

## Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla

Jelka Pleadin<sup>1\*</sup>, Nina Peršić<sup>1</sup>, B. Antolović<sup>2</sup>, B. Šimić<sup>2</sup>, Ivana Kmetić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska 143, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

pregledni rad

### Sažetak

Zbog ekonomske isplativosti pri proizvodnji mesa u stočarskoj industriji zlouporabljale su se različite tvari s anaboličkim učinkom, i to stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri, antitireoidne tvari, prirodni i sintetski steroidni spolni hormoni, laktoni rezorcilne kiseline i beta-agonisti. Način djelovanja tvari s anaboličkim učinkom u organizmu razlikuje se po navedenim grupama tvari, a rezultira povećanim zadržavanjem dušika, sintezom proteina i razgradnjom masti. Iako su mehanizmi djelovanja različiti i mogu biti direktni ili indirektni, uporaba anabolika rezultira istim konačnim učinkom odnosno većim rastom uzgojnih životinja i boljim organoleptičkim svojstvima mesa. Toksikološkim istraživanjima utvrđeno je da primjena anabolika na životinjama ima za posljedicu brojne toksične učinke po zdravlje potrošača, s obzirom da se isti kumuliraju u tkivima životinja koja se nadalje koriste u ljudskoj ishrani. Više slučajeva zlouporabe anabolika u svijetu dovelo je do značajnih štetnih posljedica po zdravlje potrošača. Stoga je uporaba tvari s anaboličkim učinkom u stočarskoj proizvodnji zabranjena i potreban je nadzor temeljem propisanih zakonskih akata i sustavnog monitoringa te primjenom specifičnih i selektivnih analitičkih metoda u određivanju vrlo niskih koncentracija ostataka takvih tvari u različitim matriksima.

*Ključne riječi:* anabolici, toksikološki aspekt, hrana životinjskog podrijetla

### Uporaba tvari s anaboličkim učinkom

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 supstancije. Značajnu skupinu tvari pri tom su činile tvari sa anaboličkim učinkom, koje se mogu koristiti kao pospješivači rasta životinja odnosno kao sredstva za poboljšanje organoleptičkih svojstava mesa. Nakon što je otkriveno njihovo toksično djelovanje na zdravlje ljudi i životinja, uporaba anabolika je zabranjena u većini zemalja svijeta, te se provodi sustavna kontrola uporabe u svim fazama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla. Veliki broj istraživanja u prošlosti i sadašnjosti odnosi se na ispitivanja farmakokinetike odnosno apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja tvari s anaboličkim učinkom.

Anabolici su organsko-kemijske supstancije koje stimuliraju rast tkiva svojim utjecajem na metaboličke procese uključene u sintezi proteina, a ta stimulacija osobito je izražena u stanicama skeletnih mišića (Lone, 1997). Kod životinja učinak ostvaruju direktnim i indirektnim mehanizmom djelovanja, rezultirajući pri tom pojačanim zadržavanjem dušika i sintezom proteina odnosno povećanim rastom (Van der Wal i Berende, 1983; Meyer i Karg, 1989).

Efikasnost unaprijeđenja rasta životinja ovisi o vrsti odnosno pasmini životinje, dobi, reproduktivnom statusu i načinu davanja hormona, a smatra se da se njihovim implantiranjem može unaprijediti rast životinja i više od 20 % (Meyer, 2001).

Sredinom prošlog stoljeća, kada je utvrđeno anaboličko djelovanje te su se tvari počele koristiti u uzgoju životinja i proizvodnji mesa. 1954. godine Food and Drug Administration (FDA) je odobrila korištenje dietilstilbestrola (DES) u tovu stoke. Istraživanja govore da je 1956. godine dvije trećine goveda u SAD-u bilo tretirano DES-om (Swan i sur., 2007). Osim DES-a, od stilbena značajnu uporabu u svijetu su imali heksesterol i dienestrol (Payne i sur., 1999). Kasnija istraživanja su pokazala da DES ima snažno mutageno, teratogeno i kancerogeno djelovanje (Martin i sur., 1978; Robboy i sur., 1982) te da korištenje ovog anabolika može uzrokovati ozbiljna zdravstvena oštećenja kod ljudi (Kimball i sur., 1981). Nakon zabrane uporabe stilbena, njihovih derivata, soli i estera i tireotropnih supstancija (Council Directive 81/602/EEC), pri tovu životinja za proizvodnju mesa, počeli su se koristiti prirodni i sintetski spolni hormoni. Steroidni hormoni kao sredstva s estrogenim, gestagenim i androgenim učinkom su danas u EU dopušteni samo u terapijske svrhe u veterinarskoj praksi, i to kod poremećaja oplodnje ili tijekom graviditeta. Brojna istraživanja su

\*Corresponding author: Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska 143, 10000 Zagreb, Croatia; pleadin@veinst.hr

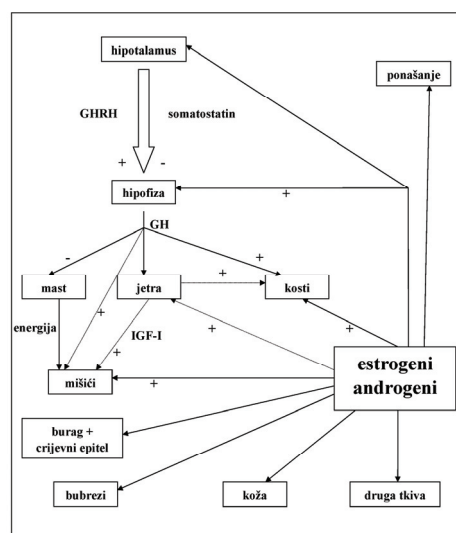
pokazala da steroidni hormoni primjenjeni kao anabolici imaju toksično djelovanje te da mogu ozbiljno ugroziti zdravlje životinja i ljudi. Stoga je njihova uporaba u anaboličke svrhe zabranjena 1988. godine (Council Directive 88/146/EC). Na listu zabranjenih anaboličkih sredstava zatim su stavljeni i  $\beta$ -adrenergički agonisti, koji su se ilegalno počeli koristiti za povećanje rasta u proizvodnji mesa 1987. godine (Van Ginkel i sur., 1993). Uporaba  $\beta$ -agonista imala je za posljedicu alimentarne intoksikacije kod ljudi nakon konzumiranja kontaminiranog mesa (Martinez-Navarro, 1990). Primjena im je dopuštena kod goveda u 5-10 puta manjim dozama od anaboličke (terapijska doza) zbog svojih bronholitičkih i tokolitičkih svojstava, te se kao takvi koriste u terapijske svrhe u humanoj i veterinarskoj medicini. Općenito, od 1988. godine u Europskoj uniji zabranjeno je korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak u cilju njihovog anaboličkog djelovanja kod domaćih životinja (Heitzman, 1993). U Republici Hrvatskoj uporaba anabolika je isto tako zabranjena, a nakon niza zakonskih akata danas su na snazi Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine 21/2011) te Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmских životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista (Narodne novine 82/2010). U ovom radu dan je pregled tvari s anaboličkim djelovanjem koje se mogu zlorabiti u stočarskoj proizvodnji, njihova svojstva, zabilježeni toksični učinci u svijetu te analitičke metode za detekciju ostataka u biološkom materijalu životinjskog podrijetla.

### Podjela, djelovanje i ostaci anabolika u biološkom materijalu životinja

U Tablici 1. dan je prikaz skupina tvari s anaboličkim učinkom te najznačajnijih spojeva po grupama. Iako se mehanizmi djelovanja tvari s anaboličkim učinkom razlikuju između pojedinih grupa, njihova uporaba rezultira istim konačnim učinkom odnosno povećanim rastom uzgojnih životinja. Prirodni i sintetski hormoni, kao i njihovi derivati, djeluju direktno aktivirajući određene gene u stanicama skeletnih mišića, ali i indirektno mijenjajući koncentraciju endogenih hormona s anaboličkim djelovanjem kao što su somatotropin i inzulin (Trenkle, 1989; Meyer, 2001) (Slika 1).

**Tablica 1.** Tvari s anaboličkim učinkom (Heitzman, 1993)  
**Table 1.** Substances with anabolic effect (Heitzman, 1993)

Grupa tvari s anaboličkim učinkom	Naziv tvari s anaboličkim učinkom
Stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i esteri	dietilstilbestrol dienestrol heksestrol
Antitireoidne tvari	tapazol 2-tiouracil
Prirodni steroidni spolni hormoni	17 $\beta$ -estradiol progesteron testosteron
Sintetski steroidni spolni hormoni	trenbolon 19-nortestosteron metiltestosteron stanozolol boldenon
Laktoni rezorcilne kiseline	zeranol taleranol zearalenol
Beta-agonisti	klenbuterol salbutamol cimaterol raktopamin

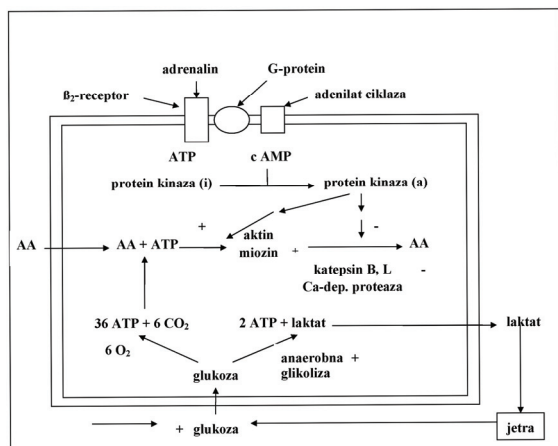


**Slika 1.** Anaboličko djelovanje spolnih hormona u životinja (Meyer, 2001)

**Fig. 1.** Anabolic effects of sex hormones in animals (Meyer, 2001)

Estrogeni u organizmu djeluju na brojna tkiva, uključujući burag i epitel crijeva (Meyer i sur., 1995; Sauerwein i sur., 1995).  $\beta$ -agonisti anaboličko djelovanje ostvaruju vezanjem na specifične receptore na membranama stanica skeletnih mišića i adipocita životinja. Vezujući se na receptore, povećavaju količinu c-AMP u stanicama i dovode do promjena metaboličkih funkcija u organizmu, uzrokujući pri tom povećanje sinteze i smanjenje

razgradnje proteina te smanjenje lipogeneze i povećanje lipolize (Slika 2). Novija istraživanja govore da  $\beta$ -agonisti mogu također stimulirati rast mišića direktno (Meyer, 2001). Pri tom uzrokuju i promjene u koncentraciji pojedinih hormona u krvi te utječu na serumsku enzimsku aktivnost (Gojmerac i sur., 2002).



Slika 2. Prikaz staničnog djelovanja  $\beta$ -agonista (Meyer, 2001)

Fig. 2. View of  $\beta$ -agonists cellular effects (Meyer, 2001)

S obzirom na način njihova djelovanja te rezultate toksikoloških istraživanja određene su najmanje zahtijevane granice učinkovitosti analitičkih metoda (MRPL, eng. *minimum required performance limit*) za njihovu detekciju u biološkom materijalu, ukoliko je riječ o potpuno zabranjenim supstancijama, odnosno maksimalne dozvoljene količine (MDK) ostataka za tvari čija je primjena dozvoljena isključivo u terapijske svrhe. U interpretaciji ispitivanja koncentracije prirodnih hormona  $17\beta$ -estradiola, testosterona i progesterona u krvi uzimaju se u obzir njihove fiziološke razine karakteristične za pojedinu životinjsku vrstu, spol i starost životinje.

### Svojstva i toksični učinci tvari s anaboličkim učinkom

#### Stilbeni i derivati

Stilbeni i njihovi derivati (soli i esteri) pripadaju skupini sintetskih estrogenih tvari. Dietilstilbestrol (DES), heksestrol i dienestrol su se upotrebljavali u proizvodnji mesa, pogotovo govedine. Najveći značaj ima DES, nesteroidni estrogen, sintetiziran 1938. godine, s obzirom da je od četrdesetih do sedamdesetih godina prošlog stoljeća izloženost ljudi ovom anaboliku bila velika. Zbog utjecaja na

povećanje tjelesne mase i smanjenje masnog tkiva, peroralno ili putem injekcija njime je tretirana stoka. Koristio se i u medicini gdje se davao trudnicama u cilju smanjenja rizika od 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*. Zbog ustanovljene izrazite toksičnosti kao mutagena, teratogena i karcinogena (Robboy i sur., 1982), 1981. godine njegova uporaba je zabranjena (Council Directive 81/602/EC). Međutim, navodi u literaturi ukazuju i na kasniju zlouporabu DES kao anabolika u proizvodnji mesa (Lone, 1997).

#### Prirodni steroidni hormoni

$17\beta$ -estradiol predstavlja najvažniji hormon u razvoju sekundarnih spolnih karakteristika žene. Izlučuju ga jajnici i žuto tijelo, ali i testisi u manjoj količini. Povećane količine ovog hormona uzrokuju feminizaciju kod 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, povećanje sinteze proteina, povećanje iskoristivosti 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 životinje, dobi, spolu i primijenjenoj dozi, a ostvaruje se neposrednom stimulacijom mišića preko estrogenih receptora (Meyer i Rapp, 1985). Obično se davao u kombinaciji s drugim spojevima androgenog i gestagenog djelovanja. Oralna i parenteralna primjena  $17\beta$ -estradiola, u ovisnosti o dozi i trajanju izloženosti, može uzrokovati povećanu pojavnost tumora kod pokusnih životinja u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, dojka), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre (Zimmerman, 1998). Najveći broj istraživanja toksičnosti prirodnih steroidnih hormona upravo govori o  $17\beta$ -estradiolu i povezano je s njegovim hormonskim djelovanjem. Ukoliko se primjenjuje na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi ostaci u mesu su niski i nisu opasni za potrošača. Granica pri kojoj se poduzimaju mjere sa sumnjom na anaboličku primjenu  $17\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi je 0,04 ng/mL kod muške i ženske teladi (Heitzman, 1993). Samo u plazmi gravidnih krava ili plazmi ilegalno tretiranih životinja koncentracija  $17\beta$ -estradiola može se kretati od 0,1 do 1 ng/mL (Hoffmann i Evers, 1986). Testosteron je najvažniji prirodni androgen, a izlučuje se u testisima i stimulira razvoj muških spolnih karakteristika i muških spolnih žlijezda,

povećava libido i sintezu proteina te utječe na ponašanje (Griffin i Wilson, 1998). Testosteron se najčešće primjenjuje u kombinaciji sa 17 $\beta$ -estradiolom. Koristio se u stočarskoj proizvodnji u obliku ušnih implantanata da bi se povećao rast životinja i iskoristivost hrane. Istraživanja su otkrila da pojava tumora i drugih promjena kod životinja koje su bile tretirane ovim hormonom ima isključivu vezu s njegovim hormonskim djelovanjem. U kombinaciji s 17 $\beta$ -estradiolom može uzrokovati kancerogenost i promjene na genima kod teladi (Toffolatti i sur., 2006). Utvrđeno je da testosteron ne izaziva štetne posljedice na ljudsko zdravlje ukoliko se ispravno primjenjuje odnosno koristi isključivo u propisanoj terapijskoj dozi. Razina testosterona karakteristična je ovisno o dobi životinje i kreće se kod muške i ženske junadi do 0,1 ng/mL, a kod bikova do 20 ng/mL (Hoffmann i Evers, 1986). Koncentracije hormona više od navedenih, upućivale bi na zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe.

Progesteron je ženski spolni hormon koji se izlučuje u jajnicima. U manjim koncentracijama ga ima i kod muškaraca. Njegova primjena u veterinarskoj medicini je slična kao i primjena testosterona. Nakon peroralne primjene je uglavnom nedjelotvoran, jer ima slabu bioiskoristivost pa se stoga koristi u stočarskoj proizvodnji u obliku ušnih implantanata. Toksični učinci kao što su tumori jajnika, dojke, vagine i uterusa ispoljavaju se uslijed dugotrajne primjene ovog hormona. Progesteron inducira prelazak endometrija u fazu lučenja, povećava viskoznost cervikalne sluznice, povećava bazalnu temperaturu tijela i djeluje na razvoj žlijezda u grudima (Carr, 1998). Njegovo ispravno korištenje u svrhu liječenja ne izaziva štetne posljedice u ljudi (FAO/WHO, 2000). Prema literaturnim podacima koncentracije progesterona u plazmi goveda kreću se u rasponu od 0,2 do 8 ng/mL, a tijekom gravidnosti u rasponu od 8 do 12 ng/mL. Kod ženske teladi dozvoljena razina progesterona je 0,4 ng/mL, a kod muške teladi 0,1 ng/mL (Hoffmann i Evers, 1986).

#### *Sintetski steroidni hormoni*

Najveći broj istraživanja sintetskih steroida kao anabolika odnosi se na trenbolon i 19-nortestosteron. Trenbolon je steroid koji ima androgeno i anaboličko djelovanje. Djeluje indirektno na rast mišića promjenom koncentracije i metabolizma pojedinih hormona. Povećava razinu hormona rasta u krvi, a smanjuje razinu kortizola i tireoidnog hormona (Lone, 1997). Koristi se sam ili zajedno sa 17 $\beta$ -estradiolom u obliku potkožnog implantanta. Obično se primjenjuje u obliku esterskih derivata kao što je trenbolon acetat za kojeg je utvrđeno štetno

djelovanje na reproduktivni sustav krava (Peters, 1987).

19-Nortestosteron je steroid s anaboličkim i androgenim djelovanjem jačim od testosterona. Kod ljudi uzrokuje rast mišića, stimulira apetit, povećava produkciju eritrocita i povećava gustoću kostiju. Djelotvoran je u liječenju anemije, osteoporoze i nekih neoplazija kao što je rak dojke. Ipak, primjena ovog steroida može imati toksične učinke na jetru te uzrokovati ginekomastiju, smanjeni libido, kardiovaskularne probleme kao i smanjenje lučenja luteinizirajućeg hormona (Noé i sur., 1999). Najvažniji metabolit 19-nortestosterona kod stoke je epi-19-nortestosteron. Prisustvo epi-19-nortestosterona u urinu ili žuči muških bikova, konja, jaraca ukazuje na ilegalnu upotrebu jer nije prirodno prisutan u mužjaka (McEvoy i sur., 1999). Uz njega su u manjoj količini prisutni i 19-norepiandrosteron i 5 $\alpha$ -estran-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol. Svi metaboliti se nalaze većinom u konjugiranom obliku u urinu, žuči, bubrezima i jetri (Sauer i sur., 1998).

#### *Laktoni rezorcilne kiseline*

Laktoni rezorcilne kiseline su taleranol, zearalenol i najpoznatiji zeranol. Zeranol proizvode plijesni iz roda *Fusarium*, a derivat je mikotoksina zearalenona. Može se pronaći u ljetini koja je kontaminirana plijesnima. Učinci zeranola u ljudi i životinja nisu u potpunosti ispitani, a istraživanja govore o njegovoj nižoj aktivnosti prilikom oralne primjene u odnosu na ostale estrogene (Lamming i sur., 1987). Literaturni podaci ukazuju na različiti afinitet vezivanja zeranola za estrogene receptore (Meyer, 2001). Zbog svog estrogenog djelovanja zeranol se koristio u anaboličke svrhe, a utječe na povećanje tjelesne mase uzgojnih životinja i iskoristivost hrane (Kennedy i sur., 1998). Zeranol djeluje na rast životinja direktno, vezujući se za estrogene receptore, ali i indirektno, povećanjem koncentracije hormona rasta i inzulinu sličnog faktora rasta I (IGF-I) u krvi životinja (Thomas i sur., 2000). Toksikološka istraživanja pokazuju da zeranol može izazvati promjene u koncentracijama različitih hormona u krvi. Također, utječe i na smanjenje testisa, a što se povezuje sa inhibicijom sinteze gonadotropina uočenom kod tretiranih srndaća (Wilson i sur., 2002). Istraživanja provedena na svinjama nazimicama tretiranim zeranolom pokazala su značajno smanjenje broja, veličine, težine i preživljavanja fetusa (Trout i sur., 2002). Toksični učinci kod ljudi uključuju razvojne poremećaje, imunotoksičnost, genotoksičnost te moguću karcinogenost. Međutim, podaci o dokazanom riziku oboljevanja ljudi od raka, povezanim sa konzumacijom mesa kontaminiranog

ostacima zeranola, još uvijek nisu dostupni (European Commission, 1999).

### *β-agonisti*

β-agonisti su skupina spojeva koji su po svojoj strukturi derivati kateholamina, odnosno hormona adrenalina i noradrenalina. Od svih β-agonista najznačajniji su β<sub>2</sub>-adrenergični agonisti koji imaju visoki afinitet vezanja na β<sub>2</sub>-adrenergične receptore (Badino i sur., 2005), a koji se nalaze u svim tkivima koja se vežu uz rast, uključujući skeletne mišiće i masno tkivo (Re i sur., 1997; McNeel i Mersmann, 1999). Vezujući se za receptore kod ljudi uzrokuju opuštanje mišića, širenje bronhijalnih puteva, vazodilataciju u mišićima i jetri, relaksaciju mišića maternice i otpuštanje inzulina te su jako važni u liječenju astme, posebno salbutamol. Kod nekih pacijenata uzimanje ovih inhalanata uzrokuje nuspojave kao što su nesanica, depresija i drhtavica. Uporabom β-agonista u ishrani životinja povećava se proteinski udio mesa, a smanjuje udio masti i za oko 40% (Courtheyn i sur., 2002). Neki od najčešće korištenih su klenbuterol, salbutamol, cimaterol, mabuterol, terbutalin, tulobuterol, mapenterol, klenpenterol, klenheksestrol i cimbuterol. Ostaci β<sub>2</sub>-adrenergičnih agonista u jestivim dijelovima tretiranih životinja, štetni su za zdravlje ljudi i pri akutnim intoksikacijama izazivaju tahikardiju, glavobolju, mučninu, a kronično djelovanje uzrok je promjena u fiziološkim vrijednostima određenih hormona, enzima i drugih biokemijskih parametara (Kenny, 1992).

Klenbuterol je vjerojatno bio najviše korišteni β-agonist kod životinja tijekom tova. Efektivan je u terapijske svrhe za liječenje alergijskih respiratornih bolesti u životinja. Klenbuterol kao bronhodilatator se koristi kod konja sa preporučenom terapijskom dozom od 0,8 μg/kg tjelesne težine dva puta dnevno na razdoblje od oko 10 dana. Može se davati oralnim, intramuskularnim ili intravenoznim putem (EMEA, 2000). Vezujući se za receptore prisutne na membranama stanica glatkih mišića maternice, klenbuterol djeluje na način da ih relaksira, te se koristi u goveda i konja i kao tokolitik. *In vivo* istraživanja pokazuju da tretman klenbuterolom rezultira povećanjem lipolize i smanjenjem lipogeneze (Mersmann, 1998; MacRae i sur., 1988). U više europskih zemalja zabilježeni su slučajevi akutnih alimentarnih intoksikacija u ljudi koji su konzumirali meso odnosno jetru kontaminiranu ostacima klenbuterola (Martinez-Navarro, 1990; Paige i sur., 1997). Obzirom na nedvojbenu toksičnost klenbuterola utvrđena je njegova maksimalno dozvoljena količina (MDK) u tkivu jetre

od 0,5 ng/g (Smith, 2000). Iako zabranjen, klenbuterol se nastavio zlouporabljati što dokazuju i objavljeni podaci iz Kine (Woodward, 2005). Također, u rujnu 2006. u Shanghaiju se 330 ljudi otrovalo svinjetinom koja je sadržavala ostatke ovog anabolika. U kineskoj provinciji Guangdong 2009. g. zabilježeno je otrovanje u 70 osoba uslijed konzumiranja svinjskog mesa kontaminiranog ostacima klenbuterola. Žrtve su se žalile na želučane bolove i proljev nakon konzumacije svinjskih proizvoda iz lokalne mesnice (MoniQA, 2009).

### *Hormon rasta*

Svinjski (pST) i govedu (bST) hormon rasta su bjelančevine od 191 ili 190 aminokiselina koje proizvodi adenohipofiza. Djelovanje hormona rasta (somatotropina) očituje se kroz brojne metaboličke učinke u organizmima, pri čemu su glavna ciljna tkiva jetra, skelet, masno tkivo i mišić. Djelotvornost učinaka somatotropina na farmским životinjama ovisi o brojnim čimbenicima i to spolu, dobi, pasmini i okolišnim uvjetima. Rezultati istraživanja pokazuju da uporaba pST na svinjama, kao i bST kod teladi, može rezultirati značajnom stimulacijom rasta (Kirchgessner i sur., 1987; Van der Wal i sur., 1989). Tretman životinja dovodi do smanjene sinteze masnih kiselina, zbog smanjene aktivnosti enzimskih sustava uključenih u ciklus pentoza fosfata i sinteze masnih kiselina (Elherton, 1989). Rezultat toga su povišene razine glukoze i inzulina u krvi. Mišićima i skeletu dostupno je više glukoze, a uz to rast ovih tkiva izravno potiče somatotropin te IGF-I koji potječe iz jetre nakon stimulacije somatotropinom. Daljnji podaci govore da je sinteza aminokiselina u mišićima povećana, dok je razgradnja aminokiselina u jetri smanjena. Dokazivanjem mRNA receptora somatotropina u skeletnim mišićima, potvrđeno je da somatotropin može izravno poticati mišićni rast (Baumbach i sur., 1989), ali i da jetreni IGF-I može biti vrlo važan za taj rast. Isto tako, literaturni podaci govore da somatotropin potiče rast kostiju izravno, ali i posredno putem IGF-I (Guler i sur., 1989). Nadalje, somatotropin poboljšava učinkovitost ishrane i zadržavanja dušika, što ima za posljedicu veći udio mišićnog tkiva i manji sadržaj masnog tkiva. Metabolični učinci su veći kod ženki i kod kastriranih mužjaka, u usporedbi s nekastriranim mužjacima, koji imaju brži rast, manje nakupljanje masti i veću endogenu proizvodnju anaboličnih spolnih hormona. Osim što stimulira rast, bST stimulira i izlučivanje mlijeka u krava (Machlin, 1973; Peel i sur., 1980). S obzirom da je primjena svih tvari s hormonskim učinkom na farmским životinjama za proizvodnju mesa zabranjena,

zabranjena je i primjena hormona rasta. Međutim, rasplodivost relevantnih podataka toksikoloških istraživanja te podataka o kumulaciji ostataka u životinja i ljudi vrlo je ograničena, a programi monitoringa u Republici Hrvatskoj do sada nisu uključivali nadzor zlouporabe hormona rasta na farmским životinjama.

### Primjena analitičkih metoda u određivanju anabolika

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. To su *screening* metode i potvrdne metode uz kvalitativnu i kvantitativnu primjenu. Bez obzira koja se analitička metoda koristi, ista prethodno treba biti ispitana kroz određivanje validacijskih parametara te mora davati točne i precizne podatke i biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih koncentracija ostataka anabolika u biološkom materijalu životinja odnosno imati niske limite detekcije (Pleadin i Perši, 2009).

Od *screening* metoda u određivanju ostataka anabolika uz radioimunoenzimsku metodu (RIA-*radioimmunoassay*) najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*). Postoje tri oblika ELISA metode, i to osnovno ili primarno vezivanje, sendvič metoda i kompetitivno ili inhibicijsko vezivanje (Berzofsky i sur., 2008). ELISA metoda znatno ubrzava moguću broj analiza uzoraka, jednostavna je priprema uzoraka, a i ekološki je prihvatljivija jer smanjuje uporabu organskih otapala i snižava cijenu korištenja. Prethodna istraživanja pokazuju da se pri korištenju komercijalno dostupnih kitova za imunoenzimsku metodu u kvantitativnim analizama postižu vrlo niski limiti detekcije odnosno visoka osjetljivost metode, brza i jednostavna analiza uzoraka, niska cijena analize, ali ujedno i nedovoljna specifičnost, pošto dolazi i do *cross*-reakcija s konjugiranim metabolitima kao i stereoizomerima (Van Vyncht i sur., 1996; Posyniak i sur., 2003). Nedostatak ove metode je da daje informaciju o prisustvu analita, ali ne i o njegovim biokemijskim svojstvima, kao što je npr. molekularna težina, kao i moguća *cross* reaktivnost supstancija (Deshpande, 1996). Istraživanja su pokazala da kvaliteta kitova također može varirati od proizvođača do proizvođača, a također i da postoje razlike i u različitim serijama kitova istog proizvođača (Shelver i Smith, 2000).

S obzirom da *screening* metode mogu rezultirati sa lažno-pozitivnim rezultatima, potrebno je na uzorcima na kojima je *screening* metodom dobiven pozitivan rezultat provesti potvrdnu metodu koja omogućava selektivno određivanje anabolika. Kao prikladne potvrdne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju 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. LC/MS tehnika ima najznačajniju primjenu u analizama različitih anabolika (Willoughby i sur., 2002) i ima prednost u odnosu na plinsku kromatografiju jer ne zahtijeva derivatizacijski korak prije analize (Lau i sur., 2004).

### Zaključak

Uporaba anabolika u proizvodnji mesa rezultira povećanim rastom uzgojnih životinja i boljim organoleptičkim svojstvima mesa. Toksikološkim istraživanjima utvrđeno je da primjena anabolika u stočarskoj industriji uzrokuje brojne toksične učinke na životinjama te posljedice po zdravlje potrošača, s obzirom da se isti kumuliraju u tkivima životinja koja se nadalje koriste u ljudskoj ishrani. Uporabu tvari s anaboličkim učinkom treba stoga nadzirati u svim fazama proizvodnje namirnica životinjskog podrijetla, a temeljem propisanih zakonskih akata, sustavnog monitoringa i primjenom sofisticiranih analitičkih metoda kojima se mogu odrediti i vrlo niske koncentracije ostataka tvari s anaboličkim učinkom u različitim matriksima. U Republici Hrvatskoj se nadzor zlouporabe anabolika provodi u okviru godišnjih programa monitoringa rezidua, a do sada nije evidentirana zlouporaba tvari s anaboličkim učinkom.

### Literatura

- Badino, P., Odore, R., Re, G. (2005): Are so many adrenergic receptor subtypes really present in domestic animal tissues? A pharmacological perspective, *Vet. J.* 170, 163-174.
- Baumbach, W.R., Horner, D.L., Logan, J.S. (1989): Structure and regulation of the rat growth hormone receptor. U: *Biotechnology in growth regulation*, Heap, R.B., Prosser, G.G. i Lamming, G.E. (ured.), Butterworth, London, str. 221.
- Berzofsky, J.A., Berkower, I.J., Epstein, S.L. (2008): Antigen-antibody interactions and monoclonal antibodies. U: *Fundamental Immunology*, 6. izdanje, Paul, W.E. (ured.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, str. 153-191.

- Carr, B.R. (1998): Disorders of the ovaries and female reproductive tract. U: Williams' Textbook of Endocrinology, 9. izdanje, Wilson, J.D. Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen, P.R. (ured.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, str. 751-817.
- Commission of the European Communities (1981): Council Directive 81/602/EEC on the prohibition of substances having a hormonal and thyreostatic action, *Off J. Eur. Commun. Legis.* L 222.
- Commission of the European Communities (1988): Council Directive 88/146/EEC on the prohibition of the use of certain substances having a hormonal action in animal rearing, *Off J. Eur. Commun. Legis.* L 70.
- Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., De Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van De Wiele, M., Vercammen, J., De Wasch, K. (2002): Recent developments in the use and abuse of growth promoters, *Anal. Chim. Acta.* 473, 71-82.
- Deshpande, S.S. (1996): Enzyme immunoassays. From concept to product development. Chapman & Hall, New York.
- EMA (2000): Clenbuterol - summary report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London.
- Etherton, T.D. (1989): Mechanism by which porcine growth hormone (pGH) and insulin-like growth factors (IGFs) regulate pig growth performance: approaches from the pGH and IGF receptors to whole animal. U: Biotechnology for control of growth and product quality in swine, implications and acceptability, Van der Wal, P., Nieuwhof, G.J. i politiek, R.D. (ured.), Pudoc, Wageningen, str. 111-125.
- European Commission (1999): Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health: Assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products.
- 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.
- Gojmerac, T., Pleadin, J., Žurić, M., Lojkić, M., Čurić, S. (2002): Effects of repeated growth-promoting doses of clenbuterol on the hepatic function of female pigs, *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 269-271.
- Griffin, J.E., Wilson, J.D. (1998): Disorders of the testes and the male reproductive tract. U: Williams Textbook of Endocrinology, 9. izdanje, Wilson, J.D. i sur. (ured.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, str. 819-876.
- Guler, H.P. Zapf, J., Binz, K., Froesch, E.R. (1989): Growth promotion using recombinant insulin-like growth factor-I. U: Biotechnology in growth regulation, Heap, R.B., Prosser, G.G. i Lamming, G.E. (ured.), Butterworth, London, str. 119.
- Heitzman, R.J. (1993): Veterinary Drug Residues, 2. izdanje, Commission of the European Communities, Brussels, str. 7/15-7/40.
- Hoffmann, B., Evers, P. (1986): Anabolic agents with sex-hormone-like activities: problems of residues. U: Drug Residues in Animals. Rico, A.G. (ured.), Academic Press, New York, str. 111-146.
- Kennedy, D.G., Hewitt, S.A., McEvoy, J.D., Currie, J.W., Cannavan, A., Blanchflower, W.J., Elliot, C.T. (1998): Zeranol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle in vivo, *Food Addit. Contam.* 15, 393-400.
- Kenny, F. (1992): A review of illegal use of beta-adrenergic agonists in animal production. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> World Congress of Foodborne Infections and Intoxications Institute of Veterinary Medicine, Berlin, str. 727-731.
- Kimball, A.M., Hamadeh, R., Mahmood, R.A.H., Khalfan, S., Muhsin, A., Ghabrial, F., Armenian, H.K. (1981): Gynecomastia among children in Bahrain, *Lancet* 1 (8221), 671-672.
- Kirchgessner, M., Roth, F.X., Schams, D., Karg, H. (1987): Influence of exogenous growth hormone (GH) on performance and plasma GH concentrations of female veal calves, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 58, 50-59.
- Lamming, G.E., Ballarini, G., Baulieu, G., Brooks, P., Elias, P.S., Ferrando, R. (1987): Scientific report on anabolic agents in animal production, *Vet. Rec.* 121, 389-392.
- Lau, J.H.W., Khoo, C.S., Murby, J.E. (2004): Determination of clenbuterol, salbutamol, and cimaterol in bovine retina by electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 87, 31-38.
- 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.
- Machlin, L.J. (1973): Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows, *J. Dairy Sci.* 56, 575-580.
- MacRae, J.C., Skene, P.A., Connell, A., Buchan, V., Loble, G.E. (1988): The action of  $\beta$ -agonist clenbuterol on protein and energy metabolism in fattening wether lambs, *Br. J. Nutr.* 59, 457-465.
- Martin, C.N., McDermid, A.C., Garner, R.C. (1978): Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells, *Cancer Res.* 38, 2621-2627.
- Martinez-Navarro, J.F. (1990): Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver, *Lancet* 336 (8726), 1311.
- McEvoy, J.D.G., McCaughey, W.J., Cooper, J., Kennedy, D.G., McCartan, D.I. (1999): Nortestosterone is not a naturally occurring compound in male cattle, *Vet. Quart.* 21, 8-15.



- McNeel, R.L., Mersmann, H.J. (1999): Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues, *J. Anim. Sci.* 77, 611-621.
- Mersmann, H.J. (1998): Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action, *J. Anim. Sci.* 76, 160-172.
- Meyer, H.H.D., Rapp, M. (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle, *J. Anim. Sci.* 60, 294-300.
- Meyer, H.H.D., Karg H. (1989): Growth stimulators for farm animals: mode of action, effects on meat quality and potential risks originating from residues. U: Proceedings of FAO/CAAS Workshop on Biotechnology in Animal Production and Health in Asia and Latin America, Beijing, str. 49-58.
- Meyer, H.H.D., Stoffel, B., Hagen-Mann, K. (1995):  $\beta$ -Agonists, anabolic steroids and their receptors: New aspects in growth regulation. U: Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction, von Engelhardt, W., Leonhard-Marek, S., Breves, G., Giesecke, R. (ured.) Proceeding of the Eight International Symposium on Ruminant Physiology. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, str. 475-482.
- Meyer, H.H.D. (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production, *APMIS* 109, 1-8.
- MoniQA (2009): Clenbuterol, MoniQA – Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain, European Commission, <[http://www.moniqa.org/webfm\\_send/568](http://www.moniqa.org/webfm_send/568). Pristupljeno 31. kolovoza 2010.
- Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmских životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista (Narodne novine 82/2010)
- Noé, G., Suvisaari, J., Martin, C., Moo-Young, A.J., Sundaram, K., Saleh, S.I., Quintero, E., Croxatto, H.B., Lähteenmäki, P. (1999): Gonadotrophin and testosterone suppression by 7 $\alpha$ -methyl-19-nortestosterone acetate administered by subdermal implant to healthy men, *Hum. Reprod.* 14, 2200-2206.
- Paige, J.C., Tollefson, L., Miller, M. (1997): Public health impact on drug residues in animal tissues, *Vet. Hum. Toxicol.* 39, 162-169.
- Payne, M.A., Baynes, R.E., Sundlof, S.F., Craigmill, A., Webb, A.I., Riviere, J.E. (1999): Drugs prohibited from extralabel use in food animals, *Javma* 215, 28-32.
- Peel, C.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C., Gniffen, C.J. (1980): Bovine growth hormone increases milk production in high-producing dairy cows, *J. Dairy Sci.* 63, 81, Suppl. 1, P49G.
- Peters, A.R. (1987): Effect of trenbolone acetate on ovarian function in culled dairy cows, *Vet. Rec.* 120, 413-416.
- Pleadin, J., Perši, N. (2009): Klenbuterol kao tvar s anaboličkim učinkom - uporaba, zlouporaba i nadzor, *Vet. stanica* 40, 199-207.
- Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J. (2003): Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 483, 61-67.
- Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine 21/2011)
- Re, G., Badino, P., Novelli, A., Girardi, G. (1997): Effects of clenbuterol as a repartitioning agent on  $\beta$ -adrenoreceptor concentrations in heart, bronchi and brain of veal calves, *Vet. J.* 153, 63-70.
- Robboy, S.J., Taguchi, O., Cunha, G.R. (1982): Normal development of the human female reproductive tract and alterations resulting from experimental exposure to diethylstilbestrol, *Hum. Pathol.* 13, 190-198.
- Sauer, M.J., Howels, L.G., Bellworthy, S.J., Anderson, S., Coldham, N.G., Samuels, T.P.W., Seymour, M.A., Nedderman, A., Houghton, E. (1998): Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers, *Analyst* 123, 2653-2660.
- Sauerwein, H., Pfaffl, M., Hagen-Mann, K., Malucelli, A., Meyer, H.H. (1995): Expression of estrogen and androgen receptor in the bovine gastrointestinal tract, *Dtsch. Tierarztl Wochenschr* 102, 164-168.
- Shelver, W.L., Smith, D.J. (2000): Evaluation of commercial immunoassays for cross-reactivity to clenbuterol stereoisomers and bovine metabolites, *Food Addit. Contam.* 17, 837-845.
- Smith, D.J. (2000): Total radioactive residues and clenbuterol residues in swine after dietary administration of [<sup>14</sup>C]clenbuterol for seven days and preslaughter withdrawal periods of zero, three, or seven days, *J. Anim. Sci.* 78, 2903-2912.
- Swan, S.H., Liu, F., Overstreet, J.W., Brazil, C., Skakkebaek, N.E. (2007): Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy, *Hum. Reprod.* 22, 1497-1502.
- Thomas, M.G., Carroll, J.A., Raymond, S.R., Matteri, R.L., Keisler, D.H. (2000): Transcriptional regulation of pituitary synthesis and secretion of growth hormone in growing wethers and the influence of zeranol on these mechanisms, *Domest. Anim. Endocrin.* 18, 309-324.
- Toffolatti, L., Rosa Gastaldo, L., Patarnello, T., Romualdi, C., Merlanti, R., Montesissa, C., Poppi, L., Castagnaro, M., Bargelloni, L. (2006): Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones, *Domest. Anim. Endocrin.* 30, 38-55.
- Trenkle, A. (1989): Mechanisms of action for the use of anabolics in animals. U: Animal growth regulation, Campion, D.R., Hausman, G.J., Martin, R.J. (ured.), Plenum Press, New York, str. 65-71.
- Trout, W.E., Herr, C.T., Richert, B.T., Singleton, W.L., Haglof, S.A., Diekman, M.A. (2007): Effects of zeranol upon luteal maintenance and fetal development in peripubertal gilts, *Anim. Reprod. Sci.* 99, 408-412.



- Van Der Wal, P., Berende, P.L.M. (1983): Effects of anabolic agents on food-producing animals. U: Anabolics in animal production, Meissonnier, E. i Mitchell-Vignerone, J. (ured.), Office International des Epizooties, Pariz, str. 73-115.
- Van Der Wal, P., Nieuwhof, G.J., Politiek, R.D. (1989): Biotechnology for control of growth and product quality in swine, implications and acceptability. Pudoc, Wageningen.
- Van Ginkel, L.A., Stephany, R.W., Van Rossum, H.J., Bos, M. (1993): Residue analysis for  $\beta$ -agonists: Results of an EC cooperative study and future perspectives. U: Proceedings of the EuroResidue II conference, Haagsma, N., Ruiten, A., Czedik-Eysenberg, P.B. (ured.), Veldhoven, The Netherlands, str. 308-312.
- Van Vyncht, G., Preece, S., Gaspar, P., Maghuin-Rogister, G., DePauw, E. (1996): Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of  $\beta$ -agonists in biological matrices, *J. Chromatogr. A* 750, 43-49.
- Zimmerman, H.J. (1998): Drug induced hepatic disease. U: Toxicology of the liver, 2. izdanje, Plaa, G.L. i Hewitt, W.R. (ured.), Taylor & Francis, Washington, DC, str. 3-60.
- Willoughby, R., Sheehan, E., Mitrovich, S. (2002): A global view of LC/MS, how to solve your most challenging analytical problems, 2. izdanje, Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Wilson, T.W., Neuendorff, D.A., Lewis, A.W., Randel, R.D. (2002): Effect of zeranol or melengestrol acetat (MGA) on testicular and antler development and aggression in farmed fallow bucks, *J. Anim. Sci.* 80, 1433-1441.
- Woodward, K.N. (2005): Veterinary pharmacovigilance. Part 2. Veterinary pharmacovigilance in practice – the operation of a spontaneous reporting scheme in a European Union country – the UK, and schemes in other countries, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 28, 149-170.

---

Received: February 10, 2011

Accepted: May 28, 2011

## Toxicological aspects of anabolics in food of animal origin

Jelka Pleadin<sup>1</sup>, Nina Peršić<sup>1</sup>, B. Antolović<sup>2</sup>, B. Šimić<sup>2</sup>, Ivana Kmetić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Croatian Veterinary Institute, Laboratory for Analytical Chemistry, Savska 143, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>Faculty of Food Technology and Biotechnology, Laboratory for Toxicology, University of Zagreb, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

review

### Summary

Because of the profitability of the meat production in the livestock industry there were many cases of abuse of different substances with anabolic effect - stilbenes, stilbene derivatives, their salts and esters, antithyroid agents, natural and synthetic hormones sterodini, lactones of resorcylic acid and beta-agonists. Mode of action of substances with anabolic effect in the body differs in these groups of substances, and results in increased nitrogen retention, protein synthesis and breakdown of fat. Although the mechanisms of action are different and can be direct or indirect, use of anabolic steroids results in the same final effect, i.e. higher growth in animal breeding and better organoleptic properties of meat. Toxicological studies showed that the use of anabolic steroids on animals has resulted in numerous toxic effects on human health, considering it to be accumulated in animal tissue, which is further used in human nutrition. More cases of abuse of anabolic steroids in the world has led to significant adverse consequences for the health of consumers. Therefore, the use of substances with anabolic effect of livestock production is prohibited and must be monitored under the prescribed legislation and systematic monitoring and application of specific and selective analytical methods to determine very low concentrations of residues of such substances in various matrices.

**Keywords:** anabolics, toxicological aspects, food of animal origin