

## 17 $\beta$ -estradiol u goveđem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji

Jelka Pleadin<sup>1</sup>, J. N. Periš, A. Vulić<sup>2</sup>, N. Vahčić<sup>2</sup>

znanstveni rad

### Sažetak

17 $\beta$ -Estradiol je spolni hormon endokrinog sustava prisutan u biološkom materijalu farmakoloških životinja. U analizama rezidua i detekciji zlouporabe u anaboličke svrhe, s obzirom da se njegovom uporabom ostvaruju veći proizvodni prinosi u stočarskoj industriji, nužno je poznavanje fizioloških razina ovog hormona u različitim tkivima i tekućinama životinja te proizvodima životinjskog podrijetla namijenjenih ljudskoj prehrani. U ovom istraživanju, primjenom validirane ELISA metode, određivane su koncentracije 17 $\beta$ -estradiola u mesu, nepretradenom mlijeku i plazmi negraviranih krava (n=50) iz različitih uzgoja, pasminskog sastava Holstein Friesian i Simmental, uzorkovanih sa više farmi i klaonica u Republici Hrvatskoj. Utvrđene srednje vrijednosti 17 $\beta$ -estradiola ( $\pm$ SD) iznosile su u mesu 13 $\pm$ 5 ng/kg, nepretradenom mlijeku 19 $\pm$ 13 ng/L, te 21 $\pm$ 11 ng/L u plazmi, a statistički značajne razlike (p<0,05) po analiziranim skupinama uzoraka nisu utvrđene. Kako u promatranom uzorku nisu utvrđene razine 17 $\beta$ -estradiola veće od ranije objavljenih za netretirane životinje, iste se mogu smatrati fiziološkim razinama ovog hormona u mesu, mlijeku i krvi negraviranih krava, isključujući pri tom mogućnost zlouporabe ove tvari u anaboličke svrhe i čineći unos ovog hormona u ljudi putem mesa i mlijeka zanemarivim. **Cljučne riječi:** 17 $\beta$ -estradiol, meso, mlijeko, plazma, fiziološke razine, tvari u anaboličkim učincima

### Uvod

17 $\beta$ -Estradiol je steroidni hormon kojeg sintetiziraju spolne žlijezde, a uključen je u endokrinu regulaciju rasta te razvoj spolnih karakteristika u ljudi i životinja. Povećane razine ovog hormona u organizmu imaju toksičan učinak. Ujedno, 17 $\beta$ -estradiol ima indirektni i direktan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika u organizmu te povećanu sintezu proteina i bolju iskoristivost hrane (Van der Wal i Berende, 1983; Meyer, 2001). Njegovim korištenjem u anaboličke svrhe na farmakološkim životinjama dobiva se meso bojih organoleptičkih svojstava, sa većim udjelom mišićnog tkiva i manjom količinom masnog tkiva (Lone, 1997; Deshpande, 2002; Stephany, 2010), te povećani rast i prinosi u stočarskoj industriji za oko 5-15% (Meyer, 2001). Upravo je takav učinak ovog hormona u prošlosti bio izazov za njihovu ilegalnu primjenu u svrhu poboljšanja proizvodnih karakteristika farmakoloških životinja i ostvarivanja većeg profita.

Učinak 17 $\beta$ -estradiola na rast životinja ovisi o vrsti životinje, dobi, spolu i primijenjenoj dozi, a ostvaruje se neposrednom stimulacijom mišića preko estrogennih receptora (Meyer i Rapp, 1985; Berisha i sur., 2002). Obično se davao u kombinaciji s drugim spojevima androgeno i gestageno djelovanja. Međutim, toksikološka istraživanja uz oralnu i parenteralnu primjenu 17 $\beta$ -estradiola, u ovisnosti o dozi i trajanju izloženosti, ukazala su na povećanu pojavljivost tumora u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, dojka), a kronična izloženost životinja anaboličkoj dozi izazvala je mutagene i karcinogene promjene (Zimmerman, 1998). Primjena 17 $\beta$ -estradiola u terapijske svrhe istražuje se dugi niz godina o čemu postoje brojna istraživanja (Kesler i sur., 1981; **El-Zarkouny i Stevenson, 2004; Colazo i sur., 2007; Alnimer i Husein, 2007**). Utjecaj ovog hormona na fiziološke procese u organizmu

ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu (Andersson i Skakkebaek, 1999), a ukoliko se primjenjuje na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi ostaci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (FAO/WHO, 2000; Pleadin i sur., 2011a).

Budući da je 17 $\beta$ -estradiol dio endokrinog sustava i nalazi se u biološkom materijalu životinja u fiziološkim razinama, njegov nalaz u životinjskim tkivima i tekućinama nije automatski dokaz ilegalne uporabe. Upravo zbog fiziološke prisutnosti, te variranja prirodnih razina u ovisnosti o brojnim čimbenicima (Scippo i sur., 1993; Heitzman, 1994; Schilt i sur., 1996), teško je odrediti granicu za poduzimanje mjera u slučaju sumnje na pozitivan nalaz odnosno prepoznati zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe. Kako bi se moglo sa sigurnošću procijeniti da li se radi o fiziološkoj razini hormona ili o njihovoj zlouporabi, uz podatke o

razinama 17 $\beta$ -estradiola u biološkom materijalu potrebno je uzeti u obzir i podatke o životinji kao i anamnestičke podatke (Pleadin i sur., 2011b).

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 farmakološkim životinjama, a uporaba 17 $\beta$ -estradiola u terapijske svrhe je ograničena na slučajevne poremećaja u reprodukciji odnosno tijekom graviditeta (Direktiva 1996/22/EC; Direktiva 2003/74/EC). U Republici Hrvatskoj uporaba anabolička je također zabranjena, a važeća je Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmakološkim životinjama određene tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista (NN 82/2010) te Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (NN 21/2011).

Svrha ovog rada bila je utvrditi razinu 17 $\beta$ -estradiola, kao tvari koja može biti zlouporabljena u anaboličke svrhe, u mesu, mlijeku i krvi negraviranih krava iz više različitih uzgoja u Republici Hrvatskoj uz uporabu imunoenzijske ELISA metode. Utvrđene koncentracije ovog hormona dale bi uvid u njegove prirodne razine u proizvodima životinjskog podrijetla, koji se svakodnevno koriste u ljudskoj prehrani (meso i mlijeko), a utvrđene razine u plazmi omogućile bi utemeljeniju prosudbu o mogućoj anaboličkoj zlouporabi.

### Materijali i metode

#### Uzorkovanje

Uzorci mišićnog tkiva (mesa), nepretradenog mlijeka (mlijeka) i krvi (plazme) negraviranih krava (n=50), pasminskog sastava Holstein Friesian i Simmental i starosti od 3 do 11 godina, uzorkovani su u razdoblju od 2010. do 2012. godine sa više klaonica i farmi s područja sjeverozapadnog, središnjeg i istočnog dijela Hrvatske. Svježe mlijeko uzeto je na farmi tje-

kom mužnje krava, a uzorci mišićnog tkiva i krvi uzimani su na klaonicama. Krv životinja uzorkovana je u epruvete sa antikoagulantom EDTA te centrifugirana tijekom 10 minuta pri brzini od 2000 okretaja/min. Nakon potpunog odjeljivanja plazme, ista je izdvojena pomoću mikropipete u epruvete. Uzorci su pohranjeni na -20 °C do početka analize i razvrstani u 5 skupina (1-travanj 2010., 2-rujan 2010., 3-sviibanj 2011., 4-listopad 2011. i 15-ožujak 2012.) po 10 uzoraka mesa, mlijeka i krvi, s obzirom na vrijeme uzorkovanja.

#### Priprema uzoraka

10 g mišićnog tkiva homogenizirano je sa 10 mL 67 mM PBS pufera pomoću *ultraturax* i mućkano 5 min. U 2 g homogeniziranog uzorka dodano je 5 mL tercijarnog butil-metil etera, ostavljeno na treslici tijekom 30 min i centrifugirano 10 min pri 3000 okretaja/min. Supernatant je prenesen i provedena je ekstrakcija sa sljedećih 5 mL tercijarnog butil-metil etera. Spojeni eterni slojevi su otpareni do suha u struji dušika pri 40 °C. Ostaci su otopljeni u 1 mL 80%-tne smjese metanol/voda, otopina je razrijeđena sa 2 mL 20 mM PBS pufera i nadalje pročišćavana na C18 kolonicama za krutofaznu ekstrakciju (Resprep, Bellefonte, PA) prema uputama proizvođača ELISA kita.

Uzorci sirovog mlijeka pripremani su na način da je u 1 mL svježeg mlijeka dodano 3 mL metanola (100%, v/v) te mućkano 1 min na sobnoj temperaturi. Sadržaj je centrifugiran tijekom 20 min pri 3000 okretaja/min i temperaturi od 4°C. U 1 mL bistrog ili lagano zamućenog supernatanta dodano je 875  $\mu$ L pufera za razrijeđivanje uzoraka.

U 1 mL izdvojene krvne plazme dodano je 5 mL eterne smjese (tercijarni butilmetileter/petroleter, 30/70 v/v) te ostavljeno na treslici tijekom 20 min na sobnoj temperaturi. Sadržaj je potom zamrznut na -25 °C tijekom 60 min, a eterni supernatanti su dekantirani i otpareni na vakuum uparivaču pri 60°C

(Laborota 4001 Efficient, Heidolph). Ostaci 17 $\beta$ -estradiola su zatim otopljeni u 400  $\mu$ L pufera za razrijeđivanje uzoraka.

#### Određivanje koncentracije 17 $\beta$ -estradiola

Pripremljene otopine su nadalje korištene u imunoenzijskom testu za određivanje koncentracije ostataka 17 $\beta$ -estradiola, koji je proveden prema uputama proizvođača komercijalnog ELISA kita (R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka). U jačice mikrotitracijske ploče ukapane su standardne otopine 17 $\beta$ -estradiola te pripremljene otopine uzorka mišićnog tkiva, mlijeka i plazme. Zatim je dodano 50  $\mu$ L otopine razrijeđenog enzimskog konjugata (peroksidaza) te 50  $\mu$ L razrijeđenog anti-17 $\beta$ -estradiol antitijela. Ploča je lagano protresena te inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu. Ispiranje jačica provedeno je sa 250  $\mu$ L destilirane vode i ponavljanjem postupka tri puta. Nakon ispiranja, u jačice kita dodano je po 50  $\mu$ L substrata i kromogena, lagano promućkano i inkubirano tijekom 30 min. Reakcija je zaustavljena dodatkom 100  $\mu$ L stop otopine (1 N sulfatna kiselina) te je apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 450 nm. Cjeloviti ELISA postupak proveden je uporabom automatskog kemijskog analizatora ChemWell (Awareness Technology Inc. 2910, USA). Koncentracijske razine su izražene kao srednje vrijednosti dvaju određivanja (ng/kg, ng/L), uzimajući u obzir faktore razrijeđenja uzoraka.

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem statističkog paketa Statistica for Windows (10,0 Statsoft Inc 2011, USA). Za određivanje razlike u vrijednostima koncentracija po skupinama uzoraka primijenjen je t-test, a statistički značajne razlike izražavane su na razini vjerojatnosti p<0,05.

#### Rezultati i rasprava

Rezidue hormona u namirnicama životinjskog podrijetla predstavljaju

<sup>1</sup> doc. dr. sc. Jelka Pleadin, dipl. ing., znanstvena savjetnica; dr. sc. Nina Periš, dipl. ing. asistentica; dr. sc. Ana Vulić, dipl. ing., asistentica, Laboratorij za analitičku kemiju, Hrvatski veterinarski institut, Savska cesta 143, Zagreb;

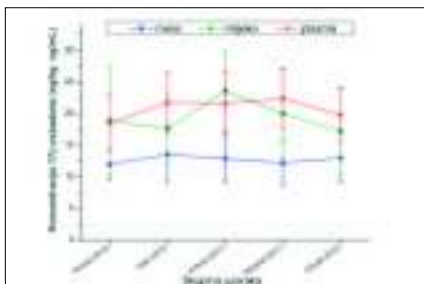
<sup>2</sup> prof. dr. sc. Nada Vahčić, redovita profesorica, Prehrambeno-biotehniološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb

značajan predmet zabrinutosti potrošača u Europi, a što je vjerojatno rezultat brojnih skandala vezanih za pokušaj njihove zlouporabe u anaboličke svrhe na farmским životinjama s ciljem ostvarivanja većeg profita u stočarskoj proizvodnji (Sundlof, 1994; Hartmann i sur., 1998). Literaturni podaci pokazuju da su se u prošlosti iz tog razloga pokušavale zlouporabiti različite prirodne i sintetske organske tvari anaboličkog djelovanja, prirodni i sintetski steroidni spolni hormoni, stilbeni i njihovi derivati, soli i esteri, anti-tireoidne tvari, laktorni rezorcilne kiseline, beta-agonisti i ostale tvari (Pleadin i sur., 2009; Pleadin i sur., 2011a).

Korištenje prirodnih spolnih hormona tijekom ishrane životinja može uzrokovati fiziološku aktivnost u organizmu kao i endogeni hormoni, imati stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva, ali i uzrokovati brojne toksične učinke kod potrošača tako kontaminiranih proizvoda životinjskog podrijetla (meso, mlijeko, jaja). 17 $\beta$ -estradiol, kao i ostali steroidni hormoni, u organizmu prolazi barijeru krv-mlijeko. Podaci pokazuju da se ovog hormona dnevno u ljudski organizam konzumacijom kroz mlijeko i mliječne proizvode unese oko 60-70%, a kroz meso, ribu i jaja oko 15-20% (Hartmann i sur., 1998). Zbog moguće zlouporabe u anaboličke svrhe nameće se potreba za provođenjem sustavnog nadzora ovog toksikanta, određivanjem ostataka u biološkom materijalu životinja za proizvodnju hrane.

#### Podaci o koncentracijama

17 $\beta$ -estradiola u tkivima i tekućinama životinja, u ovisnosti o brojnim čimbenicima, nedostadni su za različite životinjske vrste i kategorije te su s ciljem utemeljenije procjene zlouporabe predmetna istraživanja i dalje su vrlo aktualna. Ujedno, objavljeno je malo podataka o razinama različitih metabolita spolnih hormona, iako je ta informacija vrlo značajna s obzirom da pojedini metaboliti također u



Slika 1. Koncentracija 17 $\beta$ -estradiola u mesu, mlijeku i plazmi negravidnih krava

organizmu imaju biološku aktivnost (Andersson i Skakkebaek, 1999). Prilikom procjene analitičkih rezultata koji se odnose na koncentracije spolnih hormona, važno je uzeti u obzir i sve poznate čimbenike koji bi mogli utjecati na interpretaciju dobivenih rezultata te u slučaju sumnjivo pozitivnih uzoraka primijeniti neku od potvrđenih analitičkih metoda.

Istraživanja anaboličkog učinka te nadzor zlouporabe spolnih hormona u većini zemalja Europske unije upravo su najznačajnija za 17 $\beta$ -estradiol i to zbog utvrđene najizraženije anaboličke aktivnosti ovog hormona, naročito u goveda i ovaca (Meyer, 2001). U ranijim istraživanjima utvrđeno je da je plazma najpouzdaniji matiks u otkrivanju zlouporabe prirodnih hormona s vrlo niskim limitima detekcije 17 $\beta$ -estradiola u ovom matiks (Scippo i sur., 1994; Pleadin i sur., 2011b). Imunoenzimska metoda ELISA i radioimunoenzimska (RIA) metoda općenito su vrlo visoke osjetljivosti te se posljednjih desetljeća široko koriste u određivanju razine spolnih hormona, a više vrsta komercijalnih kitova dostupno je za tu namjenu (Doyle, 2000). Istraživanja su pokazala je da je ELISA metoda pouzdana, brza, ekonomična i precizna metoda za kvantitativno određivanje 17 $\beta$ -estradiola u različitim matiksima (Domènech i sur., 2011;

Pleadin i sur., 2011b).

U ovom istraživanju određivana je koncentracija 17 $\beta$ -estradiola u mesu, neprerađenom mlijeku i plazmi negravidnih krava, primjenom prethodno validirane imunoenzimske ELISA metode. Rezultati validacijskih parametara ELISA metode prikazani su u Tablici 1. Usporedbom sa zadanim kriterijima validacije analitičkih metoda, definiranim Pravilnikom o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 2/2005), utvrđena je prihvatljivost dobivenih vrijednosti validacije ELISA metode, a time i njena prikladnost za određivanje koncentracije 17 $\beta$ -estradiola u navedenim vrstama uzoraka. Isto tako, baždarne krivulje izrađene iz standardnih otopina 17 $\beta$ -estradiola tijekom provedbe analiza davale su prihvatljive koeficijente varijacije u rasponu od 1,4% do 8,1%.

Utvrđene vrijednosti koncentracija 17 $\beta$ -estradiola, prikazane kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama ( $\pm$ SD), po analiziranim skupinama uzoraka (1-5), prikazane su na Slici 1.

Koncentracije 17 $\beta$ -estradiola blago su varirale po životinjama i ovisno o vrsti matiksa, iako ne statistički značajno. Određene koncentracije u mesu bile su u rasponu od 10 ng/

Tablica 1. Rezultati validacijskih parametara ELISA metode određivanja 17 $\beta$ -estradiola u mesu, mlijeku i plazmi

Validacijski parametar	Vrsta uzorka		
	Meso	Mlijeko	Plazma
Limit detekcije (LOD) (ng/kg, ng/L)	9	8	10
Limit kvantifikacije (LOQ) (ng/kg, ng/L)	13	13	14
Iskorištenje (%)	80,1	85,1	84,2

kg do 21 ng/kg, u mlijeku od 10 ng/L do 35 ng/L, a u plazmi životinja od 12 ng/L do 29 ng/L. Srednje vrijednosti 17 $\beta$ -estradiola analiziranih uzoraka u svih pet skupina iznosile su 13 $\pm$ 5 ng/kg u mesu, 19 $\pm$ 13 ng/L u mlijeku te 21 $\pm$ 11 ng/L u plazmi. Statističkom obradom podataka nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u koncentracijama 17 $\beta$ -estradiola između analiziranih skupina uzoraka (1-5).

Literaturni podaci pokazuju da kod ženskih goveda razine 17 $\beta$ -estradiola variraju ovisno o fazi ciklusa te s obzirom na gravidnost. Podaci za negravidnu junad govore o vrijednostima u plazmi od 0,3 do 2,2 ng/L (Moran i sur., 1991; Lammers i sur., 1999; Nakada i sur., 2000) i mišićnom tkivu od 12 ng/kg (Henricks i sur., 1983). Značajno veće razine određene su u gravidnih krava, s rasponom od 52 do 277 ng/L i variranjem po danima pred teljenje (Heitzman i sur., 1979). Određivanje ovog hormona u plazmi je naročito značajno s obzirom da je ista matiks nadzora u monitoringu rezidua tvari s anaboličkim učinkom. U istraživanju Shafie i sur. (1982) određena je koncentracija 17 $\beta$ -estradiola u plazmi s maksimalnom vrijednošću od 20 ng/L tijekom folikularne faze ciklusa, a značajna je ovisnost razine 17 $\beta$ -estradiola i o godišnjem dobu. Kao glavni estrogen u mlijeku određen je biološki neaktivan 17 $\alpha$ -estradiol (oko 160 ng/L), zatim estron (oko 30 ng/L) te 17 $\beta$ -estradiol (oko 10 ng/L) (Erb i sur., 1977). Podaci govore o koncentracijama 17 $\beta$ -estradiola od 10 do 20 ng/kg u govedini (Kushinsky, 1983; Henricks, 1980) te u rasponu od 10 do 60 ng/L u neprerađenom mlijeku (Erb i sur.,

1977; Hoffmann, 1977). S obzirom da je 17 $\beta$ -estradiol lipofilni hormon, njegova koncentracija u mlijeku ovisi o količini odnosno udjelu masti. Ujedno, procesiranje namirnica životinjskog podrijetla nije ukazalo na značajan utjecaj primijenjenog tretmana na razine ovog hormona (Hartmann i sur., 1998).

Samo u plazmi gravidnih krava ili plazmi ilegalno tretiranih životinja određene su koncentracije 17 $\beta$ -estradiola veće od 100 ng/L (Hoffmann i Evers, 1986). Propisane razine 17 $\beta$ -estradiola za poduzimanje mjera zbog sumnje na zlouporabu definirane su Direktivom Vijeća 1996/22/EC i odnose se na plazmu goveda, a podijeljene su po dobi i spolu životinja. Kako bi se isključila mogućnost dobivanja velikog broja lažno pozitivnih rezultata, granica pri kojoj se poduzimaju mjere za 17 $\beta$ -estradiol u plazmi, za oba spola i sve dobne skupine goveda, postavljena je na nešto veću razinu u odnosu na prosječne fiziološke razine i to do najviše 40 ng/L za negravidna i 4000 ng/L za gravidna goveda (Heitzman, 1994). Uzima se da koncentracije ovog hormona u plazmi goveda veće od navedenih upućuju na zlouporabu u anaboličke svrhe.

Rezultati ovog istraživanja u svim analiziranim skupinama uzoraka (1-5) upućuju na sukladnost s ranije objavljenim podacima drugih autora o utvrđenim fiziološkim razinama 17 $\beta$ -estradiola u mesu, mlijeku te plazmi negravidnih krava. Ujedno govore da se dobivene koncentracije isključivo odnose na fiziološke razine 17 $\beta$ -estradiola te da se u promatra-

nom uzorku može isključiti mogućnost njegove zlouporabe u anaboličke svrhe. S obzirom na utvrđene vrlo niske koncentracije 17 $\beta$ -estradiola u mesu i mlijeku, može se smatrati da je putem hrane životinjskog podrijetla kao vrlo zastupljene grupe namirnica u ljudskoj prehrani, moguć vrlo niski dnevni unos ovog hormona u ljudi, a što su pokazala i ranije provedena istraživanja (Hartmann i sur., 1998). Literaturni podaci govore da brojne druge namirnice sadrže veće razine hormonalno aktivnih tvari, značajno veće u odnosu na meso i mlijeko, te se stoga jači utjecaj na zdravlje ljudi može očekivati unosom fitoestrogena koji se pojavljuju u biljkama u velikim količinama ili izlaganja nekim okolišnim tvarima sa hormonskim djelovanjem. Isto tako, znanstvene spoznaje o učinku nekih tvari svakodnevno se mijenjaju i otkrivaju se njihovi mogući neželjeni učinci te je osim spolnih hormona u pojedinih vrsta životinja važno pratiti sudbinu i drugih neistraženih tvari koje također mogu imati anabolički učinak.

#### Zaključak

Zbog moguće zlouporabe 17 $\beta$ -estradiola u anaboličke svrhe i njegove visoke toksičnosti potreban je sustavan nadzor ovog toksikanta u stočarskoj proizvodnji. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da se utvrđene koncentracije ovog hormona odnose isključivo na fiziološke razine u govedem mesu i neprerađenom mlijeku kao hrani značajno korištenoj u ljudskoj prehrani te u plazmi kao matiks koji se koristi u nadzoru zlouporabe ovog hormona. Svakodnevnom konzumacijom mesa i mlijeka kod ljudi, bez obzira na njihovu životnu dob i spol, unos 17 $\beta$ -estradiola putem ovih namirnica može se smatrati zanemarivim. Utvrđene fiziološke razine u promatranom uzorku isključuju mogućnost zlouporabe 17 $\beta$ -estradiola te mogu poslužiti kao referentne vrijednosti u daljnjoj procjeni njegove zlouporabe u anaboličke svrhe.

## Literatura

- Alnimer, M. A., M. Q. Hussein** (2007): The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer. Reproduction in domestic animals. 42, 363-369.
- Andersson, A.-M., N. E. Skakkebaek** (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. European Journal of Endocrinology. 140, 477-485.
- Anonimno** (1996): Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. Official Journal of the European Union. Legis. L125, 3.
- Anonimno** (2003): Directive 2003/74/EC of the European parliament and of the council of 22 September 2003 amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. Official Journal of the European Union. Legis. L262/17.
- Anonimno** (2010): Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmskim životinjama određanih tvari hormonskog i tirostatskog učinka i beta-agonista. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (N N br. 82/2010).
- Anonimno** (2011): Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (N N br. 21/2011).
- Anonimno** (2005): Pravilnik o provedenju analitičkih metoda (tumačenju rezultata). Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (N N br. 2/2005).
- Berisha, B., M. W. Pfaffl, D. Schams** (2002): Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle. Endocrine. 17, 207-214.
- Colazo, M. G., J. P. Kastelic, J. A. Small, R. E. Wilde, D. R. Ward, R. J. Mapletoft** (2007): Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. The Canadian Veterinary Journal. 48, 49-56.
- Deshpande, S. S.** (2002): Drug Residues. U: Handbook of Food Toxicology, Marcel Dekker, Inc., New York, 865-880.
- Dominech, A., S. Pich, A. Aris, C. Plasencia, A. Bach, A. Serrano** (2011): Heat identification by 17 $\beta$ -estradiol and progesterone quantification in individual raw milk samples by enzyme immunoassay. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 14, no. 4. <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue4-fulltext-6>.
- Doyle, E.** (2000): Human safety of hormone implants used to promote growth in cattle. A review of the scientific literature. FRI Briefings.
- El-Zarkouny, S. Z., J. S. Stevenson** (2004): Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. Journal of Dairy Science. 87, 3306-3321.
- Erb, R. E., B. P. Chew, H. F. Keller** (1977): Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and blood, and excretion of estrogen in urine. Journal of Animal Science. 46, 617-626.
- 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.
- Hartmann, S., M. Lacom, H. Steinhart** (1998): Natural occurrence of steroid hormones in food. Food Chemistry. 62(1), 7-20.
- Heitzman, R. J.** (1994): Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products: Reference Materials and Methods. Oxford: Blackwell Science.
- Heitzman, R. J., D. J. Harwood, R. M. Kay, W. Little, C. B. Mallinson, L. P. Reynolds** (1979): Effects of implanting prepubertal dairy heifers with anabolic steroids on hormonal status, puberty and parturition. Journal of Animal Science. 48(4), 859-866.
- Henricks, D. M.** (1980): Assay of naturally occurring estrogens in bovine tissues. Steroids in Animal Production. International Symposium. Warsaw, str. 161-170.
- Henricks, D. M., S. L. Gray, J. L. Hoover** (1983): Residue levels of endogenous estrogens in beef tissues. Journal of Animal Science. 57(1), 247-255.
- Hoffmann, B.** (1977): Vorkommen und Bedeutung von Hormonen in der Milch. Milchwissenschaft 32, 477-482.
- Hoffmann, B., P. Evers** (1986): Anabolic agents with sex-hormone-like activities; problems of residues. U: Drug Residues in Animals. RICA A.G. (ured.), Academic Press, New York, str. 111-146.
- Kesler, D., T. Troxel, D. Vincent, N. Scheffahn, R. Noble** (1981): Detection of estrus with cows administered testosterone via injections and/or silastic implants. Theriogenology. 15, 327-334.
- Kushinsky, S.** (1983): Safety aspects of the use of cattle implants containing natural steroids. International Symposium on Safety Evaluation of Animal Drug Residues, Berlin.
- Lammers, B. P., A. J. Heinrichs, R. S. Keninger** (1999): The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on growth, feed efficiency, and blood parameters. Journal of Dairy Science. 82(8), 1746-1752.
- 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. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 37, 93-209.
- Meyer, H. H. D.** (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 109, 1-8.
- Meyer, H. H. D., M. Rapp** (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. Journal of Animal Science. 60, 294-300.
- Moran, C., J. F. Quirke, D. J. Prendiville, S. Bourke, J. F. Roche** (1991): The effect of estradiol, trenbolone acetate, or zeranol on growth rate, mammary development, carcass traits, and plasma estradiol concentrations of beef heifers. Journal of Animal Science. 69(11), 4249-4258.
- Nakada, K., M. Moriyoishi, T. Nakao, G. Watanabe, K. Taya** (2000): Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 beta, testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. Domestic Animal Endocrinology. 18(1), 57-69.
- Pleadin, J., N. Periš, B. Antolović, B. Šimić, I. Kmetić** (2011a): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. Croatian journal of food science and technology. 3(1), 48-56.
- Pleadin, J., S. Terzić, N. Periš, A. Vulić** (2011b): Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. Biotechnology in Animal Husbandry. 27(2), 147-159.
- Pleadin, J., A. Vulić, N. Periš** (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. Meso. 11(6), 360-365.
- Schilt, R., R. W. Stephany, C. J. M. Arts, L. M. H. Frijs** (1996): Estradiol levels in urine of veal calves as indicator of treatment: Possibility or fiction? Euroresidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, The Netherlands.
- Scippo, M. L., P. Gaspar, G. Degand, F. Brosse, G. Maghuin-Rogister** (1993): Control of the illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls. Analytica Chimica Acta. 275, 57-74.
- Scippo, M. L., G. Degand, A. Duyckaerts, G. Maghuin-Rogister** (1994): Control of the illegal administration of natural steroid hormones in plasma of bulls and heifers. Analyst. 119, 2639-2644.
- Shafie, M. M., H. Mourad, A. Barkawi, M. B. Aboul-Ela, Y. Melkawy** (1982): Serum progesterone and oestradiol concentration in the cyclic buffalo. Tropical Animal Production. 7, 283-289.
- Stephany, R. W.** (2010): Hormonal growth promoting agents in food producing animals. Handbook of Experimental Pharmacology. 195, 355-367.
- Sundlof, S. F.** (1994): Human health risks associated with drug residues in animal-derived foods. Journal of Agromedicine. 1, 5-20.
- Zimmerman, H. J.** (1998): Hepatic disease. U: Toxicology of the liver. Eds. Plass, G.L., Hewitt, W.R., Taylor and Francis, USA, 45-67.
- Van Der Wal, P., P. L. M. Berende** (1983): Effects of anabolic agents on food-producing animals. U: Anabolics in animal production (Messonnier, E. i. Mitchell-Vigneron, J., ured.), Office International des Epizooties, Paris, 73-115.

Dostavljeno: 1.10.2013.  
Prihvaćeno: 19.12.2013.

### 17 $\beta$ -estradiol in beef meat, milk and blood: Physiological levels and misuse in cattle production

#### Summary

17 $\beta$ -estradiol is a sex hormone of the endocrine system present in biological material of farm animals. In residue analyses and detection of misuse for anabolic purposes, considering the fact that its misuse enables higher production yields in livestock industry, it is vital to be familiar with physiological levels of this hormone in different tissues and body fluids of animals, as well as of products of animal origin intended for human consumption. Using a validated ELISA method, in this research there were determined concentrations of 17 $\beta$ -estradiol in meat, unprocessed milk and plasma of non-gravid cows (n=50) from different breeding manners, breed composition Holstein, Friesian and Simmental, sampled from several farms and abattoirs in the Republic of Croatia. Determined means of 17 $\beta$ -estradiol ( $\pm$ SD) amounted 13 $\pm$ 5 ng/kg in meat, 19 $\pm$ 13 ng/L in unprocessed milk and 21 $\pm$ 11 ng/L in plasma and statistically significant differences (p<0.05) in the analyzed sample groups were not determined. As in the observed sample there were not determined levels of 17 $\beta$ -estradiol higher than earlier published ones for untreated animals, they can be considered to be physiological levels of this hormone in meat, milk and blood of non-gravid cows, excluding thereby the possibility of misusing this substance for anabolic purposes and making the intake of this hormone in people by meat and milk irrelevant.

**Keywords:** 17 $\beta$ -estradiol, meat, milk, plasma, physiological levels, substances with anabolic effect

### 17 $\beta$ -Estradiol in Rindfleisch, Milch und Blut: Physiologische Ebenen und Missbrauch in Viehzucht

#### Zusammenfassung

17 $\beta$ -Estradiol ist ein Geschlechtshormon des Endokrinensystems anwesend im biologischen Material der Farmtiere. In den Residuum-Analysen und Detektion des Mißbrauchs für anabolische Zwecke, weil durch dessen Anwendung größere Herstellungsbeiträge in der Viehindustrie erzielt werden, ist es nötig, die physiologischen Ebenen dieses Hormons in verschiedenen Geweben und Flüssigkeiten der Tiere zu kennen. Das gilt auch für Produkte animaler Herkunft, die für die Menschennahrung bestimmt sind. In dieser Untersuchung wurden durch die Anwendung der validierten ELISA Methode Konzentrationen von 17 $\beta$ -Estradiol festgestellt, u.zw. im Fleisch, in unbehandelte Milch und Plasma der nicht graviden Kühe (n=50) aus verschiedener Zucht, Rasse Holstein Friesian und Simmental, zur Musterprobe genommen aus mehreren Farmen und Schlachthöfen in der Republik Kroatien. Die festgestellten mittleren Werte von 17 $\beta$ -Estradiol ( $\pm$ SD) betragen im Fleisch 13 $\pm$ 5 ng/kg, in der unbehandelten Milch 19 $\pm$ 13 ng/L und in Plasma 21 $\pm$ 11 ng/L. Statistisch bedeutende Unterschiede (p<0,05) in analysierten Mustergruppen wurden nicht vorgefunden. Da in untersuchten Mustern die Ebenen von 17 $\beta$ -Estradiol nicht größer als früher veröffentlichte Ebenen für unbehandelte Tiere vorgefunden waren, können diese als physiologische Ebenen dieses Hormons in Fleisch, Milch und Blut der nicht graviden Kühe betrachtet werden. Dabei wird die Möglichkeit des Mißbrauchs von diesem Stoff zu anabolischem Zweck ausgeschlossen, wobei die Eintragung dieses Hormons durch Fleisch oder Milch bei den Menschen unterlassen werden kann.

**Schlüsselwörter:** 17 $\beta$ -Estradiol, Fleisch, Milch, Plasma, physiologische Ebenen (Spiegel), Stoffe mit anabolischer Wirkung

### 17 $\beta$ -estradiolo nella carne bovina, latte e sangue: livelli fisiologici e abuso nell'allevamento del bestiame

#### Sommario

17 $\beta$ -estradiolo è un ormone sessuale prodotto da ghiandole endocrine e presente nel materiale biologico degli animali nell'allevamento. Nelle analisi degli residui e nella detezione dell'abuso allo scopo anabolico è necessario conoscere i livelli fisiologici di questo ormone nei vari tessuti e liquori degli animali e nei prodotti d'origine animale destinati all'alimentazione umana. In questa ricerca, applicando il metodo ELISA, si voleva determinare le concentrazioni del 17 $\beta$ -estradiolo nella carne, il latte non trattato e il plasma delle mucche non incinte (n=50) dagli allevamenti differenti, di razze Holstein Friesian e Simmental, e i campioni sono stati presi da vari allevamenti e macellerie nella Repubblica di Croazia. I valori medi del 17 $\beta$ -estradiolo che sono stati determinati ( $\pm$ SD) sono seguenti: nella carne 13 $\pm$ 5 ng/kg, nel latte non trattato 19 $\pm$ 13 ng/L e nel plasma 21 $\pm$ 11 ng/L. Statisticamente notevoli differenze (p<0,05) secondo i gruppi di campioni analizzati non sono state determinate. Siccome nei campioni esaminati non sono stati determinati livelli del 17 $\beta$ -estradiolo più alti di quelli precedentemente rivelati per gli animali non trattati, possono considerarsi i livelli fisiologici di quest'ormone nella carne, nel latte e nel sangue delle mucche non incinte. Questo sottintende che non c'è la possibilità di abuso di questa sostanza con lo scopo anabolico, e perciò si può trascurare l'introduzione di questo ormone nell'organismo umano tramite carne e latte.

**Parole chiave:** 17 $\beta$ -estradiolo, carne, latte, plasma, livelli fisiologici, sostanze con effetto anabolico