  | 17 |
| 3.3.10.5. Perad .....   | 17 |
| 3.3.10.6. Ribe .....  | 17 |
| 3.3.11. 17 $\beta$ -Estradiol u goveđem mesu, mlijeku i krvi..... | 18 |
| 3.3.12. Analitičke metode .....                                   | 19 |
| 3.3.13. Ostale analitičke metode .....                            | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3.14. Zakonodavstvo.....   | 20 |
| 3.4. Izloženost potrošača egzogenim estrogenima putem hrane i mogući utjecaj na ljudski razvoj i zdravlje.....                                     | 20 |
| 3.4.1. Utjecaj estrogenih hormona prisutnih u mlijeku, mliječnim proizvodima i proteinima animalnog podrijetla u razvoju karcinoma kod ljudi. .... | 20 |
| 3.4.2. Izloženost egzogenom estrogenu konzumacijom mlijeka gravidnih krava...  | 21 |
| 4. ZAKLJUČCI.....  | 24 |
| 5. SAŽETAK.....  | 25 |
| 6. SUMMARY .....   | 26 |
| 7. POPIS LITERATURE .....  | 27 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....   | 30 |

# 1. PREDGOVOR

U davna vremena ljudi su uočili prednosti koje donosi pripitomljavanje životinja. Time je naime čovjeku postala dostupnija hrana, odjeća i druge potrepštine. Više nije bilo potrebe za lovom divljih životinja. Kako je čovjek nadvladao glad i opasne zarazne bolesti, rastao je i broj stanovništva na Zemlji. Porastom broja ljudi proporcionalno je rasla i potreba za hranom animalnog podrijetla. Ekstenzivan uzgoj životinja se zamjenjuje intenzivnim te se životinje s pašnjaka sele u objekte s kontroliranim uvjetima uzgoja.

Suvremeni čovjek uz pomoć znanja i vještina želi dobiti kvalitetan proizvod animalnoga podrijetla s naglaskom na ekonomsku isplativost. Zbog toga su se 50-tih godina 20-og stoljeća počele zloupotrebljavati razne tvari, prirodnog ili sintetskog podrijetla za koje se uočilo da polučuju anabolički učinak. Tvari koje polučuju anabolički učinak su: stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri, antitiroidne tvari, prirodni i sintetički steroidni spolni hormoni, laktoni rezorcilne kiseline i beta-agonisti. Njihov anabolički učinak rezultira povećanim zadržavanjem dušika, sintezom proteina i razgradnjom masti, a bez obzira na mehanizam djelovanja njihov krajnji rezultat je brži i veći rast uzgajanih životinja te bolja organoleptička svojstva mesa.

Na pitanja kumuliraju li se te tvari u tkivima kao rezidue toksičnih tvari u hrani animalnog podrijetla, kako djeluju na potrošače, imaju li toksične, teratogene i/ili kancerogene učinke u ljudskom organizmu te kakva je kontrola tih tvari u Republici Hrvatskoj, cilj je odgovoriti u daljnjem tekstu ovog rada.

## 2. UVOD

Hormoni su dio endokrinog sustava, koji se prirodno sintetiziraju u organizmu i nalaze se u biološkom materijalu životinja i ljudi. To su kemijski spojevi (tvari), odnosno glasničke biomolekule koje nastaju u žlijezdama i tkivima u organizmu, iz kojih se prenose krvlju do drugih tkiva i organa gdje prouzroče specifičnu reakciju. Hormoni su važni za održavanje homeostaze u organizmu, a to stanje se mora održavati kako bi se izbjegla metabolička neuravnoteženost i ostale bolesti koje bi proizašle iz toga.

Hormoni mogu biti endogenog (sintetizirani u organizmu) i egzogenog (unešeni u organizam) podrijetla te prirodni i sintetski.

Spolni hormoni su tvari koje se ponajprije izlučuju iz muških i ženskih spolnih žlijezda; testisa i jajnika, a mogu se izlučivati i iz drugih tkiva.

Spolni se hormoni jajnika tijekom spolnog ciklusa sintetiziraju u Graafovim folikulima i žutom tijelu, a za vrijeme gravidnosti i u posteljici. Njihove primarne funkcije su usmjerene na reproduksijski sustav; razvoj reproduksijskih tkiva i organa, gameta i na posljetku donošenje na svijet zdravog potomstva. Osim primarne funkcije uočeno je da spolni hormoni djeluju na prirast mišićnog tkiva te povećanje prinosa tovnih životinja. Navedeno svojstvo omogućilo je primjenu spolnih hormona i u druge svrhe osim reproduksijskih.



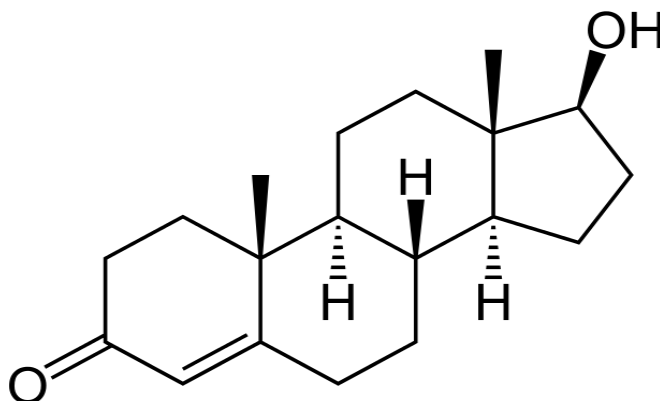
### 3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE

#### 3.1. Androgeni

Testosteron je najvažniji prirodni androgen, a izlučuje se u testisima i stimulira rast i razvoj muških spolnih karakteristika i spolnih žlijezdi. Povećava libido i sintezu proteina te utječe na ponašanje. Važan je za izgradnju i održavanje zdravlja koštanih struktura, pomaže pri proizvodnji eritrocita te izgradnji i održavanju mišićnog tkiva.

U perifernoj cirkulaciji nalazi se u relativno visokim koncentracijama (0,1-20 ng/mL). Koncentracije hormona veće od navedenih, upućivale bi na zloupotrebu ovih tvari u anaboličke svrhe (PLEADIN i sur., 2011.a). Kao i kod svih spolnih hormona, njegova koncentracija ovisi o dobi i spolu životinje. Testosteron ima i anabolički učinak. Nikada se ne primjenjuje kao samostalni anabolik kod farmskih životinja jer je vrlo teško postići i održati djelotvornu koncentraciju na dulji period (dulje od 100 dana). Najčešće se koristio u kombinaciji s 20 mg estradiolbenzoatom u obliku ušnog implantata, međutim, utvrđeno je da kao takav može prouzročiti kancerogenost i promjene na genima u teladi (MERCK, 2016.).

Utvrđeno je da testosteron ne izaziva štetne posljedice po ljudsko zdravlje ukoliko se primjenjuje isključivo u propisanoj terapijskoj dozi (PLEADIN i sur., 2011.a).



**Slika 1.:** Kemijska struktura testosterona

(<https://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Testosteron.svg>)

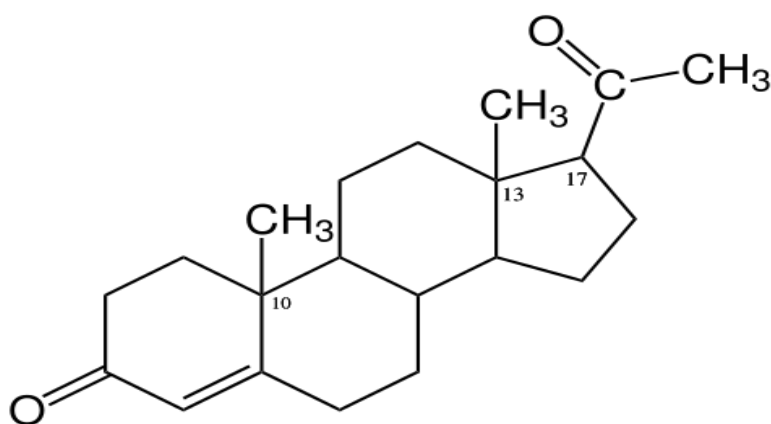
### 3.2. Progestini

Najvažniji među svim progestinima je progesteron. Njemački biokemičar K.H.Slotta, vodeći se istraživanjima ginekologa L. Fraenkela, izolirao je progesteron 1933. godine (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007., SAMARDŽIJA i sur., 2010.).

Progesteron je steroidni hormon. To je ženski spolni hormon, ali ga u manjim koncentracijama nalazimo i kod muškaraca (PLEADIN i sur., 2011.a). Sintetizira ga žuto tijelo, teka interna folikula, nadbubrežna žlijezda, a tijekom gravidnosti i placenta. Kolesterol acetat je osnovna tvar iz koje se sintetiziraju gestageni.

Uloga progesterona je antagonističko djelovanje estrogenim hormonima; te prouzroči zatvaranje cervikalnog kanala na kraju estrusa, potpomaže sekrecijsku fazu endometrija i smanjuje spontani motilitet miometrija.

Progesteron ima važnu ulogu prilikom ovulacije folikula, razvoja alveolarnog sustava mliječne žlijezde te pojave majčinskog instinkta (SAMARDŽIJA i sur., 2010.).



**Slika 2.:** Kemijska struktura progesterona

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Progesteron\\_\(vzorec\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Progesteron_(vzorec).svg))

### 3.3. Estrogeni

Estrogeni su skupina steroidnih hormona čiji učinci su otkriveni u prvoj polovici 20. stoljeća (između 1923.-1938. godine). Steroidni hormoni su kompleksne lipidne tvari, netopljive u vodi, koje se sintetiziraju iz kolesterola.

Estrogeni hormoni su: estradiol, estron, estriol i epistriol, od kojih se najčešće određuje koncentracija estradiola, estrona i estriola (GUYTON i HALL, 2006.). Glavni, najaktivniji i najzastupljeniji su estradiol (17 $\beta$ -estradiol) i estron koji se sintetiziraju u jajniku.

Estrogene hormone izlučuju jajnici (sintetiziraju se u stanicama granulose i teke interne te u intersticiju jajnika), ali se mogu izolirati i iz placente, testisa i adrenalnih žlijezda.

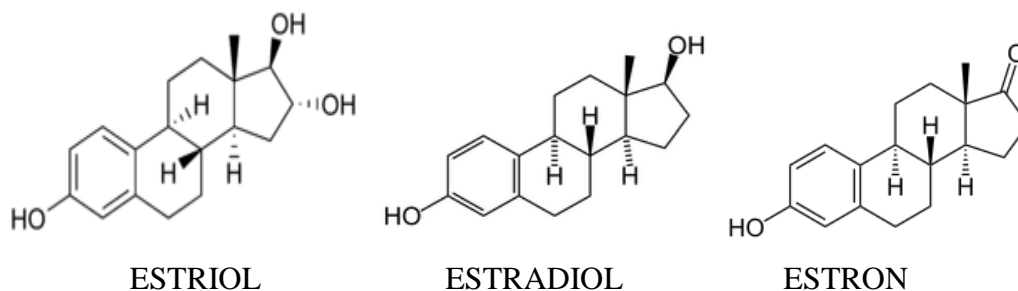
Svi nastaju iz kolesterola i acetata, a tijekom djelovanja se metaboliziraju jedni u druge (DROBNJAK i GRIZELJ, 1974.).

Estrogenska je aktivnost  $\beta$ -estradiola 12 puta veća od aktivnosti estrona, a 80 puta veća od aktivnosti estriola. Te relativno izražene aktivnosti upućuju na to da je ukupni estrogenski učinak 17 $\beta$ -estradiola obično mnogo puta veći od zajedničkog učinka ostalih dvaju estrogena, premda se ne mogu zanemariti ni estrogenski učinci estrona.

Estrogeni se izlučuju u manjim količinama u razdoblju prije spolne zrelosti, da bi se tijekom spolne zrelosti količina povećala oko 20 puta. Tada oni djeluju na proliferaciju stanica i rast tkiva u svim organima vezanim uz primarna spolna obilježja i rasplodivanje (spolni organi, mliječna žlijezda).

Uz to, sudjeluju u procesima vezanim uz formiranje sekundarnih spolnih osobina (razvoj kostura, dlake, metabolizma masti, odlaganje bjelančevina, sinteze i akumuliranja RNK i bjelančevina).

Estrogen, poput testosterona, direktno i indirektno utječe na pojačano zadržavanje dušika u organizmu te povećanu sintezu proteina, uz bolju iskoristivost hrane (VAN DER WAL i BERENDE, 1983., MAYER, 2001.).



**Slika 3.:** Kemijska struktura estriola, estradiola i estrona

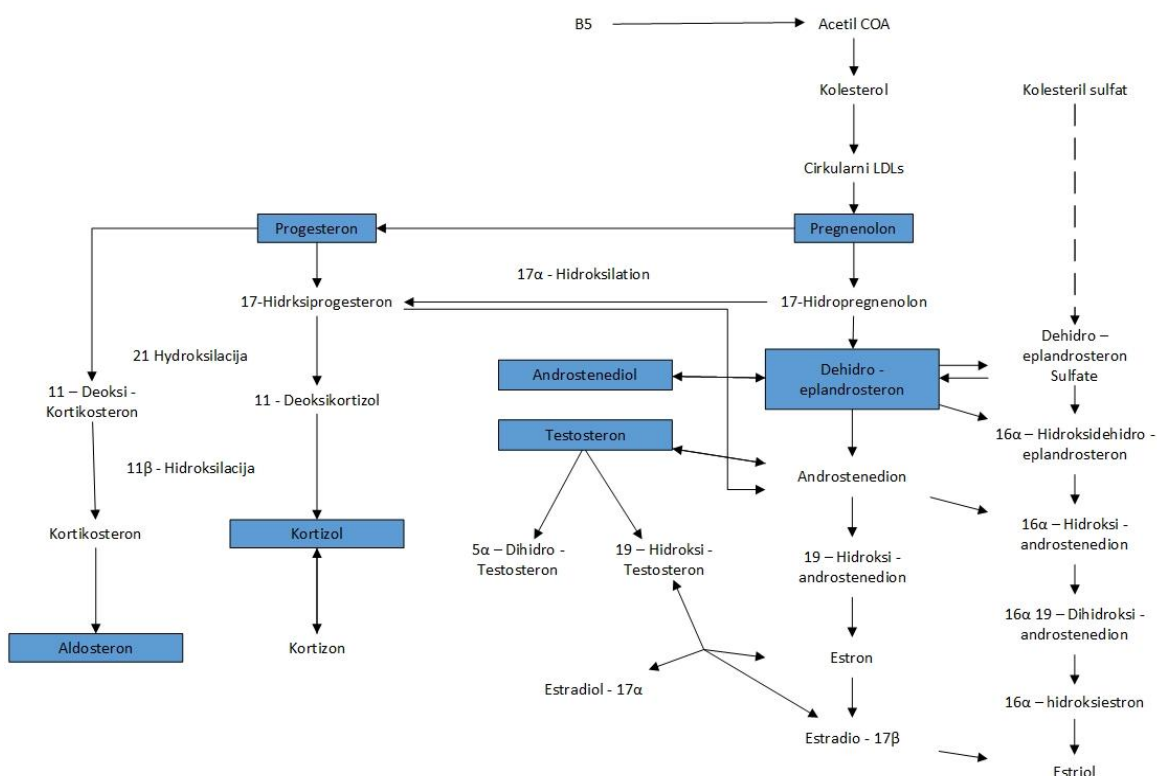
(<https://hr.wikipedia.org/wiki/Estrogeni>)

### 3.3.1. Sinteza estrogena

Estrogeni se sintetiziraju u jajnicima, uglavnom iz kolesterola koji potječe iz krvi, ali donekle iz acetil-koenzima A. Više molekula tog spoja može se vezati u prikladnu steroidnu jezgru.

U tijeku sinteze najprije se uglavnom sintetiziraju progesteron i muški spolni hormon testosteron. Zatim, tijekom folikularne faze ovarijskog ciklusa, granulozne stanice pretvore gotovo sav testosteron i veliku količinu progesterona u estrogene (GUYTON i HALL, 2006.).

Granuloza stanice na svojoj površini imaju FSH receptore koji pojačavaju aktivnost aromataze koja pretvara androsteron u estradiol. Folikularne stanice koje okružuju Graafov folikul izlučuju estrogene u folikularnu tekućinu, a potom u krvotok (KOZARIĆ, 1997.).



**Slika 4.:** Sinteza steroidnih hormona

(<https://perfectmed.wordpress.com/>)

### 3.3.2. Sekrecija estrogena

U plazmi, estradiol je u velikoj mjeri vezan za albumine i transportne proteine. Samo mali dio, od oko 2,21% ( $\pm 0,04\%$ ), je slobodan i biološki aktivan. Eliminacija estrogena podrazumijeva konverziju u manje aktivne estrogene, kao što su estron i estriol.

Jetra imaju glavnu ulogu u inaktivaciji steroida, i u njoj estrogeni podliježu reduktivnoj inaktivaciji i konjugaciji sa sulfatom ili glukuronskom kiselinom.

Pritom žuč predstavlja važan put ekskrecije estrogena kod svih domaćih životinja. Urin ga sadrži u manjim količinama.

Estron je glavni urinarni estrogen kod krmača i razina mu doseže maksimum približno u vrijeme pojave estrusa.

U krava je  $17\beta$  estradiol glavni urinarni estrogen, mada se izlučuju i znatne količine estrona.

### **3.3.3. Mehanizam djelovanje estrogena**

Estrogeni se prenose krvlju do ciljnih tkiva i organa, uglavnom vezani na albumine i globuline plazme. Ta veza hormona i bjelancevina plazme toliko je slaba da se oni brzo, otprilike kroz 30 minuta, otpuštaju u tkiva.

Estrogeni djeluju preko receptora. Postoje dvije vrste staničnih estrogenskih receptora Er-alfa i Er-beta.

Er-alfa receptori se nalaze u maternici, testisima, bubrezima, jetri i srcu.

Er-beta receptori nalaze se u jajnicima, prostati, plućima, gastro-intestinalnom i hematopoetskom sustavu te SŽS-u.

### **3.3.4. Fiziološki učinci estrogena**

Estrogen, poput testosterona, utječe na razvoj reproduktivnog sustava kroz stimulaciju sinteze proteina. Kod ženskih životinja dolazi do proliferacije i diferencijacije vaginalnog epitela, sekrecije alkalne cervikalne sluzi, proliferacije endometrija uterusa, hipertrofije i elongacije sekretornih žlijezda, porasta titra protutijela koja štite od infekcija, proliferacije epitelnih i žljezdanih stanica mliječnih kanala i rasta mliječne žlijezde. Estrogen stimulira sintezu progesteronskih i oksitocinskih receptora. U većini domaćih životinja estrogen, uz određene razine progesterona, izaziva manifestaciju estrusa promjenom ponašanja. Takve životinje postaju nemirnije, slabije jedu, a u krava pada produkcija mlijeka. Stidnica postaje edematozna, hiperemična, a cervikalna sluz postaje viskozna. Estrogen potiče osteoblaste kroz aktivaciju paratireoidnog hormona (PTH) i oslobađanje kalcitonina. Estrogen potiče sintezu eritrocita, ali pri dugotrajnoj primjeni može dovesti do aplastične anemije.

Potiče jetrenu biosintezu brojnih endogenih proteina kao što su: tiroid (TBG), steroidni globulini (CBG, SSBG), angiotenziogen, albumin, fibrinogen i protrombin.

Estrogen povećava sintezu jetrenog LDL receptora, snižava razinu kolesterola u plazmi (zajedno s T<sub>4</sub> hormonom i inzulinom). Estrogen, za razliku od progesterona, prouzroči perifernu vazodilataciju djelovanjem vazodilatatora dušikovog oksida (NO).

### **3.3.5. Fiziološke razine estrogena**

Fiziološke razine spolnih hormona u plazmi variraju ovisno o vrsti životinje, kategoriji, spolu i dobi (HEITZMAN, 1993.). Njihova koncentracija ovisna je i o spolnoj zrelosti životinje, prisutnosti hormona u hrani (fitoestrogeni) te općih uvjeta uzgoja.

Pojava estrusa, a time i koncentracija spolnih hormona može biti pod utjecajem biljaka iz krmiva, tj. njihovog estrogenog učinka pojedinih sastojaka poput izoflavona, laktona rezicilne kiseline itd. S obzirom na sve ove faktore, poprilično je teško točno odrediti fiziološke razine određenih spolnih hormona u pojedinim kategorijama životinja. Poznate koncentracije pojedinih hormona u tkivima farmских životinja prikazane su u tablici 1.

Steroidni hormoni dio su endokrinog sustava i u fiziološkim okvirima ih nalazimo u biološkom materijalu životinja. Njihov nalaz u krvi ne možemo uzeti kao dokaz za ilegalnu anaboličku uporabu. Fiziološka prisutnost i varijabilnost razina ovih hormona povezana je sa spolom, dobi i mnogim drugim faktorima te otežava dokazivanje korištenja tih tvari u anaboličke svrhe.

Za određivanje koncentracije hormona u biološkom materijalu, svi podatci o životinjama i anamneza se također trebaju uzeti u obzir pri procjeni koncentracija hormona kao fizioloških razina ili razina povezana koje se mogu dovesti u vezu sa zlouporabom tvari s anaboličkim djelovanjem kao promotora rasta.

**Tablica 1.** Koncentracije hormona u jestivim tkivima životinja uzgajanih na farmama  
(<http://www.fao.org/docrep/004/x6533e/x6533e01.htm>)

| ŽIVOTINJA          | TKIVO  | ESTRON<br>(pg/mL) | 17β-<br>ESTRADIOL | TESTOSTERON<br>(pg/mL) | PROGESTERON<br>(pg/g) |
|--------------------|--------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| TELE               | Mišić  |                   | <100              | 70                     |                       |
|                    | Jetra  |                   | <100              | 47                     |                       |
|                    | Bubreg |                   | <100              | 685                    |                       |
|                    | Mast   |                   | <100              | 340                    | 6                     |
| BIK                | Mišić  |                   |                   | 335                    |                       |
|                    | Jetra  |                   |                   | 749                    |                       |
|                    | Bubreg |                   |                   | 2783                   |                       |
|                    | Mast   |                   |                   | 10950                  |                       |
| JUNICA             | Mišić  |                   | 12-13             | 92                     |                       |
|                    | Jetra  | 20-40             | 38-71             | 193                    | 16                    |
|                    | Bubreg |                   | 40-71             | 595                    |                       |
|                    | Mast   |                   | 6                 | 250                    |                       |
| KRAVA,<br>GRAVIDNA | Mišić  |                   | 370-860           |                        | 336                   |
|                    | Mast   | 3870              | 2500-5500         |                        |                       |
| VOLOVI             | Mišić  | 6                 | 14                |                        |                       |
|                    | Jetra  | 20                | 14                |                        |                       |
|                    | Mast   | 23                | 14                |                        |                       |

### 3.3.6. Terapeutska primjena estrogena

Primjena 17 $\beta$ -estradiola u terapeutske svrhe istražuje se dugi niz godina, o čemu postoje brojni radovi. Utjecaj ovog hormona na fiziološke procese u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu, a ukoliko se primjenjuje na životinjama u propisanoj terapeutskoj dozi njegovi ostatci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (PLEADIN i sur., 2013.).

#### 3.3.6.1. Primjena estrogena kod urinarne inkontinencije

Urinarna inkontinencija je najčešće prouzročena slabošću urinarnog sfinktera. Najčešće se javlja u kastriranih ženki velikih pasmina (incidencija 11-20%), ali se može javiti i u nekastriranih ženki, mužjaka i mačaka. Koncentracije 17 $\beta$ -estradiola pada nakon ovarijohisterektomije u kuja, što rezultira opuštanjem uretralnog sfinktera kroz 3-6 mjeseci. Trenutačno, nema dopuštenog lijeka za liječenje inkontinencije životinja, a većina humanih pripravaka se povlači s tržišta zbog toksičnosti i kancerogenosti. Diethylstilbestrol (DES) je sintetski, nesteroidni estrogen koji je prvi puta sintetiziran 1938. godine. Vrlo je sličan prirodnom estrogenu i jeftin te je prvi izbor lijeka za liječenje urinarne inkontinencije u kuja. Oralno apliciran, vrhunac koncentracije u plazmi postiže kroz 1 sat, u pasa. Vrijeme poluživota mu je 24 sata zbog enterohepatičke recirkulacije.

Estrogeni senzibiliziraju uretralni sfinkter na stimulaciju alfa adrenergika, a DES sinergično s alfa adrenergicima. Terapija DES-om traje 7-10 dana, a zatim se reducira na jednom tjedno kako bi se izbjegao njegov toksični učinak. U životinja tretiranih DES-om javlja se supresija koštane moždine, klinički se očituje trombocitopenijom i potencijalno fatalnom aplastičnom anemijom, zatim se javljaju alopecije, cistične promjene na jajnicima, cistična hiperplazija endometrija, piometra, prolongirani estrusi i neplodnost. Hematopoetska toksičnost u mačaka je vrlo rijetka. U mužjaka se urinarna inkontinencija liječi testosteronom, ali generalno, njegov učinak je slabiji nego terapijski učinak estrogena u ženki.



**Tablica 2.:**Lijekovi koji se koriste kod urinarne inkontinencije (MERCK, 2016.)

| <b>LJJEK</b>          | <b>DOZA</b>                                    |
|-----------------------|--|
| Dietilstilbestrol     | Psi: 0,1-0,3 mg/kg/dan, p/o, 7-10 dana         |
| Fenilpropanolamin     | Psi: 1,5-2 mg/kg, p/o, 2-3 x dnevno            |
| Efedrin               | Psi: 1,2 mg/kg, p/o<br>Mačke: 2-4 mg/kg p/o    |
| Pseudoefedrin         | Psi>25 kg: 30 mg, p/o<br>Psi<25 kg: 15 mg, p/o |
| Testosteron propionat | Psi: 2,2 mg/kg, i/m, svaka 2-3 dana            |
| Testosteron cipionat  | Psi: 2,2 mh/kg, i/m, svakih 30-60 dana         |

Estrogeni se u humanoj medicini još koriste kao:

- hormonska nadomjesna terapija kod žena u menopauzi kako bi se spriječila osteoporoza
- hormonska kontracepcija, zajedno sprogesteronom negativnom povratnom spregom utječe na izlučivanje FSH i LH iz hipofize, čime dolazi do izostanka ovulacije
- u liječenju vaginitisa, vaginalne atrofije, hipoestrogenizma, amenoreje, dismenoreje i oligomenoreje
- mogu biti korišteni i za zaustavljanje laktacije nakon porođaja.

### 3.3.7. Fitoestrogeni

Gljivice iz roda *Fusarium* vrlo često kontaminiraju hranu za životinje. Žito (kukuruz, pšenica i ječam) koje se uzgaja u umjerenoj klimi s vlažnim vremenskim uvjetima obično su kontaminirani gljivicama roda *Fusarium*. Vrsta *F. graminearum* može proizvesti zearalenon, laktone rezocilne kiseline (RALs). Zearalenon (F2 toksin) je potencirani nesteroidni estrogen i jedini poznati mikotoksin s primarnim estrogenim učinkom.

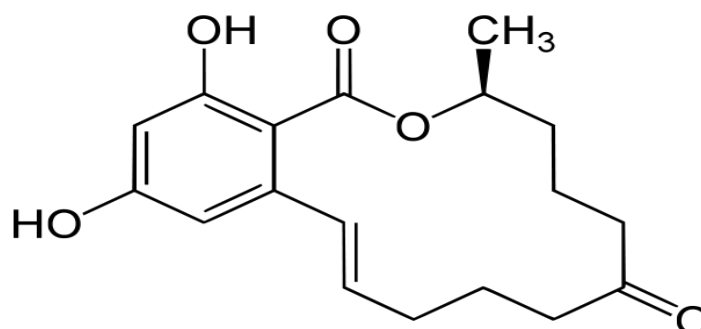
Zearalenon se veže na  $17\beta$ -estradiolske receptore. Sinteza specifičnih RNK dovodi do znakova estrogenizma. Zearalenon je slab estrogen, s djelovanjem 2-4 puta manjim od estradiola. Uz kontroliranu uporabu može se koristiti kod goveda kao anaboličko sredstvo. Klinički učinci zearalenona ne mogu se razlikovati od prekomjerne uporabe estrogena. Znaci se estrusa pojavljuju u mladih nazimica koje u hrani dobiju mikotoksin u količini od 1 mg/kg.

U svinja, zearalenon primarno djeluje na tek odbijenu prasid i prepubertetske nazimice, uzrokujući hiperemiju i povećanje vulve, hipertrofiju mliječnih žlijezda i uterusa. Uklanjanjem kontaminirane hrane klinički znaci nestaju kroz tjedan dana.

U odraslih krmača zearalenon prouzroči reproduksijske poremećaje inhibicijom sekrecije i oslobađanja FSH. Klinička slika ovisi o trajanju izloženosti i količini unesenog zearalenona u organizam. Najčešće se javlja atrofija jajnika i atrezija kod folikula, edem uterusa i cistična degeneracija uterušnih žlijezda. U mliječnoj žlijezdi dolazi do hiperplazije i epitelne proliferacije. Skvamoznu metaplaziju nalazimo na grljku maternice i vagini.

Količina od 3-10 mg po kg tjelesne mase zearalenona unesena u organizam 12.-14. dana ciklusa prouzroči perzistentno žuto tijelo i prolongirani anestrus (pseudogravidnost) od 40-60 dana.

U ranoj gravidnosti količina od 30 i više mg po kg tjelesne mase prouzroči poremetnje u gestaciji i ranu embrionalnu smrtnost. Metaboliti zearalenona mogu se izlučiti mlijekom i u sisajuće prasadi izazvati hiperestrogenizam. U junica količina od 10 i više mg/kg izaziva reproduktivne poremećaje dok odrasle krave pokazuju kliničke simptome pri koncentraciji višoj od 20 mg/kg. Mladi mužjaci, nerastovi i bikovi, mogu postati neplodni uz atrofiju testisa.



Slika 5.:Kemijska struktura zearalenona

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zearalenone.svg>)

#### 3.3.7.1. Fitoestrogen zearalenol

Literaturni podatci ukazuju na različiti afinitet vezivanja zearanola na estrogenske receptore (MEYER, 2001.). Zbog svog estrogenskog djelovanja zearanol se koristio u anaboličke svrhe, a utječe na povećanje tjelesne mase uzgojenih životinja i iskoristivost hrane. Zearanol djeluje na rast životinja direktno, vežući se na estrogenske receptore, ali i indirektno, povećanjem koncentracije hormona rasta i inzulinu sličnog faktora rasta I (IGF-I) u krvi životinja.

Istraživanja provedena na nazimicama tretiranim zeranolom pokazala su značajno smanjenje broja, veličine, težine i preživljavanja fetusa (TROUT i sur., 2002.).

Toksični učinci u ljudi uključuju razvojne poremećaje, imunotoksičnost, genotoksičnost te moguću kancerogenost.

Zeranol je estrogen koji ima slab afinitet prema maternici, odnosno prema receptorima estradiola na sluznici materinice. Koristi se u uzgoju životinja kao supkutani implantat uha u dozi od 36 mg za goveda i 12 mg za ovce, s trajanjem djelovanja od 90 do 120 dana. U volova, zeranol povećava zadržavanje dušika, stopu rasta za 12-15% te konverziju hrane za 6-10%. Telad, za razliku od mladih rastućih svinja i peradi, ima visoku konverziju hrane. Stoga je njihov odgovor na anabolička sredstva varijabilan.

Kod tromjesečne kastrirane muške teladi aplikacija zeranola rezultirala je povećanjem prirasta do 10% (MERCK, 2016.).

### **3.3.8. Uporaba estrogena u anaboličke svrhe**

Zbog ekonomske isplativosti pri proizvodnji mesa, od samog uzgoja stoke do klanja, prerade i daljnje distribucije, s ciljem povećanja proizvodnje i smanjenja gubitaka, koristile su se brojne prirodne i sintetske tvari. Anabolici u stočarskoj proizvodnji su organsko-kemijske tvari koje stimuliraju rast tkiva svojim utjecajem na metaboličke procese uključene u sintezu proteina, a ta stimulacija osobito je izražena u stanicama skeletnih mišića. Isto tako, anabolici smanjuju količinu masnog tkiva zbog stimulacije lipolitičkih procesa te poboljšavaju iskoristivost hrane.

U prošlosti, estradiol, testosteron, progesteron i sintetski steroidi su se koristili kao promotori rasta u obliku različitih implantata, tableta s estradiolom ili u kombinaciji estradiola i testosterona. Njihova uporaba u anaboličke svrhe je zabranjena zbog utjecaja na zdravlje životinja i ljudi (Council Directive 1996/22/EC; Council Direktive 2003/74/EC). Uporaba ovih tvari u svrhu liječenja se također smanjila (reproduktivni poremećaji i graviditet) zbog moguće kumulacije u jestivim tkivima farmaki životinja, prisutnosti njihovih rezidua u proizvodima animalnog podrijetla te njihovog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje.

**Tablica 3.:**Tvari s anaboličkim učinkom (HEITZMAN, 1993.):

| <b>Grupa tvari s anaboličkim učinkom</b>           | <b>Naziv tvari s anaboličkim učinkom</b>                             |
|--|--|
| Stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri | Dietilstilbestrol, dienestrol, heksestrol                            |
| Antitiroidne tvari                                 | Tapazol, 2-tiouracil   |
| Prirodni steroidni hormoni                         | 17 $\beta$ -estradiol, progesteron, testosteron                      |
| Sintetski steroidni hormoni                        | Trenbolon, 19-nortestosteron, metiltestosteron, stanozolol, boldenon |
| Laktoni rezorcilne kiseline                        | Zeranol, taleranol, zearalenol                                       |
| Beta-agonisti                                      | Klenbuterol, salbutamol, cimetarol, raktopamin                       |

### **3.3.9. Sintetski estrogeni**

Stilbeni i njihovi derivati (soli i esteri) pripadaju skupini sintetskih estrogenih tvari. Dietilstilbestrol (DES), heksestrol i dienestrol imaju anabolička svojstva, i kao takvi su se koristili u životinja u tovu, naročito goveda.

#### **3.3.9.1. Dietilstilbestrol (DES)**

Najznačajnija je bila uporaba DES-a, nesteroidnog estrogena koji je sintetiziran 1938. godine. Peroralno ili putem injekcije njime je tretirana stoka u svrhu povećanja tjelesne mase i smanjenja masnog tkiva. Brojna toksikološka istraživanja su pokazala da je DES jaki mutagen, teratogen i kancerogen (MARTIN i sur., 1978., ROBBOY i sur., 1982.) te je 1981. godine od strane Europske komisije uslijedila zabrana upotrebe stilbena, njihovih derivata, soli i estera te tireistatskih tvari za tov životinja (Direktiva Vijeća 81/602/EEC; ANONYMUS, 1981.).

Koristio se u i humanoj medicini gdje se davao trudnicama u cilju smanjenja komplikacija u trudnoći. Istraživanja su potvrdila da DES uzrokuje rijetki vaginalni tumor kod djevojaka i mladih žena koje su bile izložene ovom anaboliku in utero.

**Tablica 4.:** Sintetski steroidni hormoni korišteni kao promotori rasta (MERCK, 2016.)

| <b>HORMON</b> | <b>DOZA</b>  | <b>DJELOVANJE<br/>(u danima )</b> | <b>POVEĆANJE<br/>RASTA</b> | <b>POTENCIJALNO<br/>ŠTETNO<br/>DJELOVANJE</b>                    |
|---------------|--|-----------------------------------|----------------------------|--|
| TBA           | 200 mg (junice,<br>krave u<br>suhostaju)               | 60-90                             | 5%-12%                     |  |
| TBA+EB        | 200 mg TBA+28<br>mg EB<br>(junice, bikovi)             | 90-120                            | 10%-20%                    | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona                             |
|               | 100 mg TBA +<br>14 mg EB<br>(bikovi)                   | 90-120                            | 10%-20%                    | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona                             |
| TBA + E       | 200 mg TBA +<br>20 mg E (bikovi,<br>junice)            | 90-120                            |                            |  |
|               | 120 mg TBA +<br>24 mg E (bikovi)                       | 90-120                            |                            |  |
|               | 140 mg TBA +<br>14 mg E (junice)                       | 90-120                            |                            |  |
|               | 80 mg TBA + 16<br>mg E (junice)                        | 90-120                            |                            |  |
|               | 80 mg TBA + 8<br>mg E (junice)                         | 90-120                            |                            |  |
|               | 40 mg TBA+ 8<br>mg E<br>(bikovi i junice<br>na ispaši) | 90-120                            |                            |  |
| TBA + E       | 200 mg TBA +<br>40 mg E (bikovi)                       | 200                               |                            |  |
| Zeranol       | 36 mg zeranol  | 90-120                            | 10%-15%                    |  |
|               | 12 mg zeranol  | 90-120                            | 10%-15%                    |  |
| MGA           | 0,25-0,5 mg/dan,<br>p/o                                | tijekom primjene                  | 3%-10%                     | Povećan razvoj<br>mliječne žlijezde kod<br>dugotrajnije primjene |

TBA=trenbolon acetat; EB= estradiolbenzoat; E= estradiol 17β; MGA=melengestrol acetat

Svi su aplicirani u obliku potkožnog implantata, osim MGA koji se daje u hrani.

### 3.3.10. Estradiol

17 $\beta$ -estradiol predstavlja važan hormon s anaboličkim djelovanjem. On ima direktan i indirektan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika, povećanje sinteze proteina, povećanje iskoristivosti hrane, a time i povećani rasta životinja u stočarskoj proizvodnji za oko 5-15% (MAYER, 2001.). Djelovanje ovog hormona ostvaruje se neposrednom stimulacijom mišića preko estrogenskih receptora (MAYER i RAPP, 1985.). Oralna i parenteralna primjena 17 $\beta$ -estradiola, ovisno o dozi i trajanju izloženosti, može uzrokovati povećanu pojavnost tumora u pokusnih životinja u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, mliječna žlijezda), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre.

Granica kod koje se postavlja sumnja na anaboličku primjenu 17 $\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi iznosi 0,04 ng/mL u muške i ženske teladi (HEITZMAN, 1993.). Samo u plazmi gravidnih krava ili ilegalno tretiranih goveda koncentracija 17 $\beta$ -estradiola može se kretati od 0,1 do 1 ng/mL (HOFFMANN i EVERS, 1986.). Kako bi se mogla utvrditi povećana razina 17 $\beta$ -estradiola potrebno je znati fiziološku razinu tog hormona u životinja. Fiziološke razine u pojedinim životinjskih vrsta s obzirom na spol i dob istražuju brojne studije, ujedno i razine 17 $\beta$ -estradiola u liječenih životinja (PLEADIN i sur., 2011.b).

#### 3.3.10.1. Goveda

Goveda imaju visoku pretvorbu hrane u mišićno tkivo uspoređujući s mladim svinjama i peradi, a odgovori na anaboličke učinke su različiti. Porast u rasponu od 0-10% dobiven je nakon aplikacije zeranola trojesečnoj kastriranoj muškoj teladi. U intenzivnom tovu muškoj teladi može se dati estrogen u obliku implantata kroz mjesec do dva, što potiskuje razvoj testisa i može dovesti do naknadnog smanjenja agresije i povećanja rasta od 5-8%.

Odgovori na promotore rasta su zadovoljavajući jedino ako su životinje hranjene energetski bogatim krmivima (MERCK, 2016.).

#### 3.3.10.2. Konji

Uporaba anaboličkih sredstava u konja se ne preporučuje zbog nepovoljnih učinaka na reproduktivni sustav. Davanje steroidnih hormona androgena, analoga smanjuje veličinu testisa u pastuha. Smanjena koncentracija hormona, posebno LH, testosterona, i inhibina, može negativno utjecati na histologiju testisa i spermatogenezu i prolazno

smanjiti proizvodnju te kakvoću sperme. Jedan od spojeva koji se najčešće koristio je 19-nortestosteron za terapiju u oslabljenih i anemičnih konja. Međutim, uporaba tih spojeva je kontraindicirana i dugoročno liječenje ili velike doze mogu dovesti do ozbiljnih štetne učinke na funkciju reproduktivnog sustava.

#### 3.3.10.3. Svinje

Uporaba anabolika kod svinja je moguća, ali odgovori organizma su vrlo niski.

#### 3.3.10.4. Ovce

U ovaca, odgovori na anabolička sredstva usporedivi su s onima dobivenima u goveda. Najznačajniji utjecaj određen je u janjadi koja se hrani visokoenergetskim krmivima, 10-15% povećanje dnevnih prirasta se može očekivati. Anabolički steroidi ne bi trebali biti korišteni u janjadi koja je namijenjena uzgoju. Također, implantacija sa zeranolom smanjuje razvoj testisa janjadi i odgađa početak puberteta, a smanjuje postotak ovulacije u ovaca.

#### 3.3.10.5. Perad

U peradi, odgovori na estrogene uključuju povećano taloženje masti. Androgeni, su međutim rezultirali suprotnim učincima. Dakle, njihovo korištenje je bez praktičnog značenja u ovom trenutku.

#### 3.3.10.6. Ribe

U riba, metiltestosteron može potaknuti spolnu aktivnost u kalifornijske pastrve, promičući na taj način rast i poboljšanu konverziju hrane.

**Tablica 5.:** Prirodni steroidni hormoni korišteni kao promotori rasta (MERCK, 2016.)

| HORMON    | DOZA  | DJELOVANJE<br>(u danima) | POVEĆANJE<br>RASTA (%) | POTENCIJALNO<br>ŠTETNO<br>DJELOVANJE |
|-----------|---|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Estradiol | 20 mg EB +<br>200 mg P4<br>(bikovi)   | 100-120                  | 10-15                  | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona |
|           | 20 mg EB +<br>200 mg<br>testoster-1-<br>propionat<br>(junice, krave u<br>suhostaju) | 100-120                  | 5-15                   | Povećanje mliječne<br>žlijezde       |
|           | 10 mg EB +<br>100 mg P4<br>(telad)  | 100-120                  | 0-8                    |                                      |
|           | 45 MG estradiol<br>(bikovi)   | 365                      | 10-15                  | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona |
|           | 24 mg estradiol<br>(junice)   | 200                      | 10-15                  | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona |
|           | 28 mg estradiol<br>(bikovi)   | 365                      | 10-15                  | Prolazno povećanje<br>spolnog nagona |

EB= estradiol benzoat, P<sub>4</sub>=progesteron

### 3.3.11. 17β-Estradiol u govedem mesu, mlijeku i krvi

Istraživanjem provedenim uz primjenu ELISA metode određena je razina 17β-estradiola, kao tvari koja može biti zlorabljena u anaboličke svrhe, u mesu i mlijeku negravidnih krava iz više različitih uzgoja u republici Hrvatskoj (PLEADIN i sur., 2009.). Uzorci mesa, neprerađenog mlijeka i krvi negravidnih krava (n=50) pasmine Holstein Friesian i Simmental, starosti 3-11 godina, prikupljeni su u razdoblju od 2010.-2012. godine s više klaonica i farmi s područja sjeverozapadnog, središnjeg i istočnog dijela Hrvatske (PLEADIN i sur., 2009.).



**Tablica 6.:** Vrsta i broj analiza tvari s anaboličkim učinkom provedenih tijekom 2008. godine u različitim uzorcima biološkog materijala (PLEADIN i sur., 2009.).

| Skupina tvari                                      | Tvar                  | Vrsta uzoraka    | Broj analiza |
|--|-----------------------|------------------|--------------|
| Stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri | diethylstilbestrol    | Urin, mišić      | 170          |
| Steroidni hormoni                                  | 17 $\beta$ -estradiol | Krv              | 54           |
|  | Progesteron           | Krv              | 15           |
|  | Testosteron           | Krv              | 41           |
|  | Trenbolon             | Urin, jetra      | 104          |
|  | 19-nortestosteron     | Urin             | 59           |
|  | Metiltestosteron      | Urin             | 54           |
|  | stanozolol            | Urin             | 54           |
| Laktoni rezorciklične kiseline                     | Zeranol               | Urin, mišić      | 121          |
| Beta-agonisti                                      | Klenbuterol           | Urin, jetra, krv | 169          |
| UKUPNO   |                       |                  | 841          |

### 3.3.12. Analitičke metode

Da bi se spriječila zlouporaba anabolika neophodno je provođenje sustavnog monitoringa i kontrole ostataka u mesu i proizvodima od mesa u svim fazama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla. Analize anabolika pri tom se provode temeljem propisanih zakonskih odredbi i korištenjem suvremenih analitičkih metoda u njihovoj detekciji.

Analitičke metode koje se koriste u određivanju anabolika trebaju prethodno biti validirane kako bi se dokazalo da ispunjavaju potrebne zahtjeve u pogledu njihove primjene. Prethodna istraživanja su pokazala da se pri korištenju komercijalno dostupnih imunoenzimskih kitova za ELISA metodu postiže vrlo niski limit detekcije, odnosno vrlo visoka osjetljivost metode, brza i jednostavna analiza uzoraka, niska cijena analiza, ali ujedno i nedovoljna specifičnost zbog „cross-reaktivnosti“ spoja s njegovim metabolitima i stereiozomerima.

### 3.3.13. Ostale analitičke metode

U slučaju sumnje na pozitivni rezultat, isti se mora dokazati jednom od potvrdnih metoda s obzirom da one daju informacije o kemijskoj strukturi analita. Kao prikladne potvrdne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućuju selektivno određivanje ostataka anabolika, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili

plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spektrometrijom masa (MS) te tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom.

Analize tvari s anaboličkim učinkom provode se sukladno odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 2/2005) te se rezultati analiza u ovisnosti o ispitivanom parametru uspoređuje s najvećom dopuštenom količinom (NDK) ili najmanjom zahtjevnom granicom učinkovitosti izvedbe metode (MRPL), odnosno u slučaju prirodnih hormona s obzirom na fiziološku razinu (PLEADIN i sur., 2009.).

#### **3.3.14. Zakonodavstvo**

Zbog mogućeg štetnog djelovanja od 1989. godine u Europskoj uniji je zabranjeno korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak u cilju njihovog anaboličkog djelovanja u farmских životinja

U Republici Hrvatskoj uporaba anabolika također je zabranjena, a važeća je Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmским životinjama (NN 51/2013). .

Nadzor nad zlouporabom anabolika tijekom tova životinja i u klaonici regulirana je putem Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR) propisanog od strane Ministarstva poljoprivrede.

### **3.4. Izloženost potrošača egzogenim estrogenima putem hrane i mogući utjecaj na ljudski razvoj i zdravlje**

#### **3.4.1. Utjecaj estrogenih hormona prisutnih u mlijeku, mliječnim proizvodima i proteinima animalnog podrijetla u razvoju karcinoma kod ljudi.**

Karcinom je jedan od najčešćih uzroka smrti, i kod žena i kod muškarca. Karcinom dojke je najčešće dijagnosticiran karcinom kod žena, također je i najčešći uzrok smrti kod žena. Unatoč tome što je etiologija većine karcinoma nepoznata, rizični čimbenici uključuju način i stil prehrane. Povećane razine estrogena i njegovih metabolita, pretpostavlja se da su povezane s karcinomima reproduktivnog sustava. Potencijalan izvor estrogenih metabolita je mlijeko koje se konzumira diljem svijeta.

Koncentracija estrogena u mlijeku povezana je s količinom mliječne masti, i fazi gravidnosti krave. Utvrdilo se da je koncentracija estrogena u drugoj polovici graviditeta bila veća od onih u ranom graviditetu (ASIF, 2013.).

Ispitivanjem prehrambenih navika i drugih rizičnih faktora za razvoj karcinoma kod žena u menopauzi utvrđeno je da rizik pojavljivanja karcinoma jajnika povezan s konzumacijom mliječnih proizvoda.

### **3.4.2. Izloženost egzogenom estrogenu konzumacijom mlijeka gravidnih krava**

Tijekom 1960-tih i 70-tih godina diljem svijeta se proširila Zelena revolucija. Selekcijским radom i poboljšanjem genetike dobivene su kvalitetne mliječne krave, poput Holštajn frizijske pasmine, čija laktacija traje 305 dana godišnje skoro kroz cijeli period gravidnosti. Zbog toga kravlje mlijeko za široku potrošnju sadrži velike količine estrogena i progesterona. Dramatičan porast maligniteta ovisnih o estrogenu, poput karcinoma jajnika, tijela maternice, dojke, testisa i prostate, prepoznata je i istraživana pojavnost i smrtnost od karcinoma testisa i prostate u odnosu na prehrambene navike.

Među raznim prehrambenim namirnicama, kravlje mlijeko i sir su imali najveću korelaciju s pojavom i smrtnosti navedenih karcinoma. Također su istraživali povezanost između prehrambenih navika i pojave karcinoma dojke, jajnika i maternice. Konzumacije mlijeka, mesa i raznih sireva pokazala je usku povezanost s ovim karcinomima (MARUYAMA i sur., 2010.).

Izloženost ljudi, prvenstveno predpubertetske djece egzogenim estrogenima, posebno zabrinjava znansvenike.

Kod predpubertetske djece luči se mala količina estrogena te je serumska koncentracija  $17\beta$ -estradiola ispod granice detekcije ( $< 2$  pg/mL). Upravo zbog toga izlaganje i malim količinama estrogena može imati utjecaj na rast i sazrijevanje predpubertetske djece

S obzirom na utjecaj egzogenog estrogena na pretpubertetsku djecu, autori su naročito zabrinuti zbog široke potrošnje mlijeka dobivenog od gravidnih krava (MARUYAMA i sur., 2010.).

Svrha istraživanja MARUYAMA i sur. (2010.) bila je ispitati koncentracije spolnih hormona u serumu i urinu ljudi nakon konzumacije kravljeg mlijeka. Istraživanje je provedeno na zdravim mladim muškarcima starosti 19-21 godina (tablica 7.). Svi muškarci konzumirali su mlijeko kroz 10 minuta u količini od 600 mL/m<sup>2</sup> tijela.

**Tablica 7.:** Karakteristike ispitivanih muškaraca (MARUYAMA i sur., 2010.)

|   | Visina (cm) | Težina (kg) | Površina tijela (m <sup>2</sup> ) | Količina mlijeka (mL) |
|---|-------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1 | 177         | 73,0        | 1,90                              | 1140                  |
| 2 | 174         | 83,0        | 1,97                              | 1182                  |
| 3 | 161         | 66,0        | 1,69                              | 1014                  |
| 4 | 167         | 71,4        | 1,81                              | 1086                  |
| 5 | 162         | 59,0        | 1,62                              | 972                   |
| 6 | 175         | 60,0        | 1,73                              | 1038                  |
| 7 | 178         | 64,0        | 1,80                              | 1080                  |

Uzorci urina su sakupljeni jedan sat prije konzumacije mlijeka i 4 puta, svaki sat nakon konzumacije mlijeka.

Kod muškaraca uzorci krvi su se uzimali 15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta nakon konzumacije mlijeka.

Sedmero predpubertetske djece je uključeno u istraživanje (Tablica 8). Četvero od sedmero djece konzumiralo je mlijeko u količini od 600 mL/m<sup>2</sup>, dvoje djece moglo je popiti 61-73% od ukopnog volumena mlijeka, a jedna djevojčica nije mogla popiti niti pola volumena mlijeka.

**Tablica 8.:**Karakteristike ispitivane predpubertetske djece (MARUYAMA i sur., 2010.)

|   | Dob<br>Godine:mjeseci | Spol | Visina<br>(cm) | Težina<br>(kg) | Površina<br>tijela<br>(m <sup>2</sup> ) | Količina<br>mlijeka<br>temeljena<br>na<br>površini<br>tijela<br>(mL) | Ukupna<br>količina<br>konzumiranog<br>mlijeka mL<br>(%) |
|---|-----------------------|------|----------------|----------------|---|--|---|
| 1 | 8:8                   | M    | 127,0          | 26,0           | 0,96                                    | 580  | 580 (100)   |
| 2 | 7:3                   | M    | 119,8          | 19,5           | 0,82                                    | 490  | 490 (100)   |
| 3 | 8:8                   | M    | 125,0          | 24,0           | 0,92                                    | 550  | 340 (62)  |
| 4 | 7:6                   | F    | 122,0          | 22,0           | 0,92                                    | 550  | 550 (100)   |
| 5 | 8:8                   | F    | 122,2          | 21,8           | 0,87                                    | 520  | 520 (100)   |
| 6 | 9:9                   | F    | 129,6          | 32,6           | 1,07                                    | 640  | 470 (73)  |
| 7 | 7:7                   | F    | 117,6          | 9,6            | 0,81                                    | 490  | 180 (37)  |

Žene su uzimale 500 mL mlijeka svaku večer 21 dan (Tablica 9), od prvog dana menstrualnog ciklusa. U tri uzastopna menstrualna ciklusa, dan ovulacije je ispitivan pomoću brzog testa.

**Tablica 9.:**Karakteristike ispitivanih žena (MARUYAMA i sur., 2010.)

|   | Dob (godine) | IBM (indeks tjelesne mase) | Menstrualni ciklus (dani) |
|---|--------------|----------------------------|---------------------------|
| 1 | 19           | 17,7                       | 29-35                     |
| 2 | 19           | 21,8                       | 25-27                     |
| 3 | 31           | 21,7                       | 29-35                     |
| 4 | 32           | 20,3                       | 24-29                     |
| 5 | 36           | 23,4                       | 37-39                     |

Nakon konzumacije mlijeka koncentracija serumskog estrona (E1) i progesterona je značajno porasla. Serumski LH, FSH i testosteron značajno su smanjeni u muškaraca. Koncentracija E1, estradiola i estriola značajno je porasla u odraslih i djece. Četiri od pet žena ovuliralo je tijekom konzumacije mlijeka, u periodu sličnom menstrualnom ciklusu. Dati podatci nam ukazuju da su estrogeni iz mlijeka resorbirani kod djece i muškaraca te da su suprimirali lučenje gonadotropnih hormona i time smanjili izlučivanje testosterona. Spolno sazrijevanje predpubertetske djece može biti potaknuto konzumacijom uobičajenih količina kravljeg mlijeka (MARUYAMA i sur., 2010.)

## 4. ZAKLJUČCI

Uporaba estrogena u terapijskim ili anaboličkim dozama u životinja može imati za posljedicu njihovo prisustvo u hrani. Toksikološkim istraživanjima utvrđeno je da primjena anabolika u stočarskoj proizvodnji može prouzrokovati brojne toksične učinke na životinjama te posljedice po zdravlje potrošača, a s obzirom da se isti kumuliraju u tkivima životinja koja se nadalje koriste u ljudskoj prehrani.

Kronična izloženost egzogenim estrogenima povećava pojavnost karcinoma u ljudi i životinja u tkivima i organima bogatim estrogenskim receptorima, kao što su uterus i mliječna žlijezda. Nedavna istraživanja o pojavnosti puberteta pokazuju trend ranijeg spolnog sazrijevanja djevojčica, a nekolicina izvješća povezuje raniju pojavu menarhe s povećanjem indeksa tjelesne mase (IBM).

Masno tkivo je izvor estrogena te uzrok ranijeg spolnog sazrijevanja ne mora biti samo način prehrane već i estrogen kojeg luči masno tkivo. Izlaganje egzogenim estrogenima kroz konzumaciju kravljeg mlijeka proizvedenog od gravidnih krava započinje 1970-tih godina. Smatra se da je mlijeko gravidnih krava jedan od najvažnijih razloga ranijeg spolno sazrijevanja predpubertetske djece.

Uporaba estrogena treba biti odgovorna od strane stručne osobe i strogo nadgledana kontrolnim tijelima. Dopuštene koncentracije hormona propisane su zakonodavstvom. U Republici Hrvatskoj se nadzor zlouporabe anabolika provodi u okviru godišnjih programa monitoringa rezidua, a do sada nije evidentirana zlouporaba primjene spolnih hormona kao tvari s anaboličkim učinkom.

## 5. SAŽETAK

Spolni hormoni dio su endokrinog sustava ljudi i životinja i kao takvi nalaze se fiziološki u biološkim materijalima (krv, mlijeko, meso). Fiziološke razine estradiola variraju ovisno o vrsti životinje, pasmini, dobi, spolu, hranidbi te načinu držanja. S obzirom na navedene čimbenike teško je odrediti fiziološke razine spolnih hormona u različitim kategorijama farmских životinja. Nužno je poznavati fiziološke razine hormona da bi se lakše kontrolirala ilegalna uporaba hormona u anaboličke svrhe. Prepoznajući toksični i potencijalno kancerogeni učinak egzogenih hormona Europska unija je zabranila njihovo korištenje, a time su zabranjeni i u Republici Hrvatskoj. Kontrola uporabe anabolika u RH se provodi putem Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR) propisanog od strane Ministarstva poljoprivrede kao nadležnog tijela, a sustavnim analizama uzoraka biološkog materijala uzorkovanog iz različitih područja Hrvatske nije utvrđeno korištenje spolnih hormona, ujedno i estrogena, u anaboličke svrhe.

## **6. SUMMARY**

### **The exposure of consumers to exogenous estrogens by food and possible impact on human development and health**

Sex hormones are part of the endocrine system of animals and humans and as such there are physiologically in biological materials (blood, milk, meat). Physiological levels of estradiol vary widely depending on the species of animal, breed, age, sex, nutrition and housing. Due to these factors, it is difficult to determine the physiological levels of sex hormones in the different categories of farm animals. It is necessary to know the physiological levels of hormones in order to control the illegal use of hormones for anabolic purposes. Recognizing toxic and potentially carcinogenic effects of exogenous hormones European Union has banned their use and thus they are also prohibited in the Republic of Croatia. The control of the use of anabolic steroids in the Republic of Croatia is carried out by the National Residue Monitoring Program (DPMR) regulated by the Ministry of Agriculture. A systematic analysis of the samples of different biological materials samples from different parts of Croatia has not found use of estradiol for anabolic purposes.



## 7. POPIS LITERATURE

- 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.
- ASIF, M. (2013): Effect of estrogen hormones present in animal milk, dairy products and animal proteins in cancer. *J. Sci. Innov. Res.* 2, 1083-1085.
- EMEA (1999): COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. Progesterone. EMEA/MRL/146/96: 1-4.
- Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/229/EEC. *Official Journal of the European Union; Legis.* L125, 3.
- 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 stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. *Official Journal of the European Union; Legis.* L262/17.
- DROBNJAK, P., V. GRIZELJ (1974): *Medicinska enciklopedija. Jugoslavenski leksikografski zavod. Dopunski svezak.* Str. 386-387.
- 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.
- GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): *Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb,* 11. izdanje, str. 1016-1018.
- HEITZMAN, R.J. (1993): *Veterinary Drug Residues, 2. izdanje, Commission of the European Communities, Brussels,* str. 7/15-7/40.
- HOFFMAN, 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.
- KOZARIĆ, Z. (1997): *Veterinarska histologija, Naklada Karolina.* Str. 203.
- MARUYAMA, K., T. OSHIMA AND K. OHYAMA (2010): Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant cows. *Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, Department of Clinical*

Nursing and Pediatrics, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan. *Ped. Internat.* 52, 33–38.

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.

MERCK (2016): *Veterinary Manualy*, KENILWORTH, NJ, USA. Pp. 2570-2590.

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

MEYER, H. H. D. and M. RAPP (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 60, 294-300.

Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmskim životinjama. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 51/2013).

PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. *Meso* 11, 360-365.

PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ, N. VAHČIĆ (2013): 17 $\beta$ -estradiol u goveđem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44-49.

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.

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

Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 02/2005).

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.* 13, 190-198.

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.

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

VAN DER WAL, P., P. L. M. BERENDE (1983): Effect of anabolic agents on food-producing animals. U: Anabolics in animal production, Meissonnier, E. i Mitchell-Vigneron, J., Office International des Epizooties, Paris, str. 73-115.

TROUT, W. E., C. T. HERR, B. T. RICHERT, W. L. SINGLETON, S. A. HAGLOF, M. A. DIEKMAN (2007): Effects of zeranol upon luteal maintenance and fetal development in peripubertal gilts, Anim. Reprod. Sci. 99, 408-412.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 29. siječnja 1991. u Zagrebu, osnovnu školu sam završila u Mariji Bistrici. Srednju školu, opću gimnaziju, završila sam u Zlataru 2009. Iste godine upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija aktivno sam sudjelovala u radu našeg obiteljskog gospodarstva. Na 6. godini studija obavljala sam praksu u Veterinarskoj stanici Zlatar Bistrica u trajanju od 3 mjeseca, a ljetno sam povela volontirajući u veterinarskim ambulanzama Donja Stubica i Zlatar.