

REZIDUA ANABOLICKÝCH STEROIDŮ

V POTRAVINÁCH
ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.



2022



REZIDUA ANABOLICKÝCH STEROIDŮ

V POTRAVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

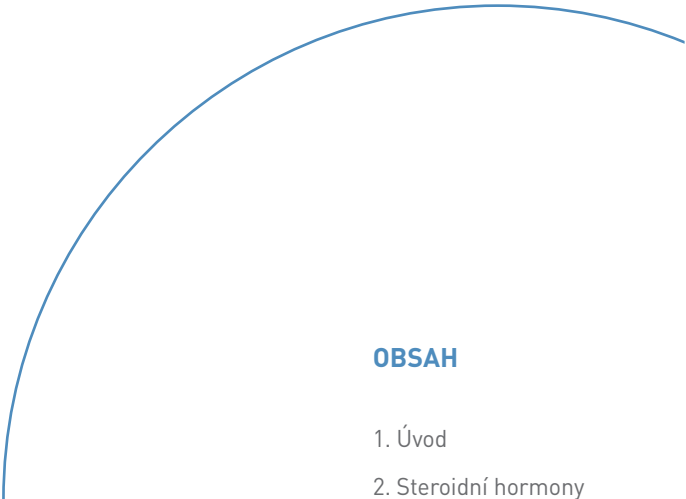
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

Poděkování

Poděkování patří zejména grantové agentuře Ministerstva zemědělství ČR – NAZV, díky finančním prostředkům z projektu QK1910311 byly publikované informace a uvedené výsledky experimentů získány a uveřejněny ve prospěch všem pracovníkům v zemědělství.

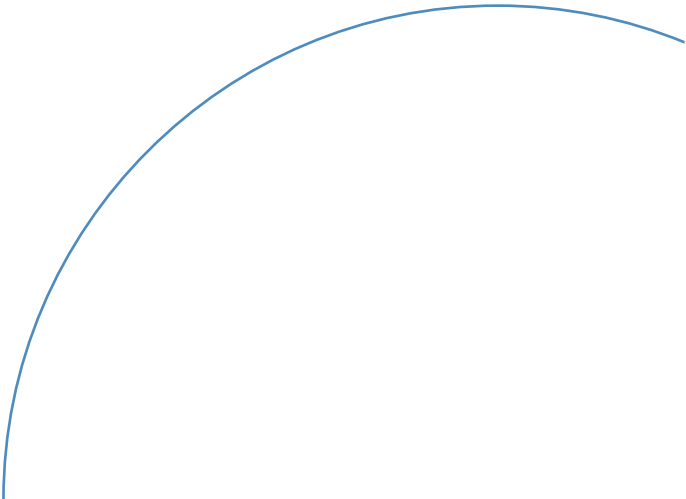
Zvláštní poděkování patří všem kolegyním a kolegům, kteří mi pomáhali s touto prací a mojí manželce Haničce, za její toleranci, velké pochopení pro časově náročnou práci a bez jejíž morální podpory a optimismu bych danou práci dokončil jen s obtížemi.

2022



OBSAH

1. Úvod	7
2. Steroidní hormony	8
2.1. Charakteristika a chemická struktura steroidních hormonů	8
2.2. Biosyntéza steroidního skeletu	11
2.3. Metabolismus steroidních hormonů	12
2.4. Biologické účinky steroidních hormonů	12
3. Androgeny	14
3.1. Obecná charakteristika androgenů	14
3.2. Testosteron	15
3.3. Metabolismus testosteronu	15
3.4. Přirozený výskyt testosteronu v živočišném materiálu	16
3.5. Vztah mezi chemickou strukturou testosteronu a farmakologickými účinky	19
3.6. Farmakokinetika anabolických steroidů u potravinových zvířat	21
4. Bezpečnost potravin a anabolické steroidy	23
4.1. Chemická rezidua v potravinách živočišného původu	23
4.2. Použití steroidů v produkci potravin živočišného původu	24
4.3. Historie zavedení zákazu používání anabolických steroidů v EU z pohledu legislativy	25
4.4 Jak je to s používáním anabolických steroidů ve výkrmu jinde ve světě?	27
4.5 Problematika dolazování anabolických steroidů v potravinách	28
5. Způsoby prokazování použití anabolických steroidů	31
5.1. Přehled analytických metod používaných pro stanovení anabolických steroidů	31
5.2. Cílené analytické instrumentální metody pro stanovení steroidů v potravinách	32
5.3. Nové přístupy k prokazování anabol. steroidů na bázi metabolomiky a proteomiky	33
5.4. Metabolomické a proteomické techniky a metodiky	35
6. Diskuze – Vydělám nebo spáchám trestný čin?	39
7. Závěr	40
8. Použitá literatura	42



1. ÚVOD

Dnes žijeme v globalizovaném světě „bez hranic“ a nelze vyloučit, že se ve svém osobním nebo profesním životě, dříve nebo později, setkáte s anabolickými steroidy. Různé články na téma anabolických steroidů a jejich používání je dnes oblíbené ve všech dnešních sdělovacích a informačních kanálech. Vrcholem pomyslného ledovce jsou informace o zakázaném používání anabolických steroidů v oblasti vrcholového sportu ve spojení s nepovoleným zvyšováním fyzických sportovních výkonů.

Významnou oblastí, o které se již tolik nemluví a neinformuje, je i užití anabolických steroidů ve spojení se zakázanými praktikami v sektoru živočišné výroby a zpracování, například s aplikací nepovolených látek a léčiv stimulačních růst svalové hmoty pro účely výkrmu potravinových zvířat. Použití všech stimulátorů růstu včetně steroidních hormonů s anabolickým účinkem je zakázáno v Evropské unii od roku 1988 směrnici Rady 96/22/ES. Problematika porušování zákazu užití stimulátorů růstu ve výkrmu je stále vysoce aktuální napříč celou EU, jak plyne z výsledků počtu pozitivních nálezů publikovaných v pravidelných technických zprávách Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA, 2021). V poslední době jsou známy především případy porušení zákazu zejména u prasat (clenbuterol, testosteron, nortestosteron, boldenon), u ryb (rekombinantní růstový hormon) nebo nově u skotu a prasat užití přírodních steroidů v „koktejlech“. Současné kontroly odhalování nedovolených praktik se dnes výhradně spoléhají na sledování omezeného počtu reziduí dobře známých zakázaných látek s anabolickými účinky s použitím analytických metod s cíleným stanovením, které jsou založeny na plynové a kapalinové chromatografii spojené s hmotnostní spektrometrií. Tyto analytické techniky jsou používány stejným způsobem již více než 30 let, ale pokud čelí novým výzvám a aktuálním požadavkům na bezpečnost potravin živočišného původu, jsou méně účinné nebo i zcela neúčinné. Jako příklady nových výzev lze uvést zejména užití nových dosud neznámých syntetických preparátů připravených na bázi steroidních hormonů s chemicky pozměněnou strukturou. Tyto syntetické steroidní deriváty podporují růst svalové hmoty mnohdy významně účinněji ve srovnání s dobře známými anabolickými steroidy. Další výzvou jsou nové aplikace ve

formě „koktejlů“ v neprokazatelných nízkých koncentracích jednotlivých zakázaných látek, avšak se synergickým anabolickým efektem.

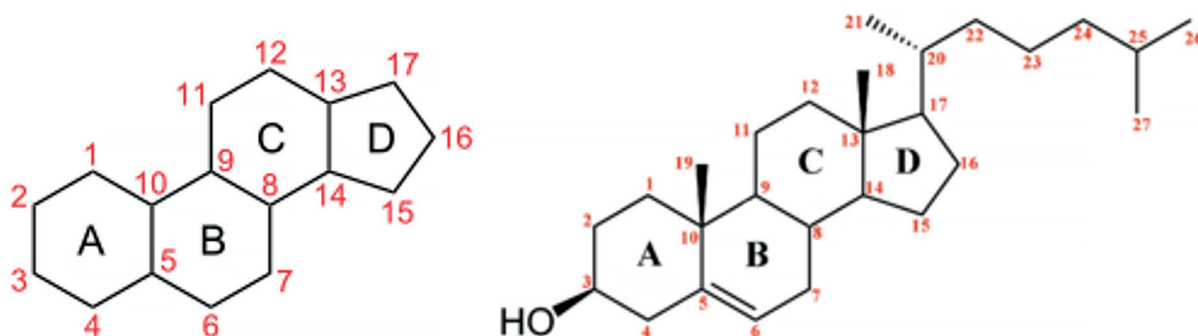
K odhalování užití těchto nových nepovolených praktik jsou v dnešní době naléhavě zapotřebí účinnější alternativní způsoby chemických analýz se záměrem prokazovat jejich sofistikované zneužívání. V tomto ohledu se ukazují být velmi perspektivním směrem prokazování zakázaného užití stimulátorů růstu, které přináší dnešní doba, analytické přístupy a techniky na bázi „omik“ – metabolomika a proteomika.

2. STEROIDNÍ HORMONY

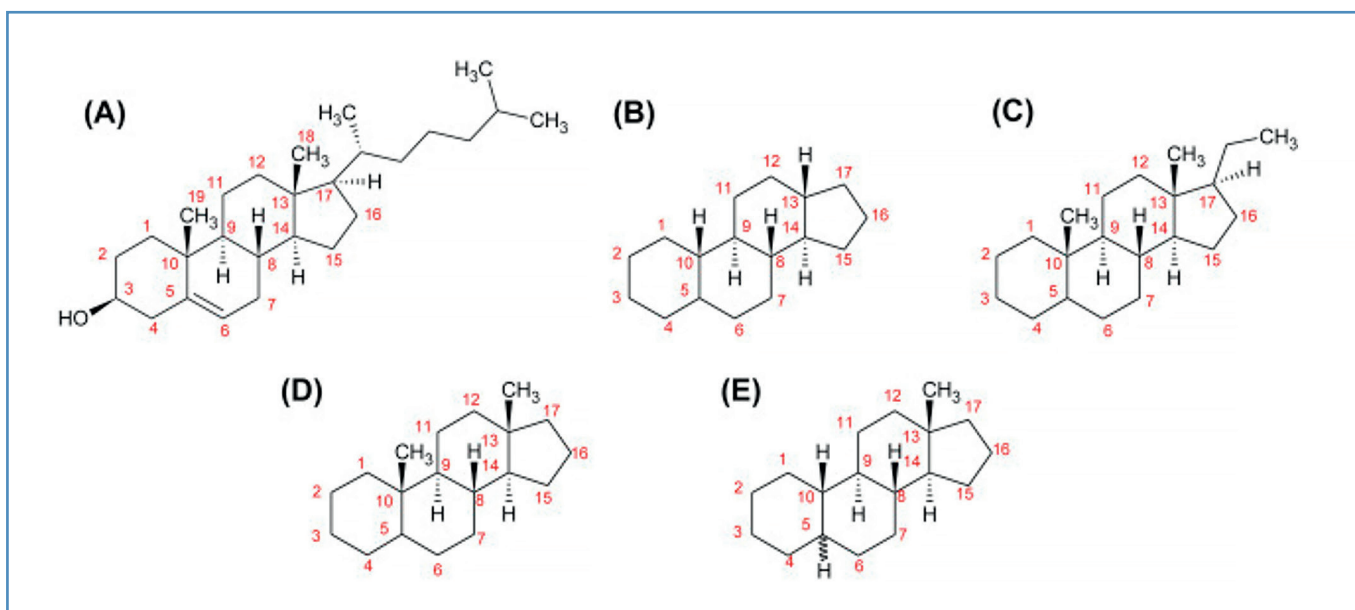
2.1. Charakteristika a chemická struktura steroidních hormonů

Pod pojmem „steroidy“ si většina laické veřejnosti představí pouze anabolické steroidy a to hlavně v souvislosti se sportovním dopingem a aférami v profesionálním sportu nebo dále případně ve spojitosti s profesionální či amatérskou kulturistikou. Avšak steroidy mají mnohem širší strukturu a široké farmakologické vlastnosti, než jen anabolický a androgenní efekt. Jako steroidy se označují organické sloučeniny s perhydrocyklopentano fenantrenovým jádrem, složeným ze čtyř kruhů: tří kruhů se šesti uhlíky a jednoho kruhu s pěti uhlíky – gonan [Obrázek 1] [1].

Jsou to alicyklické alkoholy, které mají lipofilní charakter a jsou téměř nerozpustné ve vodném prostředí, pokud nejsou ve formě esterů například s kyselinou sírovou nebo ve formě glukuronidů konjugací s kyselinou glukuronovou. Vždy se jedná o krystalické bezbarevné látky s vysokým bodem varu. Nomenklatura této třídy organických sloučenin se postupem doby stala složitou a nejednotnou, proto vznikla potřeba sjednotit používané triviální názvosloví steroidů do jednotného a jednoznačného systému klasifikace. Tento jednotný systém nomenklaturního značení byl zaveden Mezinárodní chemickou unií (International Union of Pure and Applied Chemistry/IUPAC) a dnes je doporučený v systematické nomenklatuře v aktuálním znění z roku 2010 (IUPAC, 2010) [2]. I přes tato mezinárodní doporučení řada významných organizací dodnes používá svou vlastní nomenklaturu, například firma Steraloids. Výběr použití nejlepšího pojmenování steroidů závisí především na konkrétní situaci a řadě dalších faktorů. Použití pouze



Obrázek 1 – Základní chemická struktura steroidů.



Obrázek 2 – Základní chemická struktura steroidů.

A – Cholestan [C27], B – Gonon [C17], C – Pregnan [C21], D – Androstan [C19] a E – Estran [C18]

doporučeného systematického názvosloví IUPAC může učinit text obtížně čitelný i pro řadu odborníků, kteří ovšem nemají detailní znalosti nomenklatury názvosloví z organické chemie. A naopak používání jen triviálních názvů, které nejsou jednotné, nemusí odbornému ani laickému čtenáři poskytnout dostatek informací. Kombinace systematických a triviálních názvů se často používá jako pragmatický kompromis ve většině odborných textů. Tento pragmatický kompromis bude používán i v této práci. Jako příklad různých způsobů pojmenování steroidů je možno například uvést některé možnosti pro testosteron:

Triviální název: testosteron.

IUPAC systematický název:

17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one.

Nejčastější obchodní název: Sustanon.

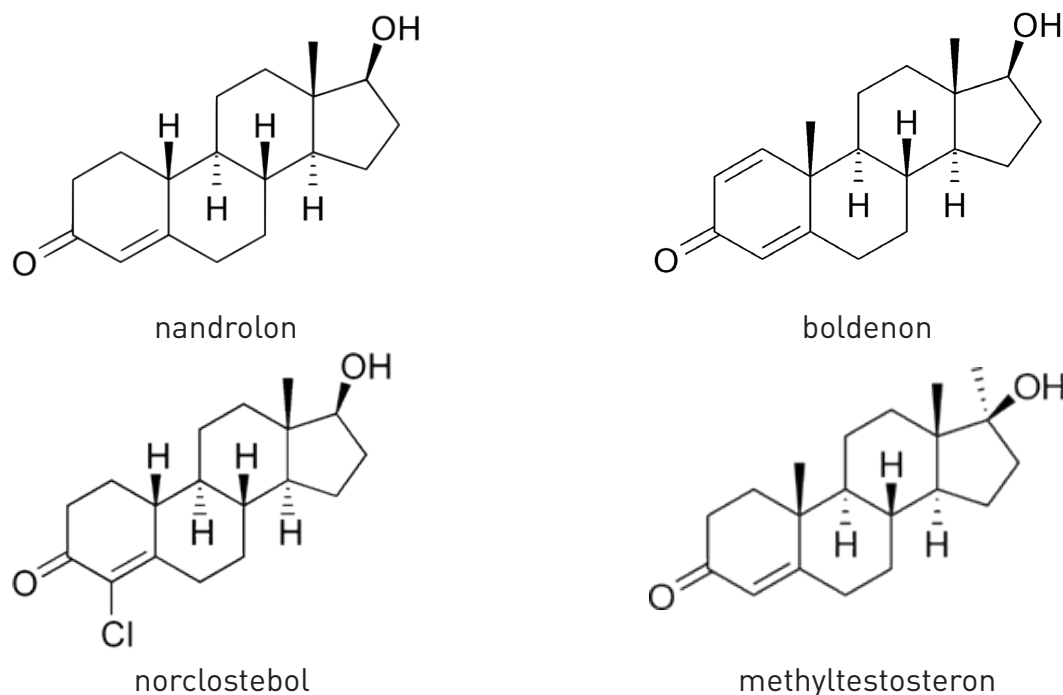
Steroidní molekula je prostorově uspořádána tak, že vodíky a substituenty směřují nad nebo pod rovinu skeletu. Orientačním bodem pro všechny substituenty je vodík, respektive methylová skupina na uhlíku C10, která leží vždy nad rovinou skeletu. V orientaci na steroidním skeletu mohou substituenty vyčnívat nad nebo pod rovinou skeletu. Pokud substituenty vystupují nad rovinu, jedná se o *cis*-konfiguraci; pokud směřují pod rovinu, jedná se o *trans*-konfiguraci. Ve vzorcích jsou *cis*-konfigurace označeny za použití plné čáry (nebo zvýrazněny plným klínem) a v názvu jsou pak označeny řeckým písmenem β . Substituenty v *trans*-konfiguraci jsou značeny ve vzorcích přerušovanou čarou a v názvu steroidu řeckým písmenem α . V přírodě se nejčastěji objevuje jediné možné sepětí kruhů B a C a většinou i kruhů C a D, přičemž u přirozených steroidů jde výhradně o *trans*-konfiguraci. Boční řetězec na uhlíku C17 u aktivních přírodních steroidů je vždy v poloze β . Chybí-li methylová skupina na C10 nebo C13, označují se steroidy v názvu předponou *nor*- a číslem chybějícího uhlíku (např. 19-nortestosteron, více známý jako nandrolon). Ale příponou *nor*- mohou být označeny rovněž steroidy vzniklé zúžením některého kruhu steroidního

skeletu, k názvu se pak připojí i velké písmeno označující příslušný kruh (např. A-nor-5 β -androstan).

Za účelem přehlednosti v systematickém pojmenování steroidů v nomenklatuře IUPAC jsou polycyklické skelety rozděleny podle počtu uhlíků v skeletu do šesti základních skupin. Ty se liší v počtu a orientaci uhlíků, které se pohybují od 17 uhlíků [C17] gonon, přes 18 uhlíků [C18] estran, 19 uhlíků [C19] androstan, 21 uhlíků [C21] pregnan, 24 uhlíků [C24] cholan až po 27 uhlíků [C27] cholestan (na němž je založen cholesterol). Rozsah steroidních skeletů použitý v systematické nomenklatuře je znázorněn dále [Obrázek 2] [4]. Avšak dosud žádné známé přirozené steroidy a jen velmi málo syntetických steroidů je založeno na gonanovém skeletu. Naopak všechny estrogény a například i nejznámější syntetický steroid nandrolon (19-nortestosteron, 17 β -hydroxy-estr-4-en-3-on) je založen na estranovém skeletu. Většina androgenů je založena na androstanovém skeletu a většina progesteronů a kortikosteroidů je založena na pregnanovém skeletu. Většina žlučových kyselin je založena na cholanovém skeletu a steroly, jako je cholesterol jsou založeny na cholestanovém skeletu. Toto systematické rozdělení steroidů koresponduje s jejich biologickými účinky a podle toho je možno je rozdělit do pěti skupin na:

- glukokortikoidy – C-21 steroidy,
- mineralokortikoidy – C-21 steroidy,
- androgeny – C-19 steroidy,
- estrogény – C-18 steroidy,
- gestageny – C-21 steroidy.

Z fyziologického hlediska žlázy endokrinního systému živočichů secernují do krve specifické látky regulující činnost jiných vzdálených tkání a to stimulačně nebo inhibičně. V roce 1905 E. H. Starling jako první použil pro tyto látky označení „hormony“. Za hormony jsou tedy považovány specifické látky se silným fyziologickým účinkem, secernované zvláště uzpůsobenými tkáněmi do krve živočichů a působící regulačně, stimulačně nebo inhibičně



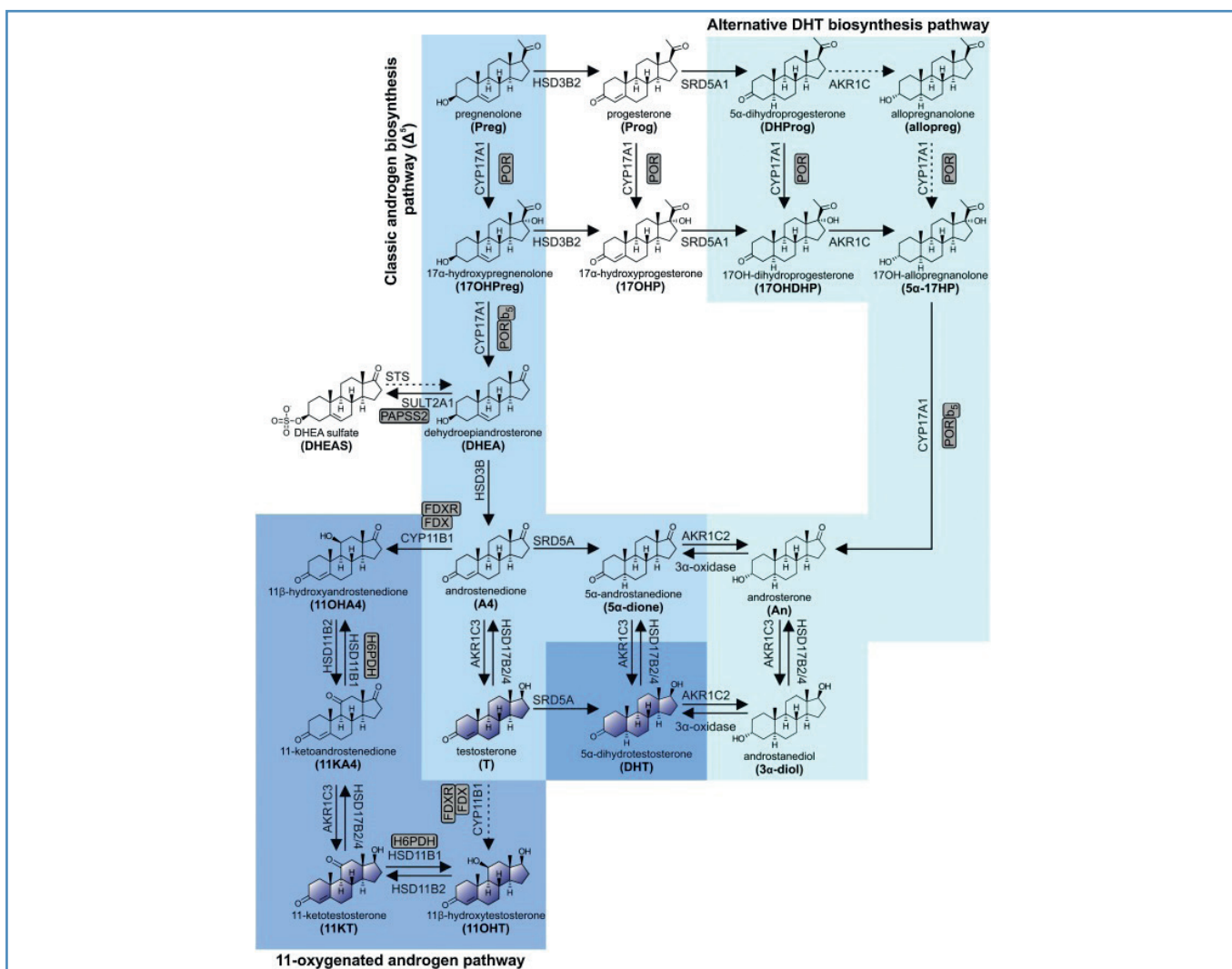
Obrázek 3 – Příklady řady různých syntetických androgeních anabolických steroidů.

na činnost jiných tělních orgánů [1]. Hormony obecně jsou z těchto důvodů především fyziologickým pojmem. Charakteristické znaky, které tyto chemicky často velmi odlišné látky spojují do jedné skupiny, jsou dány místem jejich vzniku a jejich působením, nikoliv tedy jejich chemickým složením. Jedná se o fyziologicky a farmakologicky významné látky [1, 5]. Mezi steroidní hormony se stejnou chemickou strukturou, z pohledu fyziologického, patří především pohlavní hormony (sexuální), které se podle dominantní biologické funkce dále dělí na androgeny (mužské/samčí hormony), estrogeny a gestageny (ženské/samčí hormony). A dále pak hormony kůry nadledvin – kortikosteroidy, které se dále dělí podle fyziologické funkce na glukokortikoidy a mineralokortikoidy.

Steroidní hormony mohou být endogenní (přirozené), které jsou produkovány systémem vnitřní sekrece nebo exogenní (syntetické), tj. chemicky identické se steroidními hormony produkovány endokrinními žlázami nebo i mírně chemicky odlišné od endogenních. V průběhu posledních šedesáti let byla nově vyvinuta (syntetizována) a následně vyráběna široká škála syntetických anabolických - androgeních steroidů (AAS), estrogenů, gestagenů a kortikosteroidů s hlavním cílem posílit jejich vybrané farmaceutické vlastnosti. Chemické změny, které byly aplikovány na většinu steroidních skeletů, zahrnují alkylace (za účelem vytvoření více orálně aktivní verze), esterifikace (prodloužení trvání účinku pro intramuskulární aplikace), acetylace (pro zvýšení absorpce) a halogenace (pro zvýšení potence) [5]. Další chemické úpravy steroidního skeletu, konkrétně pro AAS, se převážně týkají přidání dvojné vazby do polohy C1, zavedení pyrazolové skupiny na kruhu A (stanazolol), nebo odstranění methyl skupiny v poloze C19 (nortestosteron, známější jako nandrolon).

Všechny tyto změny byly použity cíleně, aby se zvýšil anabolický efekt nad androgenním efektem a zároveň se inhibovala jejich přeměna na estrogeny a zabránilo se hydrogenaci. Podobné změny byly navrženy i u glukokortikoidů s cílem pokusit se maximalizovat glukokortikoidní efekt nad mineralokortikoidním účinkem. Příkladem syntetických hormonálních preparátů jsou například: *nandrolon* (19-nortestosteron, 17β-hydroxy-estr-4-en-3-on), *boldenon* (17β-hydroxy-androst-1,4-dien-3-on), *methyltestosteron* (17β-hydroxy-17α-methylandrost-4-ene-3-one), *norclostebol* (4-chloro-17β-hydroxyestr-4-en-3-one) a další (Obrázek 3).

Éra intenzivních výzkumů steroidních hormonů začíná v 30. letech minulého století. První z nich – *estron* – byl izolován z moči v roce 1929, tedy v době, kdy stále nebyla známa chemická struktura skeletu. Krátce na to byl z moči izolován další estrogenní hormon – *estriol*. Až v roce 1935 byl z folikulární tekutiny ovarií získán konečně vlastní estrogenní hormon – *estradiol*. V roce 1927 byl podán důkaz o přítomnosti androgenu v extraktech býčích varlat, ale první krystalický androgen – *androsteron* – byl izolován z moči až v roce 1931 (z 15 000 L moči bylo připraveno pouze 15 mg krystalické látky). A až v roce 1935 byl konečně izolován z býčích varlat vlastní androgenní hormon v krystalickém stavu – *testosteron*. V roce 1928 byla prokázána účinná látka v extraktech žlutých tělísek vaječníků, vyvolávající gestační změny v děloze, a předběžně nazvána progestin. Vlastní *progesteron* byl izolován z moči těhotných žen krátce na to v roce 1929. V roce 1930 byl připraven z kůry nadledvin účinný extrakt nazvaný kortin a z něj o několik let později, v roce 1934, byly izolovány čisté korové hormony – *kortikosteroidy* [1].



Obrázek 4 - Schéma steroidogeneze. Jsou zde uvedeny enzymy podílející se na tvorbě steroidních hormonů, jejich substráty, umístění a produkty, a dále hlavní skupiny steroidních hormonů vzniklých uvedenou biosyntézou [Převzato z [86]].

2.2 Biosyntéza steroidního skeletu

Živočišné organismy (zvířata, lidé) nejsou odkázány na příjem exogenních steroidů, ale jsou schopny provádět úplnou syntézu steroidů z jednoduchých látek a v případě zdravých organismů touto biosyntézou plně pokrýt vlastní fyziologickou potřebu. Základním pochodem biogenese steroidních hormonů (steroidogeneze) je především výstavba základního steroidního skeletu, tedy přeměna molekuly „volného“ cholesterolu na pregnenolon (Obrázek 4). Cholesterol nebo pregnenolon jsou označovány za prekursory všech steroidních hormonů [6, 9]. K přeměně pregnenolonu na steroidní hormony dochází v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a v cytoplasmě. Steroidní hormony jsou produkovány gonádami (varlata/testes, vaječníky/ovaria), nadledvinami, placentou, ale také například i v mozku [7].

Vlastní biosyntéza steroidních hormonů z pregnenolonu probíhá postupně v několika krocích za nezbytné účasti řady enzymů, jak je vidět z Obrázku 4. Biosyntéza steroidních hormonů je regulována ústřední částí endokrinního systému – *hypotalamus-hypofýza*. V hypotalamu se tvoří regulační hormony, které regulují sekreci adenohipofyzárních hormonů: jsou to liberiny, které působí stimulačně,

a statiny, které působí inhibičně. Přední lalok hypofýzy – adeno-hypofýza následně produkuje tropní hormony, které řídí tvorbu steroidních hormonů. Mezi adenohipofyzární hormony (tropní hormony, tropiny) patří (adreno) kortikotropin (ACTH), který reguluje tvorbu kortikosteroidů v kůře nadledvin (glandulae suprarenales); *luteotropin* (luteinizační hormon, LH), který reguluje tvorbu androgenů v samčích varlatech a tvorbu progesteronu v corpus luteum (žluté tělísko) ve vaječnících; a folikulotropin (folikuly stimulující hormon, FSH), který reguluje růst folikulů v samičích vaječnících a tvorbu estrogenů, rovněž působí na spermatogenezi ve varlatech a dále produkci estrogenů konverzí z testosteronu [8]. Pro úplnost výkladu je potřeba dodat, že tropních hormonů produkováných adenohipofýzou je mnohem více, například: *tyreotropin*, *somatotropin*, *laktotropin*, *melanotropin*.

Navíc je známá celá řada dalších biosyntéz, například: přímá konverze progesteronu na testosteronacetát a dehydroepiandrosteronu na testosteron [9]. Nebo při nádorech varlat, vycházejících z jejich vymezených buněk, byla zjištěna další cesta biosyntézy androgenů z kortisolu a z 21- deoxykortisolu přes adrenosteron [9].

2.3 Metabolismus steroidních hormonů

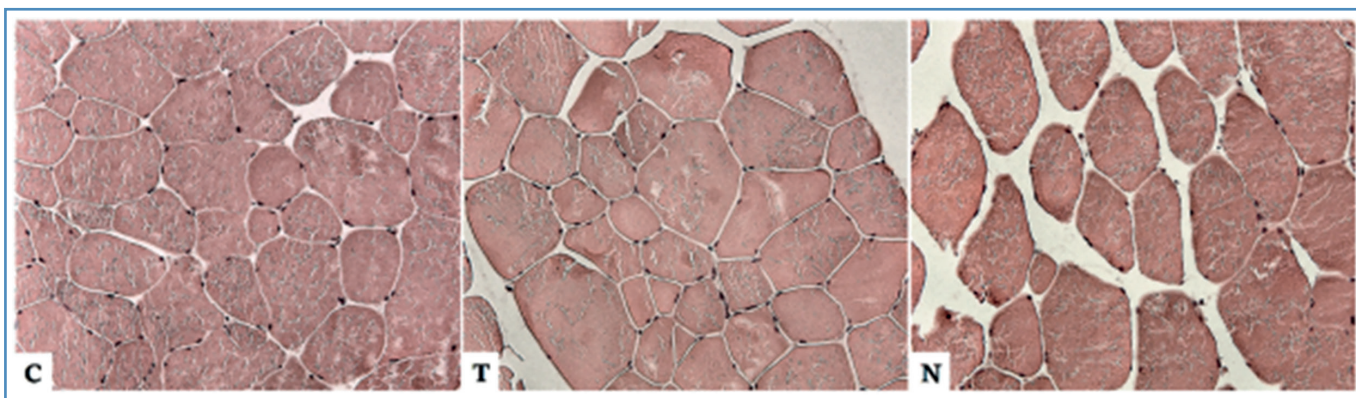
Metabolismus steroidních hormonů v organismu, ve tkáních nebo jednotlivých buňkách představuje dnes velmi rozsáhlý obor výzkumu i praktických klinických aplikací, především v humánní medicíně. Na přelomu tisíciletí byly již poznatky v oblasti metabolismů různých organických sloučenin tak rozsáhlé, že byly postupně definovány a zároveň se vyčlenily nové vědní obory – Genomika, Proteomika a jako poslední Metabolomika, obecně nazývané jako „omiky“. Základům metabolomiky a používaným technikám metabolomiky bude věnována rozsáhlá kapitola 4 se zaměřením na steroidní hormony – androgeny.

Metabolismus androgenů, estrogenů, gestagenů a kortikoidů spolu velmi úzce souvisí a vzájemně se ovlivňují. Obecně můžeme říci, že inaktivace steroidních hormonů je často spojena s oxidací, hydroxylací nebo redukcí jejich molekul, dále s eliminací dvojné vazby v kruhu A nebo s odštěpením bočního řetězce. Často se tyto pochody kombinují a steroidní hormon je převáděn za účasti několika souborů enzymů v celou řadu méně aktivních až neaktivních steroidů a konjugátů. Konjugace probíhá především na uhlíku C3 s kyselinou glukuronovou nebo s kyselinou sírovou za tvorby 3-glukuronidu nebo 3-sulfátu, čímž dochází ke zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě oproti původní téměř nerozpustnosti, a tím snáze se vyloučí z organismu především močí [1, 3, 4]. Ke konjugaci dochází z převážné části v játrech za účasti souboru jaterních enzymů, méně pak v ledvinách. Přibližně 70 % konjugovaných steroidů se vyloučí močí, 20 % ve stolici a zbytek kůže [7]. Avšak faktory řídící míru anabolismu a katabolismu steroidních hormonů v zvířecích organismech jsou dodnes málo známe a málo popsane.

Celková rychlost absorpce aplikované dávky hormonu může být ovlivňována řadou faktorů, např. technikou dávkování, velikostí dávky, nebo přítomností sekundárních anabolik v dávce. Přítomnost a koncentrace reziduí hormonálně účinných látek v živočišných tkáních závisí na stupni jejich metabolismu a vylučování. Rezidua se běžně nacházejí ve svalích, tuku, ledvinách, játrech a v mléku, stejně tak ale v tělních tekutinách (krev, moč, žluč) a výkalech. Obecně lze říci, že koncentrace reziduí má tendenci být vyšší v tělních tekutinách a výkalech, než ve tkáních [1, 7].

2.4 Biologické účinky steroidních hormonů

Steroidní hormony nejsou ukládány v endokrinních žlázách, ale jakmile je dokončena jejich steroidogenese, jsou okamžitě secernovány do krevního oběhu a transportovány k cílovým tkáním. Steroidní hormony projevují své biologické účinky prostřednictvím intracelulárního nukleárního receptoru. Zjednodušeně řečeno, androgeny, estrogeny, glukokortikoidy díky svému lipofilnímu charakteru snadno procházejí buněčnou membránou a vstupují do cytoplazmy, kde se váží na intracelulární receptory, které jsou buď v cytoplasmě, nebo v jádře cílových buněk. Komplex hormon-receptor je dopravován k jádru buňky a zde se váže na hormon-responzivní element, což je specifická sekvence DNA, čímž dojde k aktivaci nebo represi genů. V případě aktivace genů dochází následně k transkripci genetické informace na mRNA, čímž je aktivována proteosyntéza a začne vznikat specifický protein, který opět indukuje určité fyziologické efekty s příslušnou biologickou odpovědí [1, 6, 8]. U anabolických steroidů je to primárně aktivace proteosyntézy a následná produkce specifických proteinů ve svalových tkáních a z toho plynoucí stimulace nárůstu svalové hmoty – anabolický efekt. Všechny publikované studie se shodují na tom, že anabolické steroidy zvyšují svalovou hypertrofii a syntézu bílkovin, metabolizují tukové zásoby a zesilují odezvu v případě, kdy jsou AAS kombinovány s fyzickou silovou aktivitou. Obecně tedy aplikace steroidů vede ke zvýšení rychlosti růstu netukové hmoty. Na histologické úrovni se ve svalu zvětšuje průměr a plocha svalových vláken a dochází k výraznému nárůstu podílu rychlých nízkooxidačních vláken [32–34]. Zvýšení tělesné hmotnosti je umocněno zadržováním dusíku a čistým přírůstkem bílkovin. Anabolické steroidy proto zvyšují zadržování dusíku v těle. Naopak vysoké dávky AAS mohou způsobit degenerativní změny ve svalu, které mohou vést ke ztrátě funkce svalů a jejich trvalému poškození, jako je rozpad svalových vláken, buněčná infiltrace, vakuolizace, otoky a poškození mitochondrií [106]. Dobrým příkladem anabolického efektu mohou být naše výsledky z pokusů na prasatech, které souhlasí s výsledky výše zmíněných studií. Po aplikaci testosteronu a nandrolonu dekanolátu došlo ve svalovině prasat ke změnám v podobě zvětšení průměru a plochy svalových vláken a zvýšeného množství vaziva (endomysia) mezi svalovými vlákny (Obr. 5).



Obrazek 5 - Histologický řez svalovými vlákny prasete z kontrolní skupiny bez anabolických steroidů (C), ze skupiny po podání testosteronu (T), a ze skupiny po podání nandrolonu (N). Po aplikaci AAS došlo ke zvětšení průměru a plochy svalových vláken a nárůstu množství endomysia mezi svalovými vlákny ve svalu prasat. U nandrolonu byl účinek steroidů ještě silnější.

Mnohem méně je známý účinek anabolických steroidů na mužský reprodukční systém. AAS ovlivňují genitálie, zejména u mužů, zcela jiným způsobem než svaly. Četné studie ukázaly, že AAS nezpůsobují jejich růst, ale naopak zde mají silný toxický a degenerativní dopad [35–39]. Aplikace anabolik má vliv především na varlata, kde způsobuje poruchy spermatogeneze, degeneraci epitelu a celkovou dezorganizaci anatomické a histologické struktury. Membrány semenotvorných tubulů jsou deformovány, vrstvy zárodečného epitelu uvnitř tubulů jsou sníženy stejně jako počet a pohyblivost spermií [37]. Intersticiální prostory se rozšiřují, zvyšuje se počet nekrotických Leydigových buněk a celkový anabolický příjem má inhibiční účinek na osu hypotalamus-hypofýza-varlata, což vede ke snížení přirozené produkce endogenního testosteronu. Dochází také k poškození dalších gonád a zvětšení prostaty [38,39]. Dá se říci, že v konečném důsledku mají AAS podobné účinky jako chemická kastrace. Kromě výše uvedených tkání, ve kterých je projev AAS nejintenzivněji studován, ovlivňují anabolické steroidy i další živočišné tkáně v těle. Většinou se jedná o výrazné degenerativní změny a dezorganizaci histologické struktury. Nejvíce jsou popsány negativní vlivy na srdeční sval, ledviny, játra a kosti. Více informací o vlivu AAS na živočišné tkáně je uvedeno například v přehledovém článku autorů Skoupá K. et al. (2022) [65].

V literatuře jsou uváděny i další způsoby projevů účinků anabolických steroidů, jako například přímé ovlivnění centrální nervové soustavy CNS [10]. Vzhledem k tomu, že steroidy obecně zasahují do exprese genů a následné transkripce, nastupují jejich účinky ve srovnání s ostatními hormony pomaleji, ale zato déle přetrvávají [10, 11].

Základní přehled převažujících fyziologických účinků steroidních hormonů [7, 8]:

- **androgeny** – hlavní představitel: testosteron, zajišťují vývoj mužského typu genitálu u plodu, v pubertě u mužů navozují především růst reprodukční tkáně (penisu, varlat, nadvarlat semenných váčků a prostaty – androgenní účinek), zajišťují nerušený průběh spermatogeneze, zároveň působí na vývoj sekundárních pohlavních znaků (růst vlasů, chlupů, vousů) a rozšíření hrtanu, který prohlubuje

výšku hlasu jedince (maskulinizační efekt), a významně ovlivňují syntézu proteinů, která vede k vytváření většího objemu svalové hmoty (anabolický účinek). Testosteron dále zvyšuje objem kostní hmoty a ovlivňuje ukládání kalcia a ukončení růstu kostí, stimuluje produkci erythropoetinu a tím i erytropoézu, spolu s inhibinem ovlivňuje přes negativní zpětnou vazbu produkci gonadoliberinu a gonadotropinu, a udržuje a zvyšuje libido sexualis.

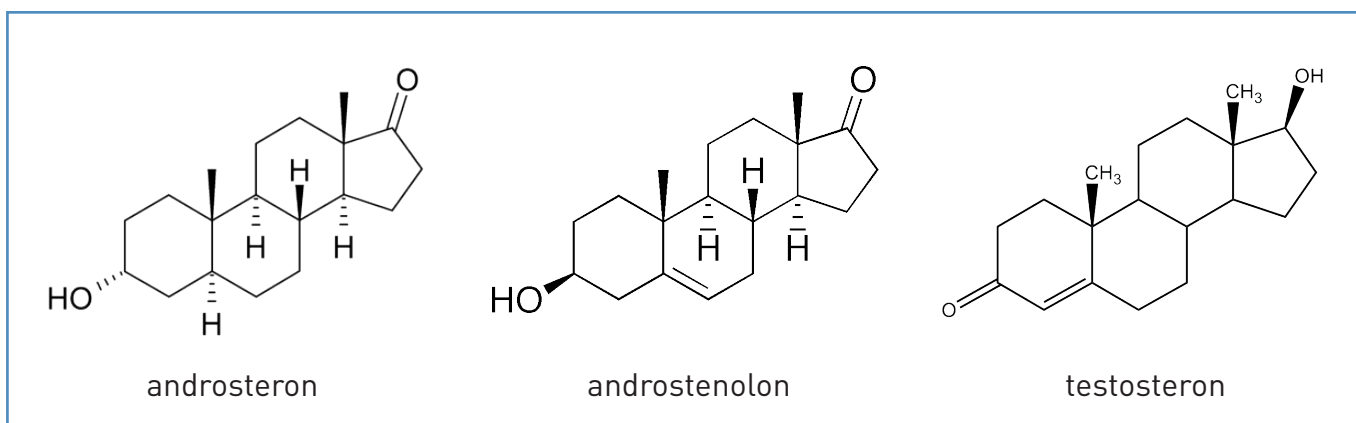
- **estrogeny** – hlavní představitel: estradiol, podporují vývoj a prokrvování samičích pohlavních orgánů (proliferace děložní sliznice, proliferace epitelu vejcovodů), způsobují indukci projevů říje, dále pak stimulaci epidermálních mitóz, zvýšení produkce protilátek (protektivní účinky), inhibici supresorových T-buněk a spolu s gestageny se podílejí na regulaci menstruačního cyklu.
- **gestageny** – hlavní představitel: progesteron, hlavním účinkem je příprava na těhotenství a jeho udržení, kdy v děloze odpovídají za progestační změny endometria, snižují hustotu estrogenních receptorů v endometriu, snižují dráždivost myometria a jeho citlivost k působení oxytocinu, odpovídají za cyklické změny děložního krčku, stimuluje vývoj mléčné žlázy, podporují sekreci mléčné žlázy během laktace, stimuluje respirační „centrum“, zabraňují ovulaci tím, že inhibují sekreci LH a potencují inhibiční účinek estrogenů, a stimuluje motilitu spermií v pohlavním systému samice. Dále působí imunosupresivně, mají částečnou glukokortikoidní aktivitu, mohou mít v závislosti na dávce i androgenní nebo antiandrogenní účinek, váží se totiž na androgenní receptory.
- **glukokortikoidy** – hlavní představitel: kortizol a kortikosteron, mají velmi široké působení, hlavní účinek spočívá v působení na metabolismus sacharidů (glukotropní aktivita), lipidů (lipolytický účinek), a dále proteinů (katabolický, antianabolický účinek) kdy zvyšují odbourávání proteinů a snižují jejich syntézu.
- **mineralokortikoidy** – hlavní představitel: aldosteron, jejich hlavní efekt spočívá v regulaci rovnováhy elektrolytů (homeostáza elektrolytu), to je poměru sodíku a draslíku i distribuci vody v tkáních, tedy stimuluje tubulární resorpci sodíku a zvyšují exkreci draslíku močí, s retencí natria je spojena i retence vody a exkrece kalia je doprovázena vylučováním protonů (H^+).

3. ANDROGENY

3.1. Obecná charakteristika androgenů

Androgeny se tvoří především v mužských pohlavních žlázách (varlatech), v menší míře i v ženských pohlavních žlázách (vaječnících), a v menší míře u obou pohlaví v nadledvinách v korové interrenální tkáni [1]. Působení androgenů není soustředěno pouze na pohlavní orgány a rozmnožování, ale ovlivňují i druhotné pohlavní znaky a ostatní cílové tkáně organismu, především svalstvo a kosti, kde podporují syntézu proteinů. Tento jejich **anabolický účinek** je významným faktorem, a proto bývají androgeny někdy v literatuře označovány také jako anabolické **androgenní steroidy – AAS**, zkráceně **anabolické steroidy** [7]. Mezi androgeny patří především *androsteron* (3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-on), *androstenolon* známější jako *dehydroepiandrosteron* (3 β -hydroxy-5-androsten-17-on, DHEA), a *testosteron* (17 β -hydroxy-androst-4-en-3-one) (Obrázek 6).

První androgen androsteron izoloval z moči Butenandt v r. 1931. V r. 1934 byl androsteron syntetizován L. Ružičkou (narodil se v dnešním Chorvatsku, měste Vukovar, ale měl české rodiče, zdroj Wikipedia). Z moči byl izolován i další androgen androstenolon (dehydroepiandrosteron). Hlavní androgen, testosteron, byl izolován r. 1935 Laquerem, který ze 100 kg býčích varlat získal pouze 10 mg krystalického testosteronu, jehož strukturu vyřešili krátce nato pomocí parciální syntézy Butenandt a Ružička [1, 5]. Další androgeny byly izolovány z moči nebo tkání různých orgánů. Jde o metabolity testosteronu nebo meziproducty biosyntézy steroidů. První syntetický androgen, 17 β – *methyltestosteron*, připravil parciální syntézou Ružička v roce 1935. 17 β – *methyltestosteron* po orálním podání svou aktivitou významně předčil dosud známé androgenní hormony a je možno ho dnes označit za první AAS. Následně bylo pracováno na syntézách dalších různých chemických obdůb a analogů AAS [1].



Obrázek 6 – Hlavní představitelé androgenů.

3.2 Testosteron

Nejdůležitějším přirozeným samčím pohlavním hormonem z androgenů je testosteron, který se tvoří primárně v Leydigových buňkách nacházejících se v intersticiální (vmezeřené) tkáni ve varlatech (testes) [7]. Biosyntéza testosteronu v buňkách je přímo řízená adenohipofyzárním gonadotropním luteinizačním hormonem (LH) a touto biosyntézou jsou produkovány dva základní izomery testosteronu: 17 β -testosteron, který je biologicky významně více aktivní, a 17 α -testosteron (epitestosteron), který téměř nevykazuje biologickou aktivitu.

Vytvořený testosteron je z Leydigových buněk následně secernován do krevního oběhu a krví je transportován k vlastním receptorům v cílových orgánech. Testosteron se v krvi (plazmě) vyskytuje jako volný nebo vázaný. Volného testosteronu je v plazmě přibližně 2 % z celkového množství a je biologicky aktivní. Vázaný testosteron, přibližně 98 % z celkového množství, se prioritně váže na specifický protein beta-globulin, který se nazývá pohlavní hormon vázající globulin (sex hormone-binding globulin / SHBG), a z menší části se váže také na albumin (asi 3 %). [7, 10, 11, 12]. Výhodou vázaného testosteronu je, že vazbou s SHBG je chráněn proti inaktivaci v játrech, a tím slouží organismu jako zásobní hormon.

3.3. Metabolismus testosteronu

Metabolismus testosteronu ve tkáních nebo jednotlivých buňkách dnes představuje, stejně tak jako ostatních steroidních hormonů v organismu, velmi rozsáhlý výzkum v řadě vědních oborů, především však v humánní medicíně, toxikologii, farmakologii a souhrnně v „mladém“ vědním oboru - metabolomice.

Metabolická inaktivace a degradace testosteronu v lidském těle probíhá v hlavní míře v játrech a v menší míře i v ledvinách. Tyto mechanismy inaktivace a degradace testosteronu probíhají za účasti specifických enzymů, které se katalytickým působením podílejí na dílčích přeměnách jeho steroidní molekuly [12]. Inaktivace a degradace testosteronu zahrnuje celý komplex vzájemně se ovlivňujících a působících chemických reakcí a přeměn (Obrázek 9), např.: přidání dvou vodíků (eliminace) na dvojnou vazbu v kruhu A nebo na ketonovou skupinu; odstranění atomů vodíku (oxidace) z hydroxylové skupiny; nebo přidání hydroxylové skupiny (hydroxylace) na vazebné uhlíky ve steroidní molekule. Tyto chemické přeměny bývají souhrnně označovány jako metabolická fáze I., kdy dochází ke konjugaci molekuly testosteronu reakcí s kyselinou sírovou nebo kyselinou glukuronovou s hydroxylovou skupinou nebo ketoskupinou na steroidním skeletu, a vytvoření testosteron sulfátů a glukuronidů a to především na uhlíku C3. Konjugace a eliminace molekuly testosteronu se někdy v literatuře označuje jako metabolická fáze II. Všechny tyto pochody se kombinují a testosteron je převáděn za účasti specifických souborů enzymů, například jaterních enzymů, v celou řadu méně aktivních až neaktivních steroidů a konjugátů. Konjugáty, metabolity testosteronu (sulfáty a glukuronidy), jsou dobře rozpustné ve vodném prostředí a proto jsou snadno vylučovány především močí z organismu.

V některých cílových tkáních (kůže, sval, játra) a v závislosti na přítomnosti specifických enzymů, například 5 α -reduktasy, se testosteron může následně redukovat na 5 α -dihydrotestosteron (DHT) nebo se za přítomnosti enzymu aromatázy může testosteron částečně konvertovat (aromatizace A kruhu) v játrech na estradiol (Obrázek 4). Aktivní metabolit DHT následně vykazuje významně vyšší androgenní aktivitu než původní testosteron.

V metabolomice spojené s humánní medicínou jsou dnes procesy probíhající v specifických metabolických drahách podrobně zkoumány a velmi exaktně popsány, publikovány a je možno je i pro konkrétní látky rychle vyhledat v metabolomických databázích publikovaných na internetu. Jednou z nejvyužívanějších databází je například databáze METLIN, kterou zabezpečuje a servisuje The Scripps Research Institute, San Diego, USA [13]. Na rozdíl od humánní oblasti jsou metabolomické procesy, například pro testosteron, mnohem méně prostudovány a popsány ve veterinární medicíně. Nicméně se předpokládá, že metabolomické dráhy jsou u vyšších obratlovců (skot, prase, ovce, kůň) přibližně stejné jako u lidí a rozdílné jsou především koncentrace hormonů a z nich vznikajících metabolitů v různých matricích a to především v důsledku odlišných enzymových systémů, které se podílejí na metabolismu steroidů obecně. V pokusech in vivo bylo zjištěno, že po implantaci tkáně testes do mesenteria jater nastává u pokusných zvířat rychlá atrofie sekundárních pohlavních orgánů, kdežto po implantaci do ledvin nebyly tyto změny pozorovány. Destrukce testosteronu byla zjištěna také přímo při inkubaci s rozmělněnými játry pokusných zvířat, zvláště pak za přítomnosti kyslíku a analyzované metabolity odpovídaly lidským metabolitům [1, 12].

Zajímavá je situace u nejznámějšího AAS nandrolonu (19-nortestosteronu), který byl léta považován za výhradně syntetický, exogenní anabolický steroid. Důkaz jeho endogenního původu jako sekundárního metabolitu testosteronu byl prvně podán ve veterinární medicíně, kdy byl v roce 1980 prvně izolován jako přirozený hormon u hřebců [14], a následně pak u kanečků v roce 1988 [15]. Následně byl potvrzen jeho přirozený výskyt i v řadě dalších vědeckých studií u dalších potravinových zvířat a to ve spojení se specifickými podmínkami jeho možného vzniku, například fyziologického stresu [16]. V humánní medicíně byl prokázán jeho přirozený výskyt až následně a byl publikován autory Dehennin et al. [17]. Obdobná situace je i u dalšího významného anabolického steroidu boldenonu.

3.4. Přirozený výskyt testosteronu v živočišném materiálu

Pro všechny steroidy cirkulující v plazmě a tkáních (nevztahuje se však na játra a ledviny) platí obecné pravidlo, že obsahují relativně vysoké koncentrace nezměněných "mateřských" steroidů, zatímco exkreční produkty, jako je moč, žluč nebo výkaly, obsahují relativně vyšší koncentrace metabolitů.

Endogenní testosteron u skotu

Testosteron a příbuzné steroidy jako epitestosteron, androstendion a DHEA, jsou všudypřítomné mezi oběma pohlavími všech druhů savců, takže rozdíly mezi různými skupinami zvířat jsou často čistě v koncentracích obsahů jednotlivých steroidů. Z publikovaných údajů vyplývá (přibližně 300 publikovaných vědeckých článků pro různá zvířata), že podle přibližného pořadí absolutních koncentrací 17 β -testosteronu u skotu v různých matricích může být sestavena řada od nejvyšší po nejnižší koncentraci: srst > moč $\approx$ tuk $\approx$ výkaly $\approx$ ledviny > plasma > játra $\approx$ sval. Pro 17 α izomer testosteronu, epitestosteron, je pořadí následovné: moč > výkaly > plasma > sval > srst (pro obsah v tuku, játrech nebo ledvinách nebyla nalezena žádná data). Z hlediska absolutních hodnot, testosteron a epitestosteron byly přítomny ve stejných koncentracích ve svalu a plazmě, přičemž koncentrace testosteronu byla přibližně o řád (10 x) vyšší ve chlupcích a srsti, epitestosteron byl pak přibližně o řád (10 x) vyšší v moči a stolici.

Z aktuální literární rešerše pro tuto práci bylo zjištěno, že průměrné rozsahy plazmové/sérové koncentrace 17 β -testosteronu jsou přibližně 10 x vyšší u zdravých dospělých býků ve srovnání s krávami (rešerší nebyla nalezena žádná data pro voly). Rozmezí průměrných koncentrací testosteronu v moči byly přibližně třikrát vyšší u zdravých a zralých samců vzhledem k samicím (nebyla nalezena žádná data pro voly). Z rozsahů průměrných koncentrací testosteronu ve svalu bylo zjištěno, že koncentrace je přibližně 10 x vyšší u dospělých samců ve srovnání se samicemi nebo voly, i když epitestosteron měl podobné koncentrační hladiny u býků a volů. Pro rozsahy průměrných koncentrací testosteronu v játrech

Tabulka 1 – Rozhodovací limity pro 17 β -testosteron v séru skotu.

Pohlaví/věk zvířete	Rozhodovací limit pro sérum (ng ml ⁻¹)
Samice (ne gravidní)	0,5
Samec (< 6 měsíců)	10
Samec (> 6 měsíců)	30

Poznámka: Uvedené koncentrační limity obsahu testosteronu v plazmě skotu byly plně převedeny do doporučení evropských komunitních laboratoří CRL: *EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for Specific Pharmacologically Active Substances in Specific Animal Matrices (2022)* [71].

a ledvinách byly zjištěny přibližně 10 x vyšší hladiny u dospělých samců ve srovnání se samicemi (rešerší nebyly nalezeny žádné údaje pro androgeny u volů nebo epitestosteronu u obou pohlaví). Pro rozsahy průměrných koncentrací testosteronu v chlupech byly zjištěny přibližně třikrát vyšší hladiny u zralých dospělých samců oproti samicím a volům (nejsou publikovány údaje pro epitestosteron).

Řada studií hodnotila i vliv věku na koncentraci testosteronu v plazmě/séru u samců a to v různém stáří jedinců. Různé experimentální podmínky, jako například příprava matrice určené k analýze, odlišnost podmínek, při kterých byla zvířata studována, a rovněž nedostatečná standardizace při vykazování nejistoty měření, však bohužel neumožnily korektní srovnání. Výsledky z nejzajímavějších studií jsou shrnuty níže.

Autoři E. T. Bagu et al. [18] prokázali, že průměrné koncentrace testosteronu v séru u 4 týdnů starých býčků byly kolem 0,1 ng ml⁻¹. Koncentrace vzrostla na 1,0 ng ml⁻¹ okolo 20. týdne, klesla zpět na 0,4 ng ml⁻¹ v 28. týdnu, a znovu vzrostla z těchto nízkých hodnot na 1,1 ng ml⁻¹ v 32. týdnu života. Autoři této studie také poukázali na další studie, které rovněž uváděly významný pokles v koncentraci testosteronu mezi 20. a 32. týdnem věku býčků.

Další studie [19] uvádí, že průměrné koncentrace testosteronu v séru býčků byly 1,8 ng ml⁻¹ ve 26. týdnu věku, dále se zvýšily na 8 ng ml⁻¹ ve 43. týdnu, a následně klesly na 6,5 ng ml⁻¹ po 52. týdnu. Ve stejné studii je dále uvedena koncentrace androstendionu v séru býčků, která byla 0,45 ng ml⁻¹ v 17. týdnu a klesla na 0,25 ng ml⁻¹ v 52. týdnu.

Naproti tomu, studie [20] prokázala, že zatímco maximální koncentrace testosteronu v plazmě dospělých býků (ve studii není přesně uveden věk) byly 5,8 a 0,97 ng ml⁻¹ pro nekonjugovaný a konjugovaný testosteron v uvedeném pořadí; pro epitestosteron naopak byly zjištěny koncentrace s hodnotami 0,97 a 1,8 ng ml⁻¹ pro nekonjugovaný a konjugovaný v daném pořadí.

Nejvíce informací v jediné studii o vlivu věku, byly publikovány autory C. J. M. Arts et al. [21]. Medián plazmatické koncentrace testosteronu u 15 týdnů starých býčků byl 0,8 ng ml⁻¹ a následně se zvýšil na 1,3 ng ml⁻¹ v 28. týdnu. Koncentrace epitestosteronu vyjádřená mediánem se však výrazně snížila ze 7,1 ng ml⁻¹ v 15. týdnu, na 0,8 ng ml⁻¹ v 28. týdnu. Stejná studie uvádí i medián koncentrace testosteronu v moči, kdy z hodnoty 1,0 ng ml⁻¹ v 15. týdnu došlo k nárůstu na 3,7 ng ml⁻¹ v 28. týdnu. Tito autoři dále uvádějí, že koncentrace epitestosteronu v moči se nemění s věkem a pohybovala se na úrovni 40 a 41 ng ml⁻¹ v 15. a 28. týdnu věku.

Relativně méně studií bylo věnováno vlivu věku na koncentraci testosteronu u krav. Nakada et al. [22] ve své práci uvedli, že koncentrace testosteronu v plazmě jalovic ihned po narození byla 0,075 ng ml⁻¹, pak se ještě snížila a pohybovala se v rozmezí hodnot 0,015 a 0,021 ng ml⁻¹ v období mezi narozením a pubertou. Průměrná doba (+/- směrodatná chyba) věku jalovic do období puberty byla 43,3 (+/-1,3) týdnů.

Již citovaná studie [21] uvedla také hladiny koncentrací testosteronu v závislosti na věku pro samice. Medián plazmatické koncentrace testosteronu u samic byl nižší než LOD (limit detekce použité analytické metody v publikaci) a to v 15. i 28. týdnu věku, zatímco medián plazmatického epitestosteronu byl menší než LOD v 15. týdnu, a poté se zvýšil na 0,2 ng ml⁻¹ v 28. týdnu. Medián koncentrace testosteronu v moči v 15. týdnu byl nižší než LOD a následně se zvýšil na 1,1 ng ml⁻¹ v 28. týdnu. Medián koncentrace epitestosteronu v moči v 15. a 28. týdnu byl 6 a 17 ng ml⁻¹, v tomto pořadí.

Jedna z významných vědeckých prací byla studie autorů H. Dobson et al. [23], která uvádí, že koncentrace testosteronu v plazmě byla výjimečně vysoká po velmi krátkou dobu v průběhu pozdní luteální fáze fyziologického samičího estrálního cyklu a to vyšší než 1,8 ng ml⁻¹. Všechny ostatní rozsahy koncentrací testosteronu zjištěné a uvedené těmito autory jsou v souladu s ostatními studiemi, takže pokud se jedná o skutečný, vědecky ověřitelný jev, mohlo by to mít vážný negativní vliv na platnost stávajícího rozhodovacího limitu EU (viz. Tabulka 1) pro krávy.

Žádné studie však neporovnávaly koncentrace testosteronu eventuálně souvisejících prekurzorů/metabolitů u podobných plemen za různých podmínek, např.: způsob ustájení, různé lokality a země, různá krmiva a různá denní dávka krmiva, denní či sezónní vlivy na koncentrace testosteronu nebo související prekurzory/metabolity.

R. J. Heitzman v roce 1994 navrhl a doporučil pro koncentraci testosteronu v plazmě skotu na základě pohlaví, věku a případné gravidity rozhodovací limity (Tabulka 1) [24].

Endogenní testosteron u prasat

V současné odborné literatuře se obecně uvádí, že rozsahy průměrné plazmatické/sérové koncentrace přirozeného testosteronu u kanců jsou 7x až 50x vyšší, než ty pozorované u kastrovaných kanečků, zatímco koncentrace u prasnic/prasnic byly zjištěny asi pětkrát nižší než u kanců. Detailnější poznatky jsou uvedeny v několika následujících vědeckých studiích.

Nejrozsáhlejší studie závislosti koncentrací steroidů na věku byla provedena v plazmě kanců (Yorkshirské plemeno) autory F. Schwarzenberger et al. v roce 1993 [25]. Před tím, než budou popsány výsledky, je důležité upozornit na to, že koncentrace nahlášené v této studii se zdají být mnohem vyšší, než uvádějí jiní autoři. A dále tito autoři uvedli, že steroidy byly téměř výhradně přítomny v plazmě ve formě sulfátových konjugátů. Androstendion a DHEA-sulfát byly měřeny přímo, zatímco jiné steroidy byly měřeny po extrakci a konjugáty byly rozštěpeny kyselinou sírovou. Koncentrace testosteronu po narození byla asi 1 ng ml^{-1} pro obě formy, volný i konjugovaný, pak dosáhla přibližně 3 ng ml^{-1} až do čtvrtého měsíce věku. Koncentrace obou forem pak klesla zpět na přibližně 1 ng ml^{-1} v pátém měsíci, následně se opět zvýšila a to v případě volného testosteronu na asi 3 ng ml^{-1} v šestém měsíci a v případě, že se jednalo o konjugát testosteron-sulfátu na přibližně 6 ng ml^{-1} v sedmém měsíci věku. Koncentrace volného a sulfátovaného testosteronu se mírně snížila po sedmém měsíci věku. Koncentrace

volného androstenedionu, kopírovaly testosteron tak, že koncentrace po porodu byla asi 6 ng ml^{-1} , zvýšila se na 24 ng ml^{-1} v průběhu jednoho měsíce, a pak klesla na přibližně 6 ng ml^{-1} po dobu pěti měsíců. Koncentrace se pak opět zvýšila na asi 18 ng ml^{-1} v šestém měsíci, a poté se postupně opět snižovala přibližně na úroveň 9 ng ml^{-1} v osmém měsíci. Pro DHEA-sulfát (autoři uvádějí, že $< 10 \%$ celkové koncentrace tohoto steroidu bylo přítomno v nekonjugované formě) byl průběh změn koncentrací opět podobný trendu testosteronu tak, že koncentrace po porodu byla asi 3 ng ml^{-1} , po jednom měsíci se zvýšila na přibližně 80 ng ml^{-1} , a následně se snížila na přibližně 15 ng ml^{-1} v pátém měsíci. V šestém měsíci se zvýšila na přibližně 80 ng ml^{-1} , aby pak následně klesla na asi 60 ng ml^{-1} v osmém měsíci věku. Pro 5α -androstandiol-sulfát (autoři uvádějí, že $< 10 \%$ celkové koncentrace tohoto steroidu bylo přítomno v nekonjugované formě) byl průběh změn koncentrací opět podobný testosteronu; koncentrace po porodu byla asi 3 ng ml^{-1} , zvýšila se na přibližně 12 ng ml^{-1} na konci prvního měsíce, a poté klesla na přibližně $3 \text{ až } 6 \text{ ng ml}^{-1}$ v průběhu pěti měsíců. Koncentrace se opětovně zvýšila v sedmém měsíci na přibližně 35 ng ml^{-1} a následoval jen velmi mírný pokles do konce osmého měsíce. V závěru studie bylo řečeno, že koncentrace vybraných steroidů vyvrcholila nejdříve za jeden měsíc po porodu, poté klesala po dobu přibližně pěti následujících měsíců a znovu rostla v šestém až osmém měsíci věku (u některých mírně klesá po sedmém měsíci). Pořadí absolutních hodnot stanovených koncentrací steroidů v plazmě kanců bylo uvedeno následovně: DHEA sulfát $>$ 5α -androstan-3 β ,17 β -diol-sulfát $>$ androstendion $>$ testosteron sulfát.

Autoři C. S. Park et al. [26] studovali změny koncentrace testosteronu v séru kanců plemen Duroc oproti Yorkshire (Large White) žijících v severní části země Jižní Korea v průběhu roku - jaro, léto, podzim a zima. Průměrná koncentrace testosteronu u kanců plemene Duroc během jara, léta, podzimu a zimy byla $3,1$; $0,73$; $1,3$ a $1,4 \text{ ng ml}^{-1}$ v tomto pořadí, zatímco u plemene Yorkshire byla průměrná koncentrace $5,1$; $2,6$; $2,5$ a $2,6 \text{ ng ml}^{-1}$. Koncentrace testosteronu u kanců plemene Yorkshire byly významně vyšší ($p < 0,05$) než u kanců plemene Duroc

Tabulka 2 – Publikované endogenní koncentrace 17B – testosteronu v plazmě prasat, kanečků.

Plemeno	stáří (1 – 20 týdnů) ng ml ⁻¹	stáří (32 – 48 týdnů) ng ml ⁻¹	literární zdroj
Yorkshire	1 – 3	1 – 3	[25]
Duroc	-	0,73 – 3,1	[26]
Yorkshire	-	2,5 – 5,1	[26]
Meishan	1 – 2	5,5 – 7	[27]
Bílé hybridní	-	4,0	[27]
Duroc	-	2,8	[28]

ve všech fázích roku. Koncentrace testosteronu byly vyšší u všech plemen na jaře v porovnání se zbytkem roku ($p < 0,05$).

Autoři S. A. Mc Cord et al. [27] studovali koncentrace testosteronu v plazmě novorozených kanců plemen Meishan a Bílé hybridní. Koncentrace testosteronu, s hodnotami v rozmezí od asi 1 do 2 ng ml⁻¹ po narození, nebyly významně odlišné ($p < 0,05$) u Meishan a Bílých hybridních kanců. Nicméně koncentrace testosteronu u obou plemen vrcholila 14 dnů po porodu na koncentraci kolem 5,5 a 7 ng ml⁻¹ u Meishan a Bílé kompozitní. Koncentrace pak klesla na úroveň 4 ng ml⁻¹ u obou plemen přibližně od 25. dne po porodu, déle však již nebyla sledována.

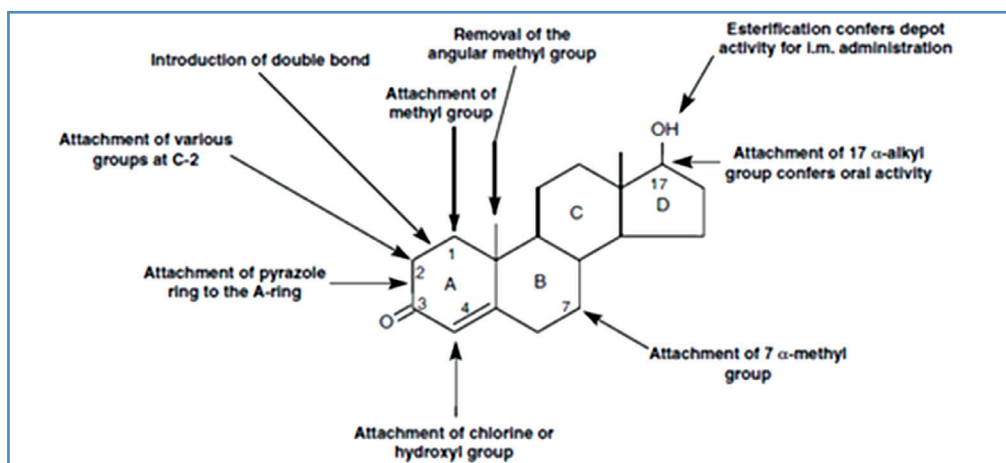
S. Walker et al. [28] studovali plazmatické koncentrace testosteronu kanců plemene Duroc, kteří byli předmětem řízeného výběru na základě vysoké koncentrace testosteronu po dobu více než 10 generací a to oproti kontrolní skupině, která nebyla takto selektována. Průměrná koncentrace testosteronu u dospělých kanců vybraných po 10-ti generacích byla 49 ng ml⁻¹ a byla významně vyšší ($p < 0,01$) než kontrolní skupina dospělých kanců s průměrnou koncentrací testosteronu 2,8 ng ml⁻¹.

Žádné další informace o vlivu gravidity, stravy, podmínkách chovu, ustájení nebo zeměpisných faktorech na koncentrace testosteronu nebyly nalezeny. Výše uvedená zjištění v této kapitole pro testosteron v plazmě prasat (kanců) jsou pro větší přehlednost a snadnější orientaci uvedena v následující tabulce (Tabulka 2).

3.5 Vztah mezi chemickou strukturou testosteronu a farmakologickými účinky [5,10,12]

Testosteron je od samého počátku, kdy byl získán parciální syntézou, první syntetický preparát (L. Ružička, 1935) a je předmětem velkého zájmu organických chemiků s cílem modifikovat a upravit jeho chemickou strukturu tak, aby jeho biologické účinky byly efektivnější. Samotný testosteron, který má polární skupiny v pořadí 3-on-17-ol, je aktivnější než ostatní androgeny s opačným uspořádáním 3-ol-17-on (androsteron, androstenolon). Velmi důležitá je také konfigurace hydroxylových skupin na uhlíku C17 a u derivátů na uhlíku C3. Isomer testosteronu s hydroxylovou skupinou v poloze 17B je významně aktivnější než jeho 17α-epimer (epitestosteron), naopak deriváty s hydroxylovou skupinou v poloze 3α jsou účinnější než v poloze 3B. Samotný testosteron je poměrně málo perorálně účinný, ale jeho alkylací na uhlíku C17 byl připraven perorálně vysoce androgenně účinný 17α-methyltestosteron a perorální androgenní aktivita byla ještě zvýšena substitucí další methylovou skupinou do polohy 7B, například u kalusteronu. Naopak u stejné sloučeniny, bolasteronu s methylovou skupinou v poloze 7α, převažuje značně anabolická aktivita.

Prolongace (prodloužení) účinku testosteronu se dosahuje jeho *esterifikací* hydroxylové skupiny nižšími i vyššími mastnými kyselinami, buď samostatnými nebo substituovanými, např. kyselinou propionovou, isomáselnou, enanthovou, cyklopentylpropionovou, dekanovou, undekanovou atd. Farmakokinetika působení esterů testosteronu je pak závislá na rozpustnosti esterů v lipidech a především rychlosti jejich hydrolýzy. Estery testosteronu se aplikují výhradně injekčně a to intramuskulárně (*i.m.*) nebo intravenózně (*i.v.*). Například methyltestosteron se však aplikuje především perorálně (*p.o.*) a to u mužů k substituční terapii androgeny, při sterilitě, hypogenitalismu, mužském klimakteriu apod.; u žen pak při vybraných případech dysfunkčního děložního krvácení, v určitých případech také v případě metastázujících rakoviny mléčné žlázy a těžkých postmenopauzálních osteoporózách. Estery testosteronu jsou indikovány také u chorobných stavů vyžadujících podporu anabolismu tělesných bílkovin (aplastická anémie) [5].



Obrázek 7 – Syntetické možnosti obměny molekuly testosteronu na AAS (převzato z [10]).

Specifickou skupinou látek odvozených od testosteronu jsou syntetické **anabolické androgenní steroidy – AAS** (anabolické steroidy, anabolika, atd.), které jsou odvozeny převážně od 17 α -methyltestosteronu, 19-nortestosteronu a dihydrotestosteronu. Menší chemické obměny jejich molekuly (Obrázek 7) mají za následek změnu androgenního účinku, který vede k vystupňování anabolické aktivity na úkor androgenní, a to až o několik řádů. AAS mají biologickou schopnost v organismu zadržovat dusík tím, že zpomalují odbourávání bílkovin, a zároveň aktivizují a stimulují jejich biosyntézu, čímž podporují růst tkání, především svalů. Jejich účinek je synergický, například s růstovým hormonem (STH/GH). Některé hormony naopak působí antagonisticky, např. glukokortikoidy.

Anabolické vlastnosti testosteronu objevil už v roce 1935 Kochakian, ale použití přirozených androgenů jako anabolik však v této době nepřicházelo v úvahu pro jejich vysokou androgenní a nízkou anabolickou účinnost. Teprve později, v 50. a 60. letech minulého století, byl výzkum androgenů směřován i na získání syntetických sloučenin s vysokou anabolickou účinností, u nichž by naopak androgenní aktivita byla maximálně potlačena. Například silný anabolický účinek 19-nortestosteronu byl objeven až v roce 1953 Horschbergerem. Jak se rozšiřovaly poznatky o účincích AAS a zvyšoval se počet nových ještě účinnějších preparátů, začaly se objevovat také první zprávy o zneužití AAS a to prvně v profesionálním sportu (kulturisti, vzpěrači, atleti). Situace s dopingem spojeným s AAS se stala postupně neudržitelná. Doslova šokem pro sportovní veřejnost se stala anonymní anketa prováděná během olympiády v Mnichově v roce 1972. Z téměř deseti tisíc sportovců, kteří se ankety zúčastnili, jich přibližně 85 % přiznalo užívání AAS. V roce 1975 byly AAS přidány na seznam látek zakázaných Mezinárodním olympijským výborem. Výsledky ankety na výše zmiňovaných olympijských hrách vedly k ráznému opatření Mezinárodního olympijského výboru, který v roce 1976 na olympiádě v Montrealu zavedl první systematické kontroly na AAS [29, 30]. Od té doby čítá seznam sportovců prokazatelně pozitivně testovaných na některá z anabolik stovky a tisíce jmen sportovců. Jedno z nich však nebude nikdy zapomenuto a to jméno kanadského sprintera

Bena Johnsona, který se stal pravým symbolem éry AAS a jehož dopingový skandál doslova otrásl olympiádou v Soulu v roce 1988. Od té doby se zneužití AAS postupně začalo šířit i do dalších oblastí lidské činnosti, například do zemědělské produkce živočišných potravin.

Převážná většina vysoce anabolicky účinných sloučenin byla postupně získána obměnou molekuly 17 α -methyltestosteronu a dihydrotestosteronu (Obrázek 7). Např. zavedením další dvojné vazby do polohy 1(2) v molekule 17 α -methyltestosteronu byl syntetizován methandienon (17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-on, Dianabol), jehož anabolický účinek převažuje nad androgenním v poměru 3 : 1. Výhodná se ukázala i substituce fluorem v poloze 9 α a hydroxylovou skupinou v poloze 11 β , kdy má získaný fluoxymesteron (9 α -fluor-11 β , 17 β -dihydroxy-17 α -methyl-4-androsten-3-on, Halotestin, Ultrandren) přibližně 20x vyšší anabolický účinek než původní methyltestosteron. Od methyltestosteronu je odvozen i oxymesteron (4,17 β -dihydroxy-17 α -methyl-3-oxo-4-androsten, Oranabol).

Z derivátů DHT jsou pro vysoký p.o. anabolický účinek „v praxi“ nejvyužívanější preparáty oxymetholon (17 β -hydroxy-2-hydroxymethylen-17 α -methyl-5 α -androstan-3-on, Androyd, Anapolon), mesterolon (17 β -hydroxy-1 α -methyl-5 α -androstan-3-on, Proviron, Mestoranum), a stanazolol (17 α -methyl-5 α -androstan-3,2-c-pyrazol-17 β -ol, Stromba).

Pro chemickou modifikaci molekuly 19-nortestosteronu je nejčastěji využívána esterifikace v poloze 17 β , obdobně jako estery u samotného testosteronu, nejvíce se používají estery s kyselinou fenylpropionovou (Durabolin, Superanabolon) a dekanovou (Deca-Durabolin, Turinabol-Depot).

Syntetické obměny základního skeletu molekuly testosteronu, jak bylo popsáno výše na vybraných případech, jsou velmi variabilní a tím pádem je dnes rozsah syntetických preparátů AAS velmi široký a lákavý pro řadu dalších, nových a neznámých modifikací na kterých se neustále pracuje na různých úrovních vývoje.

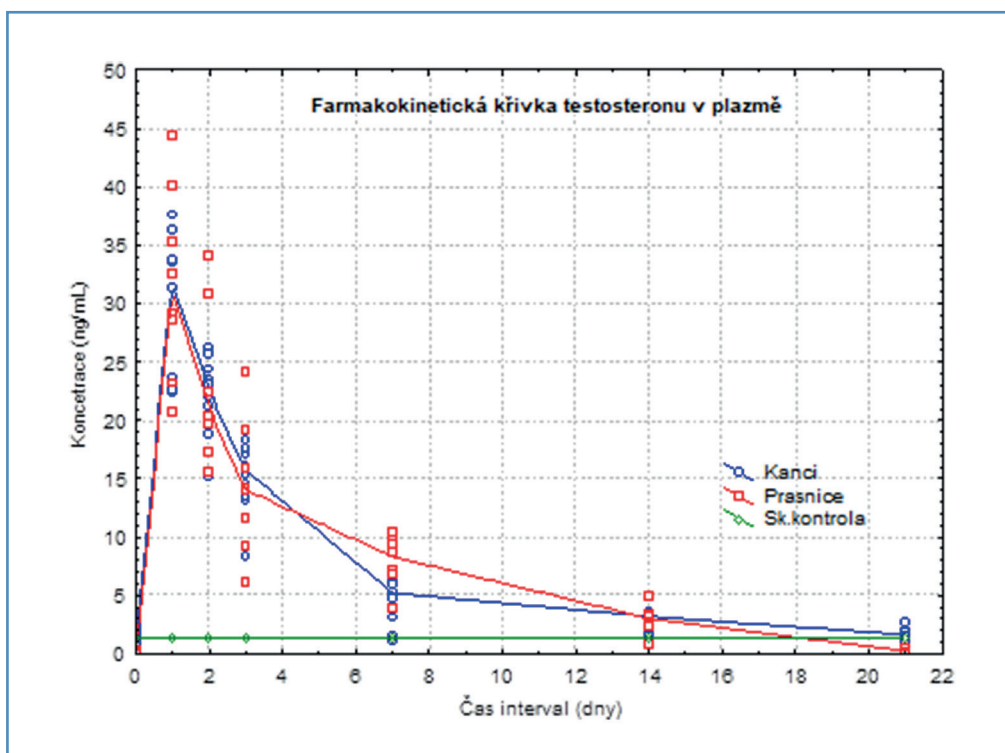
3.6. Farmakokinetika anabolických steroidů u potravinových zvířat

V humánní medicíně existuje velké množství studií popisujících podrobně farmakokinetiku (PK) steroidních hormonů po administrativní aplikaci a jeho následnou metabolizaci a eliminaci. Ve většině těchto publikací jsou uvedena kompletní farmakokinetická data, včetně farmakokinetických křivek pro studované případy. Například pro androgenní anabolický steroid (AAS) testosteron jsou velmi rozsáhle zpracována a popsána farmakokinetická data v řadě studií v knize autorů Behre et al. [12]. Autoři v knize uvádějí, že samotný testosteron se po orální aplikaci velmi rychle v lidském organismu metabolizuje a inaktivuje v játrech, maximální koncentrace C_{max} je dosažena asi po 4 h od podání a po 18 h je testosteron zcela metabolizován. Z tohoto závěru je patrné, že farmakologické využití samotného testosteronu není příliš efektivní. V klinické praxi se nejčastěji využívají především jeho estery pro prodloužení doby působení (tzv. prolongaci účinku), případně deriváty testosteronu, např. 17 α -methyltestosteron pro orální aplikace. Z těchto důvodů celá řada výrobců léčivých přípravků s testosteronem většinou kombinuje různé estery tak, aby jeho účinnost prodloužily a zefektivnily. Příkladem takových výrobků mohou být dva nejznámější preparáty Testosteron Depot 100 vyrábí firma Schering AG a kombinuje dva estery, 17 β -testosteron propionát a 17 β -testosteron enanteát. Léčivý přípravek Sustanon 250 vyrábí nizozemská firma N. V. Organon a kombinuje v něm dokonce čtyři estery, 17 β -testosteron propionát (30 mg ml⁻¹), 17 β -testosteron phenylpropionát (60 mg ml⁻¹), 17 β -testosteron isokapronát (60 mg ml⁻¹), a 17 β -testosteron dekanoát (100 mg ml⁻¹). Tento léčivý přípravek je v České republice schválen a registrován pod registračním číslem CZ Reg. 56/357/91-C. Registrační dokumentace v SPC (Souhrnu údajů o přípravku, 2014) pro Sustanon 250 injekční v kapitole Farmakokinetické vlastnosti v odstavci Adsorpce uvádí: jednotlivá dávka přípravku vede ke zvýšení celkové plazmatické hladiny testosteronu s maximem hodnot přibližně 70 nmol L⁻¹ (C_{max}), které je dosaženo přibližně za 24 – 48 hodin (t_{max}) po podání [32]. Plazmatické hladiny testosteronu se vrátí k dolní hranici normálního rozmezí

u mužů přibližně za 21 dnů. Testosteron je následně metabolizován na dihydrotestosteron a estradiol, které se dále metabolizují fyziologickými cestami. Eliminace probíhá hlavně močí ve formě konjugátů etiocholanolonu a androsteronu.

Odlišná situace je ovšem ve veterinární medicíně. Obecně je působení steroidních hormonů (včetně testosteronu) v organismu po jejich aplikaci, sledování hladin hormonů a jejich metabolitů v krvi a jejich rozložení v tkáních v souvislosti s humánní medicínou velmi dobře prostudováno a publikováno pouze na pokusných zvířatech (myš, krysa). Poměrně rozsáhle je prostudována situace včetně farmakokinetiky po aplikaci zakázaných AAS v souvislosti s dopingem u závodních koní. Ale naprosto odlišná situace existuje u hospodářsky chovaných potravinových zvířat (skot, prasata, ovce, drůbež), kde farmakokinetická data a křivky po aplikaci AAS jsou pouze částečně a ojediněle publikovány v rozmezí posledních třiceti let. Dosud publikované studie na potravinových zvířatech se týkají především zakázaných aplikací AAS (nandrolon, boldenon, atd.) a jejich kombinací v souvislosti s bezpečností potravinového řetězce a zákazem podávání těchto látek v zemích EU. Všechny tyto studie primárně popisují především eliminační fáze PK, tedy analytické stanovení koncentračních hladin různých AAS a jejich případných metabolitů v moči, plazmě nebo v různých tkáních (sval, játra).

Dobrá znalost základních farmakokinetických dat a časových průběhů PK křivek je zcela zásadním předpokladem pro účinné kontroly a prokazování případného zneužívání AAS u potravinových zvířat a současně nezbytnou podmínkou pro výzkum a vývoj nových analytických metodik. Právě tyto důvody vedly k tomu, že byly na VÚVeLu Brno postupně provedeny experimentální farmakokinetické studie s vybranými AAS na prasatech. Příkladem může být experiment provedený s léčivým hormonálním přípravkem Sustanon 250 obsahujícím čtyři různé estery testosteronu. Průběhy farmakokinetických křivek pro kastrované kance i prasnice byly totožné, jak je možno vidět na následujícím grafu (obr. 8). Maximální koncentrace C_{max} (29,31 ng ml⁻¹ $\approx$ 102 nmol L⁻¹ pro kastrované



Obrázek 8 – Farmakokinetické křivky obsahu 17 β -testosteronu v plazmě prasat po i.m. aplikaci 0,6 ml přípravku Sustanon 250 inj., body na křivce představují naměřené koncentrace volného testosteronu v plazmě.

kanečky, 31,73 ng ml⁻¹ $\approx$ 110 nmol L⁻¹ pro prasničky) bylo dosaženo t_{max} po 24 hodinách od aplikace. Plazmatické hladiny testosteronu se vrátily k průměrným hodnotám endogenního testosteronu u kastrováných kanců i prasniček přibližně za 10 až 14 dnů. Stanovené koncentrace endogenního volného 17 β -testosteronu v plazmě kastrováných kaneček plemene hybrid Large White/České bílé (50/50) byly před aplikací hormonálního přípravku v rozmezí 0,55 až 2,58 ng ml⁻¹ (průměr = 1,56 ng ml⁻¹). Stanovené koncentrace endogenního volného 17 β -testosteronu v plazmě prasniček byly pod hodnotou meze detekce (<LOD) analytické metody.

V následujících experimentech byly na modelovém organismu prasete ověřeny PK parametry dvou velmi známých a často používaných AAS – nandrolon (nor-testosteron) a stanazolol. Průběhy PK křivek byly do značné míry totožné s PK testosteronu a naměřené parametry rovněž, zejména C_{max} (29,31 ng ml⁻¹ $\approx$ 102 nmol L⁻¹ pro nandrolon, 31,73 ng ml⁻¹ $\approx$ 110 nmol L⁻¹ pro stanazolol) a odpovídající hodnoty t_{max} byly podobně v rozmezí 24 – 48 h. Plazmatické hladiny obou AAS byly přibližně po 12 až 14 dnech experimentálně analytickými metodami rovněž neprokazatelné.

4. BEZPEČNOST POTRAVIN A ANABOLICKÉ STEROIDY

4.1. Chemická rezidua v potravinách živočišného původu

Významným aspektem bezpečnosti potravin jsou cizorodé látky („xenobiotika“) a jejich přítomnost ve formě reziduí v různých potravinách. V posledních desetiletích výrazně přibýlo vědeckých informací o celé řadě potenciálně toxických, chemických látek (anorganických nebo organických) pronikajících do potravních řetězců. A stále nová rizika spojená s těmito látkami jsou odhalována a to v důsledku prudkého rozvoje stále citlivější analytické techniky a také v důsledku narůstajícího množství výstupů z rozsáhlých toxikologických studií. Tyto cizorodé kontaminující látky se dostávají do potravin živočišného původu v důsledku bezprostřední (promyšlené i nepromyšlené) lidské činnosti v průběhu odchovu zvířat (krmivo, veterinární léčiva), technologického zpracování (zastaralé technologie, znečištění technologických zařízení), skladování (z obalových materiálů) a dopravy, nebo v důsledku znečištění životního prostředí, např. chemickými prvky jako jsou těžké kovy nebo organické látky jako PCB, dioxiny. Kontaminující chemické látky mohou být tedy charakterizovány podle řady rozličných kritérií. Autoři M. O’Keeffe et al. [40] uvádějí ve své práci dvě základní, charakteristická dělení: podle původu a podle chemického složení. Rozdělení chemických kontaminantů potravin podle původu je přehledně uvedeno v následující tabulce, včetně příkladů (Tabulka 3). Kontaminanty, tedy cizorodé látky v potravinách, mohou být rozděleny také z pohledu chemického do dvou základních skupin: na anorganické a na organické. Anorganické kontaminanty jsou například „těžké kovy“ (olovo, rtuť, kadmium a arzén), které

pocházejí primárně z životního prostředí a kde existuje celá řada vědeckých publikací vlivu znečištění životního prostředí na kontaminaci potravin živočišného původu. Například autoři Ruprich J., Drápal J., Šťastný K. [41] ve své práci informují o kontaminaci hovězích tkání (játra, ledvina, sval) kadmíem a jeho zdravotním vlivu na konzumenty. Organickými cizorodými látkami v potravinách živočišného původu mohou být například rezidua cizorodých látek po aplikaci veterinárních léčiv (antibiotika, antikokcidika), rezidua cizorodých „zakázaných“ látek (hormonální přípravky pro stimulaci růstu, některá antibiotika – chloramfenikol, nitrofurany), nebo již výše zmíněná rezidua kontaminantů různých pesticidů. I zde existuje v poslední době řada vědeckých publikací, které upozorňují na různá rizika jejich vlivu na zdraví lidí, protože trendem dnešní doby je konzumace čerstvých, nezavadných a bezpečných potravin.

Samotné informace o problémech v oblasti chemické bezpečnosti potravin bývají poněkud úzce zaměřené, specializované a z celkového pohledu poněkud roztržštěné, a pokud jsou vnímány izolovaně od ostatních aspektů (souvisejících například s nutriční hodnotou potravin, se specifickými dietárními potřebami určitých skupin konzumentů apod.), pak mohou významně zkreslit skutečnou závažnost situace, případných rizik a vést k nesprávnému pochopení, k nesprávným interpretacím a rozhodnutím.

Prokazování a stanovování chemických reziduí cizorodých látek v potravních řetězcích a obecně potravinách,

Tabulka 3 – Kategorie chemických kontaminantů podle původu, které se mohou vyskytovat v potravinách.

Kategorie		Příklady
(a) Přírodní	Přírodní komponenty v potravinách Přírodní kontaminanty v potravinách	fytoestrogeny, glykoalkaloidy mykotoxiny, fytotoxiny, vodní biotoxiny
(b) Syntetické	Zemědělské chemikálie Veterinární léčiva Potravinová aditiva Chemikálie z obalů Chemikálie z technologických procesů Kontaminanty z živ. prostředí	pesticidy, hnojiva antibiotika, anthelmintika, stimulanty růstu konzervanty, antioxidanty monomery vinylu, oligomery nitroaminy, polycyklické aromáty (PAH) dioxiny, polychlorované bifenyls (PCB)

je z pohledu analytické chemie *stopová analýza*, která musí být velmi citlivá a specifická. Jako stopu označujeme složku, jejíž malé množství – „reziduum“ – se vyskytuje v jiném materiálu, který označujeme jako matici [42]. Neexistuje všeobecně platný názor, jaký koncentrační obsah opravňuje k použití termínu „stopová složka“ – reziduum cizorodé látky. Ještě před 40 lety tak byla označována sloučenina, jejíž obsah byl na úrovni 0,1 %. Se stoupající citlivostí analytických metod se mez detekce a mez kvantifikace posunuly o několik řádů k nižším koncentracím. Dnes mluvíme o stopové analýze tehdy, kdy obsahy reziduí stanovené látky jsou běžně na úrovni ppb (part per billion, $\mu\text{g kg}^{-1} \approx \text{ng g}^{-1}$).

4.2 Použití steroidů v produkci potravin živočišného původu

Vzhledem k rostoucí velikosti světové populace a stoupající tržní síle obyvatel dochází k výraznému nárůstu poptávky po mase jako jedné ze základních složek ve výživě člověka. Nejvíce se celosvětově produkuje maso drůbeží, následuje maso vepřové a až na třetím místě je maso hovězí a tato produkce se v každém roce zvyšuje zhruba o 2 %. V roce 2014 celková produkce masa ve světě podle údajů United States Department of Agriculture (USDA) [43], Foreign Agricultural Service z října 2015 vzrostla proti roku 2013 o 1,02 % (tj. o 4,077 mil. t), na 256,861 mil. tun. Největší podíl na tomto zvýšení měl meziroční nárůst výroby drůbežího masa o 1,03 % (tj. o 2,055 mil. tun) na 86,549 mil. tun. Rovněž produkce vepřového masa se podle předpokladu zvýšila a to o 1,02 % (tj. o 1,743 mil. tun) na rekordních 110,566 mil. tun. Naproti tomu světová produkce hovězího masa se meziročně téměř nezměnila (nárůst pouze o 0,1 %) na 59,746 mil. tun (USDA – FAS, 2015). Z absolutních hodnot je patrné, že největší produkce celosvětově připadá na vepřové maso.

Největším producentem masa na světě je dnes Čína, následují USA, Indie, Brazílie a EU (Německo, Francie, Nizozemí a Dánsko). Současně je průměrná spotřeba masa na jednoho obyvatele Země asi 32,5 kg za rok, tato spotřeba je však úměrně závislá na stupni rozvoje jednotlivých zemí, například v průmyslových zemích byla tato spotřeba vyčíslena na úroveň 66,5 kg, v rozvojových ekonomikách to bylo 24,7 kg a v nejchudších státech světa to bylo jen 7,4 kg na osobu a rok 2016 (Kameník, 2018). V České republice spotřeba masa od roku 1990 postupně klesá a například v roce 2017 činila spotřeba masa v průměru 80,3 kg/rok na jednoho obyvatele. A spotřeba vepřového masa tvoří přibližně 52,7% (42,3 kg) podíl z této celkové spotřeby masa v ČR dle statistiky Českého statistického úřadu (ČSÚ, 2018) [44].

Podle údajů FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014) [45] se předpokládá, že v průběhu následujících 40 let bude nutné globální produkci masa dále zvýšit tak, aby bylo možné udržet krok s nárůstem

počtu obyvatelstva na planetě. Tento trend zvyšování spotřeby masa se z globálního hlediska týká především asijských států, ale i rozvojových zemí, kde se s rostoucí ekonomikou zvyšuje také kupní síla obyvatelstva. Situace v jednotlivých ekonomicky vyspělých státech Evropské unie (EU) je zásadně odlišná. Produkce a spotřeba masa je již řadu let stabilizovaná a producenti masa se dnes prioritně zaměřují na ekonomickou efektivitu průmyslové výroby masa a s tím spojené snižování finančních nákladů a jejich konkurenceschopnosti, než na zásadní navyšování objemů produkce masa. Z pohledu spotřebitele se odpovědné kontrolní a regulační orgány na úrovni EU a návazně v jednotlivých členských zemích unie prioritně zaměřují na kvalitu a bezpečnost vyráběných potravin, ale i potravin, včetně masa, dovážených ze zemí mimo jednotný trh EU.

Jedním z velmi efektivních a lákavých prostředků zvyšování výroby masa je obecně použití různých stimulatorů růstu ve fázi výkrmu potravinových zvířat. Řada významných světových producentů tuto možnost intenzivně využívá, především v zemích mimo EU, kde nejsou tyto látky zakázány. Druhým významným faktorem je, že tyto syntetické stimulatory růstu v posledních letech významně zlevnily a díky tomu se jejich využití v zemědělské produkci masa stalo ekonomicky výhodné. Díky rozšíření produkce především v Číně, Indii a Jihoafrické republice se staly i více dostupné. Této situaci využívají výrobci v řadě zemí na celém světě, kde tyto prostředky nejsou zakázány, ani nijak regulovány, jedná se především o USA, Kanadu, Austrálii, Japonsko, Čínu, Brazílii a Argentinu.

V zemích EU jsou již více než 25 let tyto syntetické stimulatory růstu zakázány používat ve výkrmu hospodářských zvířat. Tomuto zákazu podléhají i dovozy masa ze třetích zemí mimo EU, kde by při výkrmu byly použity tyto zakázané přípravky. Samozřejmě tento postup EU vyvolává velkou nevoli významných exportérů masa mimo EU a především USA vede řadu úředních sporů v této oblasti s EU. Nakonec EU pod tlakem povolila import masa z USA, ale jen pokud má certifikaci, že zvířatům nebyly androgenní anabolické steroidy podány [46].

4.3 Historie zavedení zákazu používání anabolických steroidů v EU z pohledu legislativy

Bezpečnost potravin je základním principem evropské potravinové politiky, která zaručuje ochranu zdraví spotřebitelů. Na základě tohoto principu zakázala legislativa EU směrnicí 81/602/EEC, vydanou v roce 1981 (Council Directive 81/602/EEC), užití vybraných hormonálně účinných látek. Jednalo se nejprve o diethylstilbestrol a další stilbeny a tyreostatické látky. Následně v roce 1988 EU zakázala směrnicí 88/146/EHS užívání dalších 6 hormonů pro podporu růstu hospodářských zvířat a to testosteronu, estradiolu, progesteronu, zeranolu, trenbolonu (acetátu) a melengestrolu (acetátu) [50]. Vydáním těchto směrnic se uzavřela první legislativní etapa zákazů „neterapeutického“ používání anabolických látek v chovech hospodářských zvířat, tak i import masa ze zvířat jimi ošetřených do zemí EU (zákaz importu vešel v platnost 1. 1. 1989). Evropská Unie se takto rozhodla na základě obav spotřebitelů ohledně bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti potravin.

Druhá etapa legislativního procesu evropské potravinové politiky, která zaručuje ochranu zdraví spotřebitelů, začala dne 9. března 1995, kdy Evropský parlament zdůraznil naléhavou potřebu jednotného a účinného monitorovacího systému ve Společenství a požádal členské státy o posílení kontroly a sledování s ohledem na použití nedovolených látek. Následně dne 29. dubna roku 1996 vydala Rada dvě zásadní směrnice a to 96/22/EC (Směrnice Rady 96/22/ES) a 96/23/EC (Council Directive 96/23/EC), které zrušily předchozí směrnice (v případě 96/22/ES jsou to směrnice: 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS; u 96/23/ES se jedná o: 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS) a ustanovily legislativní rámec pro úřední kontrolu reziduí v potravinách živočišného původu [51, 52].

Směrnice 96/22/EC v platném znění zakazuje užití beta-agonistů a vyjmenovaných látek, které mají hormonální nebo tyreostatické účinky. Tato směrnice ovšem umožňuje užití určitých, Evropskou Radou schválených, veterinárních léčiv obsahujících hormony (např. 17 β -estradiol,

testosteron, progesteron a jejich deriváty) výhradně pro terapeutické účely. Umožňuje tedy podávat hospodářským zvířatům veterinární léčiva s estrogením, gestagenním nebo androgenním účinkem pro zootechnické účely především v případě „synchronizace“ říje. Maso nebo produkty ze zvířat, kterým byly podány tyto látky, smějí být uváděny na trh pro lidskou spotřebu, pokud byla dotyčná zvířata ošetřena veterinárními léčivy vyhovujícími požadavkům směrnice a pokud byly dodrženy ochranné lhůty před porážkou zvířete. V roce 2008 Evropský parlament a Rada potvrdily dosavadní zákaz použití hormonálních látek pro podporu růstu u hospodářských zvířat a navíc novelou směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/97/ES (2008) zcela zakázaly jakékoliv použití 17 β -estradiolu u hospodářských zvířat z toho důvodu, že je považován za karcinogen s účinkem tvorby i podpory nádorů, a že v současnosti dostupné údaje neumožňují kvantitativní odhad rizika pro lidské zdraví. Směrnice 96/23/EC stanovuje opatření, které členskými státy EU ukládá povinnost monitorovat látky a jejich rezidua u zvířat i ve zvířecích produktech. Všechny členské státy si tak mají zavést plán pro monitorování a detekci skupin reziduí nebo látek podle druhu zvířete.

Nově vydané Nařízení Evropského parlamentu a Rady 2017/625 [69] o úředních kontrolách ruší původní směrnici 96/23/EC platnou od roku 1996 k datu 14. prosince 2022, avšak stanovuje přechodnou dobu, po které mají příslušné orgány nadále provádět úřední kontroly nezbytné ke zjištění přítomnosti látek a skupin reziduí uvedených v příloze I směrnice 96/23/ES v souladu s přílohami II, III a IV uvedené směrnice. Nová legislativa, formou nařízení, vztahující se ke kontrole (monitorování) reziduí a kontaminantů, je v současné době v legislativním procesu. Druhá, stěžejní Směrnice Rady 96/22/EC z roku 1996, platí nadále.

Do českého právního řádu byla plně implementována příslušná legislativa EU v podobě zákona č. 166/1999 Sb. (Sbírka zákonů, 57/1999) o veterinární péči ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky č. 291/2003 Sb. (Sbírka zákonů, 98/2003), o zakazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí,

a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech. Zákon o veterinární péči uvádí, že doplňkové látky a léčivé přípravky, které mají hormonální, tyreostatický nebo beta-adrenergní účinek, nesmí být volně uváděny do oběhu a podávány zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí. Lze podávat jen léčivé přípravky, které byly vyrobeny a uvedeny do oběhu v souladu s veterinárním zákonem a zákonem o léčivech (Zákon č. 378/2007 Sb.). V případě potravinových zvířat mohou být použita pouze taková léčiva, která obsahují farmakologicky aktivní látky, u kterých proběhlo kladné toxikologické hodnocení za účelem stanovení jejich maximálního limitu reziduí (MLR) a jsou uvedeny v seznamu povolených látek. Chovatel může uvádět na trh pouze zvířata, kterým nebyly podávány nepovolené nebo zakázané látky nebo přípravky a u kterých byly dodrženy stanovené ochranné lhůty u povolených veterinárních léčivých přípravků.

I přes přísný legislativní zákaz a na něj navazující dobře propracovaný systém kontrolních mechanismů monitoringu reziduí těchto zakázaných látek v potravinách živočišného původu v jednotlivých státech Evropské unie dochází neustále k nelegálním pokusům tyto zakázané stimulatory růstu zneužívat. Tuto skutečnost dokazují i počty pozitivních nálezů (non-compliant) v rámci cíleného monitoringu na steroidy (látky skupiny A3). V roce 2019 bylo celkově analyzováno 44 297 vzorků na steroidy v rámci celé EU a z toho bylo nevyhovujících vzorků 244 (0,55 % z celkového počtu testovaných vzorků). U skotu 130 (0,51 %) nevyhovujících vzorků, u prasat 49 (0,49 %) nevyhovujících vzorků, u ovcí 54 (5,23 %) nevyhovujících vzorků a u drůbeže 11 (0,18 %) nevyhovujících vzorků, tak jak uvádí Evropská agentura pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA) ve své technické zprávě z roku 2021 [58]. Vždy se jednalo o dobře známé AAS, u skotu se jednalo o nálezy anabolických steroidů: nandrolonu, boldenonu, 17 β -testosteronu a progesteronu. U prasat se jednalo o nálezy těchto anabolických steroidů: nandrolonu, boldenonu, trenbolonu, 17 β -testosteronu a normethandrolonu.

4.4 Jak je to s používáním anabolických steroidů ve výkrmu jinde ve světě?

Legislativní opatření související s používání anabolických látek ve výkrmu se nyní napříč státy a kontinenty velice liší a tyto rozdíly jsou častým důvodem mezistátních obchodních konfliktů a soudních sporů, což vede až k likvidaci a znehodnocení tun zabaveného masa.

Současná situace v Americe

Food and Drug Administration (FDA) ve Spojených státech schválila od 50. let 20. století řadu steroidních přípravků pro výkrm skotu a ovcí. Mezi povolené látky patří přírodní testosteron, estrogen, progesteron a některé jejich syntetické deriváty. Všechny tyto látky se aplikují za účelem zvýšení rychlosti růstu zvířat a vyšší účinnosti přeměny krmiva na maso. Nové látky schvaluje FDA vždy až poté, co studie prokáží, že potraviny z takto ošetřených zvířat jsou pro spotřebitele bezpečné a nepoškozují ošetřené zvíře ani životní prostředí. Bezpečná hladina pro lidskou spotřebu je taková, u které se na základě rozsáhlých vědeckých studií neočekává, že by měla na člověka škodlivé účinky. Hormony se nejčastěji aplikují jako kožní implantáty ze zadní části ucha zvířete a uši se při porážce odstraňují. Odhaduje se, že až 90 % skotu ve výkrmu v USA má alespoň jeden anabolický implantát, žádný typ implantátu však není schválen pro použití u dojnic, prasat nebo drůbeže. Podobné zákony platí i v Kanadě, kde se omezené množství steroidních hormonů používá ve výkrmu skotu.

Současná situace v Asii

V Číně byla aktuální verze Nařízení o podávání veterinárních léčiv přijata v roce 2004. Postupem času Ministerstvo zemědělství Číny přidává podpůrná nařízení pro volně prodejné veterinární léčivé přípravky a normy pro použití veterinárních léčiv u hovězího a mléčného skotu, prasat, ovcí, slepic a králíků. Každý rok probíhá povinné sledování a kontrola používání veterinárních přípravků, včetně anabolických látek. Většina současných MRL je odvozena od norem USA, většinou jsou ale méně striktní a aktualizují se velice pomalu. Podobný přístup a situace platí pro většinu ostatních asijských zemí, kromě

Japonska, kde jsou předpisy přísnější. Studie v Japonsku však často naznačují, že sledování zneužívání steroidů ve výkrmnách na malých podnicích a farmách je věnována malá nebo žádná pozornost, a proto je procento zneužívání stále poměrně vysoké.

Současná situace v Austrálii

V Austrálii je používání steroidních hormonálních přípravků částečně povoleno, pouze Tasmanie zakázala jejich používání v roce 2000. Na používání hormonálních přípravků dohlíží Australský úřad pro pesticidy a veterinární medicínu (APVMA), který uvádí, že použití hormonálních stimulatorů růstu je bezpečné, pokud se aplikují podle pokynů na etiketě. Austrálie má také program výkrmu zvířat bez hormonů, který produkuje maso pro evropský trh.

Současná situace v Africe

V Africe jsou některé hormony, jako je testosteron, estradiol, progesteron, zearanol a trenbolon, schváleny k podpoře růstu skotu. Většina afrických zemí má zákony upravující používání anabolik u zvířat určených k produkci potravin, ale nemá kompetentní orgány k provádění analýz reziduí těchto látek, zejména kvůli nedostatku vyškoleného personálu nebo nedostatku finančních zdrojů a odborných laboratoří.

4.5 Problematika dokazování anabolických steroidů v potravinách

Současné kontroly a odhalování nelegálních praktik v úředních laboratořích EU se dnes obvykle spoléhají na monitorování omezeného počtu reziduí ve vybraných maticích s cílenou detekcí a stanovením (tzv. target analyza) vybraných zakázaných látek steroidů s anabolickými účinky metodami založenými na plynové chromatografii (GC) nebo kapalinové chromatografii (LC) (viz. Tabulka 5) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Tyto dvě analytické metody jsou již více než 15 let stále považovány za nejmodernější a nejvhodnější analytické nástroje pro provádění konfirmačních analýz, detekci a kvantifikaci dle Rozhodnutí Komise 2002/657/ES [59] a Prováděcím nařízením komise CIR (EU) 2021/808 [70].

Dnes majoritní analytická technika LC-MS/MS založená na cíleném stanovení předem známých analytů, v našem případě reziduí anabolických steroidů, je dostatečně specifická pro identifikaci a i vysoce citlivá pro kvantifikaci. Ale její nevýhoda spočívá především v tom, že analytik, který s touto technikou pracuje, musí dopředu znát chemickou molekulovou strukturu stanovovaného analytu (musí vědět, který steroid bude stanovovat, zjednodušeně řečeno), dále musí pro tento analyzovaný analyt mít fyzicky vysoce čistý analytický standard pro detekci a porovnání, a dále musí mít nejlépe izotopicky značený interní standard, například s Deuteriem. Bez znalosti „co mám“ detekovat a stanovovat v příslušné matici je hmotnostní detektor MS/MS, nejčastěji typu triple quadrupol (označovaný taky jako QQQ), prakticky „slepý“. Jinými slovy, žádnou jinou látku, která by byla přítomna v analyzovaném vzorku a měla velmi podobnou chemickou strukturu a stejné biologické účinky jako anabolické steroidy, ale měla rozdílnou molekulovou hmotnost (např. m/z bylo $>$ nebo $<$ o 1 Dalton), by tento typ hmotnostního detektoru nedokázal detekovat. Seznam steroidů ze skupiny A3 zakázaných látek [52] a k nim doporučené detekční limity v předepsaných maticích, které musí splňovat konfirmační analytické metody, vydaly Evropské referenční laboratoře v pokynu EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MM-PRs) for Specific Pharmacologically Active Substances

in Specific Animal Matrices z roku 2022 [71] pro národní referenční laboratoře. Přes skutečnost, že jsou dnes nejčastěji používané hmotnostní spektrometry MS/MS vysoce citlivé (řádově pg až fg v nástřiku) a s rezervou splňují doporučené detekční limity, tak i s citlivostí může být v určitých případech problém. Může se tak stát např. je-li vzorek odebrán příliš dlouhou dobu po podání látky, pak koncentrace reziduí steroidů mohou být již příliš nízké a klesnout tak pod limity instrumentální citlivosti, čímž nebude v tomto případě zneužití AAS detekováno. Odborné znalosti těchto časových period pro jednotlivé anabolické steroidy, u jednotlivých zvířat a v kombinaci se způsobem jejich aplikace, nejsou doposud nikde v literatuře publikovány (u léčivých veterinárních přípravků se tato doba nazývá ochranná lhůta a musí být u všech registrovaných veterinárních léčiv stanovena).

Podle schopnosti detekovat a tím prokazovat zneužívání AAS současnými analytickými metodami LC-MS/MS a GC-MS/MS mohou být jednotlivé anabolické steroidy klasifikovány do jedné ze tří širokých kategorií:

„Exogenní“ steroidy – jedná se o „klasické“ steroidy, které jsou dobře známé na trhu, jako je například stanozolol. Tyto steroidy obsahují syntetické chemické struktury, které jsou dobře známé a přirozeně se nevyskytují. Detekce této třídy anabolických steroidů je poměrně jednoduchá, protože čistě kvalitativní demonstrace přítomnosti těchto syntetických steroidů v analyzovaném vzorku je vše, co je požadováno za potřebné pro účely jejich zjištění a jako průkaz jejich zneužití.

„Endogenní“ steroidy – jsou také známé steroidy, které jsou uváděny na trh jako syntetické preparáty a jejich chemické struktury jsou identické endogenním steroidům, které mohou přirozeně existovat, jako je například testosteron. Detekce zneužití těchto „endogenních“ steroidů je značně složitější, protože se vyskytují v organismech přirozeně v koncentračních hladinách, které nejsou dostatečně a statisticky významně známy u zvířat, a pak prostá kvalitativní demonstrace jejich přítomnosti ve vzorku není nedostatečná pro rozhodnutí a právní průkaznost jejich zneužití. U některých

endogenních steroidů, jako je testosteron, progesteron a estradiol, je dobře známo, že jsou všudypřítomné mezi savci. Ale klasifikace anabolických steroidů jako "endogenní" není úplně jasně ohraničena, protože existují některé steroidy, které mohou být považovány za "semi-endogenní". Toto označení znamená, že anabolický steroid byl původně považován za čistě syntetický, ale postupem času byl prokázán i jeho přirozený endogenní výskyt v organismu, ale pouze u některých konkrétních situací, u některých druhů zvířat nebo v konkrétním čase, například 19-nortestosteron (nandrolon). Analytické instrumentální citlivosti pro odhalování anabolických steroidů výrazně vzrostly v posledním průběhu let, což má za následek fakt že stále více a více sloučenin je podezřelých jako "endogenní" nebo "semi-endogenní" z důvodu jejich odhalení již v nízkých koncentracích.

„Designer“ steroidy (nově syntetizované) – dříve v literatuře uváděné jako unmarketed steroidy, které obsahují syntetické struktury u kterých se předpokládá, že se přirozeně vyskytují, ale jejich chemické struktury nejsou dobře známy. Použití designér steroidů se poprvé dostalo do pozornosti odborné veřejnosti v roce 2003, kdy trenér amerických sprinterů našel použitou injekční stříkačku obsahující nový steroid tetrahydrogestrinon (THG) a předal ji úředníkům U.S. Anti-dopingové agentury (USADA). To vyústilo v diskvalifikaci několika atletů poté, kdy byl následně v jejich kontrolních vzorcích tento nový steroid identifikován (např. Marion Jones), jak uvedli ve své publikaci autoři D. H. Catlin et al. [72]. Designer steroidy mají chemické struktury založené na produktech uváděných na trh dříve, ale s drobnými chemickými úpravami v jejich struktuře, které je činí nezjistitelné pro všechny používané cílené hmotnostní spektrometrické postupy. V případě THG, jehož struktura je založena na gestrinonu (13-ethyl-17 α -hydroxy-18,19-dinorpregna-4,9,11-trien-20-yn-3-one) ale s plně nasyceným postranním 17-alkyl řetězcem, je následně relativní molekulová hmotnost THG o 4 atomové hmotnostní jednotky (u) vyšší než u samotného gestrinonu. Designer steroidy jsou syntetizovány buď záměrně, aby se vyhnuly detekci, nebo jak se zdá častěji z důvodu, který jim umožní být volně a de facto legálně uváděny na trh, tj.

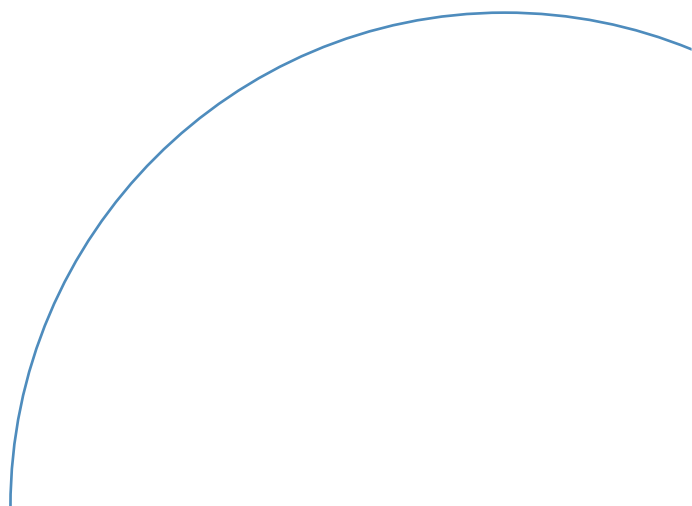
například prostřednictvím internetu zákazníkům v některých zemích, protože jejich struktury zde nespádají do oblasti působnosti právních předpisů, které brání legálnímu prodeji definovaných steroidních produktů.

A na závěr k výše uvedeným endogenním steroidům je nutno zmínit ještě jednu poznámku a to k poměru obsahu testosteronu ku epitestosteronu (T/E) v moči, kdy bylo zjištěno, že je tento poměr dobrým ukazatelem zneužívání testosteronu ve sportovním doping u lidí a závodních koní. Nicméně R. Angeletti et al. [85] ukázal, že je méně použitelný u skotu a jiných zvířat, protože metabolismus není úplně stejný jako u lidí, pravděpodobně v důsledku relativně vysoké enzymové aktivity 17 α -hydroxylázy.

Velmi diskutovaným aspektem možného účinného bránění detekce použití anabolických steroidů v odborné veřejnosti jsou dnes i nové způsoby použití aplikace, jako např. podávání „koktejlů“ se synergickým biologickým efektem, ale s nízkými koncentracemi, které jsou třeba i pod limitem detekce jednotlivých, dobře známých a detekovatelných zakázaných steroidů. Tento způsob aplikace koktejlů vyžaduje rozsáhlé odborné znalosti, ale jeho odborné užití je pak velmi obtížně analyticky prokazatelné.

K všem výše popsaným negativním problémům s detekováním a dokazováním AAS je možno přiřadit dnes ještě jeden významný aspekt. Ceny, za které se tyto preparáty dnes prodávají na černém trhu, jsou významně nižší a to až řádově, než tomu bylo ještě v 90. letech. Jejich syntetická výroba je poměrně snadná a levná díky Číně, Indii a Jihoafrické republice, odkud jsou dodávány do celého světa. A jejich dostupnost je, díky internetu a volnému celosvětovému obchodu „bez hranic“, mimořádně vysoká i kdekoli v Evropské unii. Jako příklad mohou posloužit informace uvedené v poslední době v publikacích vydaných laboratořemi OMCL (Official Medicines Control Laboratories) v Reportu z roku 2018: Market Surveillance of Suspected Illegal Products, MSSIP003: Illegal Anabolic Steroids [73] a ve vědeckém článku autorů Tircova B. a kol. [2018] [74]. V Reportu laboratoří OMCL je uvedeno, že v rámci speciální akce zaměřené na anabolické steroidy bylo získáno v 16 zemích EU 1600 vzorků AAS,

přičemž 88 % vzorků pocházelo z ilegálních obchodních sítí, u 12 % vzorků se vůbec nepodařilo zjistit zdroj a pouze 0,06% vzorků AAS pocházelo z legální distribuce. Ve vzorcích byly prokázány dobře známé AAS: testosteron, nandrolon, stanozolon, trembolon, boldenon, methandienon, drostanolon a oxymetholon. V druhé publikaci autoři uvádějí, že během krátké doby (4 měsíců) bylo získáno celkem 358 produktů AAS od uživatelů v ČR a na Slovensku. Produkty AAS vyrábělo 48 různých výrobců, z nichž 19 bylo od farmaceutických společností a 29 jich s největší pravděpodobností vyrobily ilegální laboratoře. Produkty AAS byly získány dobrovolně, většinou od kulturistů a členů fitness center. Oba uvedené příklady aktuálně velmi dobře dokumentují snadnost dostupnosti AAS ve všech zemích EU.



5. ZPŮSOBY PROKAZOVÁNÍ POUŽITÍ ANABOLICKÝCH STEROIDŮ

5.1 Přehled analytických metod používaných pro stanovení anabolických steroidů

Za účelem prosazování zákazu používání zakázaných hormonálních preparátů a jiných stimulatorů růstu v potravinářské výrobě ve státech Evropské unie, bylo vydáno prvně v roce 2002 Rozhodnutí Komise 2002/657/EC, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků [59]. V roce 2021 bylo toto rozhodnutí komise z roku 2002 nahrazeno Prováděcím nařízením komise CIR (EU) 2021/808 [70]. V těchto dokumentech vzhledem k pokroku, ke kterému došlo v analytické chemii od přijetí směrnice 96/23/ES v roce 1996, byla koncepce rutinních a referenčních metod nahrazena přístupem, který je založen na vymezení pracovních kritérií a postupů validace pro screeningové a potvrzovací (konfirmační) analytické metody, s hlavním cílem stanovit společná kritéria pro interpretaci výsledků zkoušek získaných úředními laboratořemi EU. Rozhodnutí stanovuje velmi striktní pravidla pro konfirmační metody pro organická rezidua nebo kontaminující látky, které musí poskytovat jednoznačné informace o chemické struktuře stanovovaného a prokazovaného analytu. Tomuto zásadnímu požadavku vyhoví pouze analytické metody založené na chromatografické separaci a spektrometrické hmotnostní detekci. Pro látky skupiny A, kam patří i steroidy (skupina A3), a látky skupiny B je možno použít pro konfirmační stanovení jen analytické metody kapalinové chromatografie (LC) nebo plynové chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS). Prakticky všechny publikace vydané po roce 2002 a týkající se stanovení reziduí zakázaných látek v bezpečnosti potravin jsou validovány s odkazem na výše uvedené Rozhodnutí komise (2002/657/EC), dle principů a požadavků uvedených v tomto nařízení, praktickým příkladem může být publikace autorů A. Cirkva a K. Šťastný pro analytické stanovení thyterostatik metodou LC-MS/MS [60].

Hlavním pozitivním přínosem tohoto Rozhodnutí komise (2002/657/EC) bylo, že sjednotilo analytickou metodiku včetně analytických technik na přibližně stejnou úroveň ve všech úředních kontrolních laboratořích států EU

v oblasti kontroly hospodářských zvířat a potravin živočišného původu. Velmi přínosné bylo rovněž zavedení požadavku na jednotné hodnocení a interpretaci výsledků, proto mohou být tyto získávané cenné informace o výsledcích kontroly objektivně porovnávány v rámci celé EU. Nově platné Prováděcí nařízení komise CIR (EU) 2021/808 původní rozhodnutí ještě více precizuje a primárně doplňuje o kvalifikační kritéria pro nové analytické instrumenty, především hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením (HR-MS).

5.2 Cílené analytické instrumentální metody pro stanovení steroidů v potravinách

V minulosti, od šedesátých let minulého století, byly vyvinuty a jsou popsány v literatuře řady analytických metod pro stanovení steroidů v různých biologických matricích (krev, moč, sval, játra, ledviny, chlupy). Nejčastěji se provádělo stanovení steroidů v biologických matricích pomocí radioimunologických metod (RIA) [61], imunologických metod (ELISA) [62] a pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) s UV detektorem nebo fluorescenčním detektorem [63]. V průběhu posledních čtyřiceti let ale došlo k řadě zásadních změn a k významnému pokroku v metodologii reziduální analýzy zakázaných steroidů v matricích získaných od živých hospodářských zvířat a v potravinách živočišného původu. Nejvýznamnějšího pokroku bylo bezesporu dosaženo v analytické instrumentální technice, ale zásadní změny proběhly i v preparaci vzorků určených k analýze a to především zmenšením požadovaného množství (hmotnosti/objemu) vzorku, následně „miniaturizací“ celého procesu přípravy vzorku k analýze, menšími objemy rozpouštědel, významně zmenšením analytických separačních kolon, atd. Tyto změny plynou především z řádově vyšších citlivostí a vysoké specifity dnes používané analytické instrumentální techniky.

S rychlým rozvojem analytické instrumentální techniky v 90. letech a na přelomu století a s nástupem hmotnostní spektrometrie (MS) ve spojení s plynovou (GC) nebo později kapalinovou chromatografickou separací (LC) byly všechny dříve používané analytické metody velmi rychle nahrazeny těmito dvěma dominantními analytickými metodami v reziduální analýze potravin, jak uvádí Mc Kinney ve své publikaci [64]. Přibližně do roku 1995 byly převážně používány GC-MS techniky, ale po tomto datu nastává velmi intenzivní rozvoj LC-MS technik a na přelomu století již jasně dominují analytické techniky na základě LC, přesněji HPLC ve spojení s hmotnostními spektrometry řazenými do tandemu, tzv. triple-quadrupoly pro reziduální analýzu steroidních hormonů a ostatních zakázaných látek. Schopnosti moderních hmotnostních detektorů provádět experimenty MS² (MS/MS, triple-Q) až MS_n (iontové pasti) z nich dělají zvláště vhodné

analyzátoři pro jejich jednoznačnou identifikaci a to vzhledem k jejich vysoké selektivitě. Tyto moderní hmotnostní spektrometry ve spojení s LC (High Performance - HPLC, ultra-kapalinová chromatografie - UPLC) splňují i všechny dnešní vysoké nároky na požadovanou citlivost detekce a kvantifikaci reziduí pro konfirmační analýzy. Obecný posun od GC-MS k LC-MS a následně LC-MS/MS metodám za posledních deset let byl tak zásadní, že GC-MS je dnes v kontrolních laboratořích zcela minoritně používaný systém pro analýzu reziduí zakázaných látek. Přehledné články týkající se analytických metod používaných pro reziduální analýzu steroidních hormonů lze najít v publikacích autorů Stolker et al. [66] a Kinsell et al. [68]. Velmi podrobný přehledný článek o současné analytické strategii pro detekci zakázaných steroidů v bezpečnosti potravin v poměrně nedávné době vydali autoři Scarth et al. [67].

5.3 Nové analytické přístupy k prokazování anabolických steroidů na bázi metabolomiky a proteomiky

Dnes majoritní analytická technika LC-MS/MS založená na cíleném stanovení předem známých analytů, v našem případě reziduí anabolických steroidů, je dostatečně specifická pro identifikaci a i vysoce citlivá pro kvantifikaci. Ale její nevýhoda spočívá především v tom, že analytik, který s touto technikou pracuje, musí dopředu znát chemickou molekulovou strukturu stanovovaného analytu (musí vědět, který steroid bude stanovovat, zjednodušeně řečeno), dále musí mít pro tuto cíleně analyzovanou látku fyzicky vysoce čistý analytický standard pro detekci a porovnání a dále musí mít nejlépe izotopicky značený interní standard, například s deuteriem. Bez znalosti „co mám“ detekovat a stanovovat v příslušné matici, je hmotnostní detektor MS/MS prakticky „slepý“. Jinými slovy, žádnou jinou látku, která by byla přítomna v analyzovaném vzorku a měla velmi podobnou chemickou strukturu a stejné biologické účinky jako anabolické steroidy, ale měla by rozdílnou molekulovou hmotnost, by tento typ hmotnostního spektrometru nedokázal vůbec detekovat.

Velmi diskutovaným aspektem dalšího možného účinného bránění detekce použití anabolických steroidů v odborné veřejnosti jsou dnes i nové způsoby použití aplikace, jako např. podávání „koktejlů“ se synergickým biologickým efektem, ale s nízkými koncentracemi, třeba i pod limitem detekce jednotlivých, dobře známých a detekovatelných zakázaných steroidů. Tento způsob aplikace koktejlů vyžaduje rozsáhle odborné znalosti, ale jeho odborné užití je pak velmi obtížně analyticky prokazatelné [Lone, 1997 [48]].

K řešení dokazování těchto nepovolených praktik s anabolickými androgenními steroidy je naléhavě zapotřebí vyvinout na základě vědeckého poznání nové alternativní způsoby detekce tohoto zneužívání. Dnes novým a velmi slibným směrem k prokazování zakázaného použití stimulatorů růstu, včetně anabolických steroidů, jsou přístupy založené na bázi metabolomiky a proteomiky s využitím nových hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením.

Metabolomika a proteomika patří do rychle se rozvíjejících oborů "omik" (omics) výzkumů, které se zaměřují na komplexní analýzu metabolomu (nízkomolekulární látky o molekulové hmotnosti do 1000 Daltonů) nebo proteomu (vysokomolekulární látky – proteiny) za konkrétního fyziologického nebo vývojového stádia organismu, tkáně či buňky a odráží tak aktuální stav funkcí, který je ale vždy vysoce dynamický. Oba vědní obory jsou poměrně mladé, například metabolomika byla prvně komplexně definována v práci Fiehn [2002] [75]: Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Obecným principem metabolomiky a proteomiky je charakterizovat biologické vzorky na základě změřeného chemického nebo proteomického profilu (profiling), tj. chemického, proteomického podpisu nebo známější otisku prstu „fingerprintingu“ [Villas-Bôas et al. [76]]. Až do nedávné doby byla většina prací z metabolomiky a proteomiky zaměřena především na klinické nebo farmaceutické aplikace, jako například vývoj léčiv, hodnocení léčiv, klinická toxikologie, klinická chemie, virologie, výzkum rakoviny nebo vědy o výživě. Metabolomika si prvně v průběhu let 2004 až 2009, ruku v ruce s rozvojem vhodné instrumentální analytické techniky, nachází cestu i do profesionálního sportovního dopingů a odtud k dopingů závodních koní, např. studie Teale et al. [77] a následně s možností využití těchto principů při kontrole zakázaných anabolických praktik při zneužití steroidních hormonů.

Využití metabolomických a proteomických postupů, především necílených technik, pro problematiku detekci anabolických postupů v případě užití anabolických syntetických analogů endogenních steroidních hormonů, použití nových „designer“ syntetických xenobiotických stimulatorů růstu a nových způsobů aplikace, jako je například podávání koktejlů s nízkými dávkami, bylo prvně navrženo v několika vědeckých studiích společně se způsobem, jak tuto situaci v budoucnu úspěšně řešit. Možnosti použití metabolomických technik byly prvně publikovány ve třech souborných vědeckých článcích v letech 2010–2012 dvou vědeckých skupin, které se této problematice bezpečnosti potravin a zneužívání anabolických androgenních steroidů dlouhodobě věnují [Scarth et al. [78]; Pinel et al. 2010 [79]; 2011 [80] a 2012 [81]].

Tabulka 4 – Přehled významných vědeckých článků od roku 2009 do 2020 s využitím metabolomických postupů pro průkaz použití zakázaných látek ve výkrmu hospodářských zvířat (Poz.: TQ – tripleQ , Orbitrap – MS s vysokým rozlišením).

Author	Nielen a kol. (2006)	Stolker a kol. (2009)	Anizan a kol. (2010)	Dervilly-Pinel a kol. (2012)	Courant a kol. (2012)	Lega a kol. (2017)	Kwok a kol. (2017)	Peng a kol. (2017)	Kaabia a kol. (2018)
Živočišný druh	kráva	kráva	kráva	kráva	kráva	kráva	kůň	prase	kráva
Počet N zvířat v experimentu	6	20	2	24	10	38	55	10	6
N zvířat v kontrolní skupině	-	5	0	12	5	16	-	5	0
N zvířat v ošetřené skupině	6	15	2	12	5	22	-	5	6
Matrice vzorku	chlupy	chlupy, plasma	moč	moč	ledvina	moč, krev, játra, ledviny, sval, žluč	chlupy	sérum	moč
Podávaná účinná látka	testosteron ester, boldenon undecylenat	testosteron ester, estradiol benzoat	androstenedion	estradiol 3-benzoat, nandrolon laureat ester	trenbolon acetat, 17β-estradiol	estradiol, trenbolon acetat, zeranol, zearalenon	-	ractopamin hydrochlorid	boldenon undecylenat
LC/GC separace	HPLC	UPLC, GC	UPLC	HPLC, UPLC	HPLC	HPLC	UHPLC	HPLC	UHPLC
Doba analýzy (min)	25	7,5 (UPLC)	16,5	30, 40	14	-	20	25	32
Typ MS	TQ	TQ	TQ	Orbitrap, ToF	Orbitrap	TQ	Orbitrap	Orbitrap	Orbitrap
Model MS (výrobce)	Micromass Quattro Ultima (Waters)	Quattro Premier (Waters)	XEVO (Waters)	LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific) + LCT Premier ToF (Waters)	LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific)	TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) + API-4000 (AB Sciex)	QExactive (Thermo Scientific)	QExactive (Thermo Scientific)	QExactive Plus (Thermo Scientific)
Statistické hodnocení	-	-	PCA	OPLS, t-test	Mann-Whitney U test	ANOVA, Mandel test	-	PCA, OPLS-DA, ANOVA, t test	PCA, studentův test
Metabolomická strategie	Target	Target	Profiling	Fingerprinting	Fingerprinting	Target	Profiling	Fingerprinting	Profiling

Postupně od roku 2009 skutečně několik vědeckých studií prokázalo, že metabolomické postupy na základě necíleného fingerprintingu vzorků moči s využitím hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením dokáží rozlišovat skupiny zvířat, které byly vystaveny působení anabolických androgenních steroidů od skupiny kontrolních zvířat, kde nebyly tyto látky aplikovány a jsou souhrnně uvedeny v tabulce 4.

5.4 Metabolomické a proteomické techniky a metodiky

Metabolomika, jak již bylo řečeno, představuje směr vědeckého bádání, který zahrnuje poměrně širokou oblast zkoumání napříč různými vědními disciplínami, plynoucí z biologické rozmanitosti naší planety – od experimentů mikrobiologických, přes rostlinné, živočišné až po analýzy lidských metabolitů a proteomů. Z pohledu pracovního postupu obecně pak obě omické techniky shodně zahrnují návrh experimentu, odběr a před-úpravu vzorku, vlastní přípravu vzorku, analytickou část, zpracování dat, statistickou analýzu, hodnocení výsledků a jejich interpretaci, případně může následovat archivace dat, zpětná revize experimentu nebo optimalizace a validace použitého postupu.

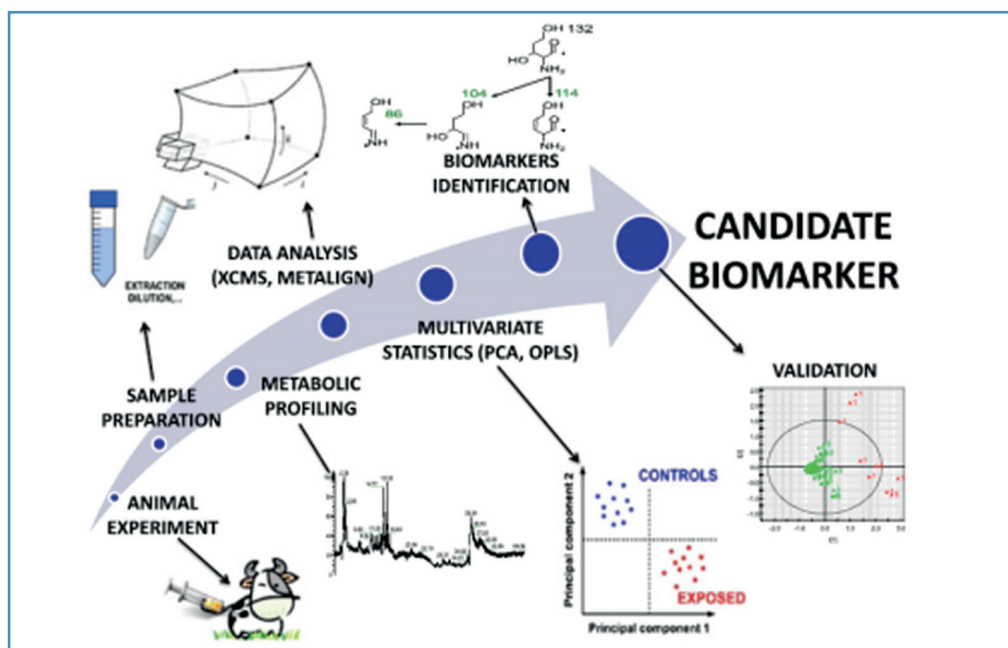
Komplexnost, různorodost a složitost metabolomu nebo proteomu samozřejmě znemožňuje i v dnešní době analýzu celého souboru metabolitů nebo proteinů současně. Pro tyto důvody byly například pro analýzu a interpretaci hladin metabolitů v biologických vzorcích vyvinuty různé strategické přístupy a tyto varianty mají každá svou vlastní metodiku práce. Jejich přehled je uveden v Tab. 5.

Typický pracovní postup (workflow) každé metabolomické nebo proteomické studie představuje několik po sobě jdoucích kroků, ale každý krok nabízí velký počet možností, jak ho v reálné situaci provést. Hlavními kroky postupů jsou návrh experimentu, odběr a zpracování vzorků, vlastní analýza, předúprava naměřených dat, vícerozměrná statistická analýza, validace modelu a vrcholem je nalezení charakteristických biomarkerů. Každý z těchto kroků musí být předem dobře promyšlen a přesně popsán, protože může mít zásadní vliv na konečný výsledek nebo jeho interpretaci. V současné době však neexistuje žádná definitivní forma pracovního postupu, metabolomického nebo proteomického „workflow“, něco jako specifický standardní operační postup (SOP) v cílené kvantitativní analýze, jak uvádějí autoři Dervilly-Pinel et al. [2011], Obrázek 9 [81].

Pracovní postup „workflow“ je možno využít a zobecnit pro všechny experimenty prováděné v rámci „omických“ metodik – proteomika, metabolomika, lipidomika, foodomika, a jiné. Pro naše přiblížení a vysvětlení jednotlivých kroků se však v popisu pro zjednodušení zaměříme jen na metabolomiku.

Tabulka 5 – Základní definice strategií používaných v metabolomických experimentech (modifikováno z Dunn, W. B. et al., 2005 [82]).

Pojem	Vysvětlení
Metabolomika	Identifikace a kvantifikace všech metabolitů v biologickém systému (metabolomu).
Metabonomika	V praxi je tento cíl v současnosti nedosažitelný, neboť neexistuje analytická technika, která by dokázala tento úkol splnit. Nutností je užití vhodné kombinace vysoce selektivních a senzitivních analytických technik.
Targetovaná (cílená)	Kvalitativní (fingerprinting) nebo kvantitativní měření dynamické metabolické dráhy, reakce živého organismu na specifický podnět (fyziologická stimulace, genetická modifikace, podání léčiva, přítomnost toxických látek).
metabolomika	Stanovení jednoho či více konkrétních metabolitů souvisejících se specifickou metabolickou drahou. Součástí bývá mnohdy složitá příprava vzorku z biologické matrice a užití separační techniky s citlivou detekcí.
Metabolické profilování	Identifikace a kvantifikace metabolitů majících podobnou chemickou strukturu (aminokyseliny) nebo patřících k metabolické dráze (citrátový cyklus). Obvykle zahrnuje vysoce účinnou separační techniku.
Metabolický fingerprinting	Komplexní analýza vzorku nebo extraktu (chemický „otisk prstu“) bez identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů. Minimální příprava vzorku. Může sloužit například ke klasifikaci vzorků (Diskriminační analýza) a k screeningovým účelům.
Metabolický footprinting	Komplexní analýza extracelulárních metabolitů (vylučovaných do růstového média). Součástí je biotransformace komponent média.



Obrázek 9 – Metabolomický workflow typický pro metabolické studie v oblasti prokazování zneužití AAS ve výkrmu u potravinových zvířat [převzato z [81]].

Prvním krokem v jakékoliv metabolické studii (postupu, workflow) zaměřené na zkoumání biologických účinků anabolických steroidů u chovných zvířat nebo potravin živočišného původu, je provedení experimentu na vybrané cílové skupině zvířat. Dobře promyšlený návrh experimentu je výchozím bodem metabolické studie, protože všechny následující výsledky z této studie se budou opírat o úspěšné provedení a dosažení tohoto prvního kroku.

Řada parametrů experimentu na zvířatech musí být stanovena ještě před zahájením pokusu tak, aby bylo zajištěno, že výběry odebíraných vzorků budou homogenní a budou zajištěny v dostatečném počtu. Experimenty na hospodářských zvířatech jsou finančně velmi náročné a jejich provedení podléhá příslušnému schválení dle platné legislativy (podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů). Experiment na zvířatech pro tyto účely nemůže být nahrazen žádnými jinými modelovými laboratorními experimenty. Z tohoto důvodu a za účelem dosažení odpovídajících výsledků a posouzení kontrastu, rozdílu či difference mezi ošetřenými a neošetřenými kontrolními zvířaty, musí pokusy na zvířatech přednostně zahrnovat homogenní zvířecí populaci, pokud jde o plemeno, věk, výživu, ustájení a životní prostředí obecně. Vzhledem k velkým inter-individuálním rozdílům, které se mohou vyskytnout mezi jednotlivci zapojenými do experimentu a za účelem jejich minimalizace, musí být počet zvířat, jakož i počet výsledných vzorků z experimentu odebraných, stanoven tak, aby měl dostatečnou statistickou vypovídací schopnost.

Co se týká výběru biologických matric, které mají být odebírány v průběhu experimentu, jedná se především o vzorky moči, séra nebo plazmy a vzorky chlupů. Tyto matrice vzorků mohou být snadno odebírány tak často,

jak je to nezbytné v průběhu experimentu a z praktického hlediska mohou být snadno odebírány i v reálné situaci na farmách přímo u živých zvířat. Kromě toho, plazma a moč poskytují ideální metabolické informace a i doplňující informace o aktuálním stavu organismu. Na jedné straně, plazma poskytuje "okamžitě" měřitelný metabolický stav v době odběru a její složení přímo odráží katabolické a anabolické procesy vyskytující se v celém organismu. Na druhé straně, moč poskytuje "v průměru" profil polárních metabolitů snadno vyloučených z těla zvířete jako výsledek katabolických eliminačních procesů (metabolismus II. fáze). Tyto matrice však nemohou být použity v praxi ke kontrole potravin živočišného původu na hranicích při dovozu nebo na jatkách u poražených zvířat. Proto tkáň, jakými jsou sval, ledviny a játra, jsou naopak vhodnější matricí pro tyto účely. Sval rovněž nabízí tu výhodu, že je cílovou tkání pro biologické působení anabolických steroidů, a je tedy rovněž vhodný pro zařazení do metabolických studií pro odhalování anabolických postupů.

Druhým krokem metabolické studie je postup před-přípravy a úpravy získaných vzorků. Kritickým bodem při analýze metabolomu je často právě kvalita přípravy vzorků, která by měla být co nejvíce jednoduchá a univerzální, ale především minimálně destruktivní k analytům. Vhodná příprava vzorků je všeobecně považována za limitující krok komplexnosti stanovení a za zdroj nesprávných výsledků. Celý postup přípravy vzorků je často velmi náročný a obecně ho lze rozdělit do tří základních kroků:

- Rychlé zastavení metabolismu, tedy tzv. metabolické zhášení (quenching) – inaktivace veškerých biochemických procesů, které jsou, jak bylo řečeno výše, velmi dynamické. Tento krok musí být dostatečně rychlý, aby nedocházelo k ovlivnění hladin metabolitů, způsobenou

změnou okolního prostředí. Rychlost procesu je skutečně rozhodující, jelikož i velmi malé změny hladin metabolitů mohou poukazovat na významné změny v metabolismu. Prakticky se nejčastěji rychlá inaktivace metabolismu provede náhlými změnami teplot (< - 40 °C, > - 80 °C) nebo pH (v rozmezí 0 - 2, nebo 10 - 12). Avšak platí, že různé biologické vzorky vyžadují odlišné techniky k dosažení úplného zhášení metabolismu. U mikrobiálních a tkáňových kultur se např. nejčastěji používají vodné roztoky organických rozpouštědel, obvykle methanol, ethanol a acetonitril.

- Extrakce metabolitů – při extrakci je nutno převést biologický materiál na formu, která bude kompatibilní s analytickou technikou a zároveň dojde k odstranění matričních složek, které by v analýze interferovaly (např. soli, tuky). Výběr extrakčního činidla je v principu závislý na chemické povaze metabolitů. Postup, jak zcela extrahovat všechny typy látek ze vzorku v jednom extrakčním kroku, je z důvodu již zmiňované rozmanitosti v současnosti neznámý. Avšak existují mnohá kompromisní řešení. Vzorky jsou nejčastěji extrahovány organickými rozpouštědly a jejich směsmi (např. methanol, ethanol, acetonitril, ethylacetát nebo chloroform; v případě polárních metabolitů jsou to směsi organických činidel s vodou).
- Zakoncentrování metabolitů – jde o zvýšení koncentrace vybraných metabolitů, protože většina extrakčních procedur způsobuje ředění metabolitů, čímž se jejich koncentrace mohou dostat pod meze stanovitelnosti. Odpaření rozpouštědla je prováděno různými způsoby, například za snížené teploty, aby nedocházelo k termální degradaci metabolitů, pomocí lyofilizace atd. Oblíbeným řešením tohoto problému je také zakoncentrování extraktu na pevné fázi – solid-phase extrakce (SPE), která využívá pevnou a kapalnou fázi k izolaci jednoho nebo jediného typu analytů, ať už s cílem tyto analyty stanovit, nebo je ze vzorku odstranit.

V pořadí třetím krokem metabolomické studie je vlastní měření metabolomu na vybraných analytických zařízeních podle cíle, kterého chceme ve studii dosáhnout.

Obecně platí, že výběr instrumentální metody pro analýzu metabolomu závisí na charakteru analyzovaného vzorku a komplexnosti analyzovaných metabolitů. V současné době je trendem analyzovat co nejvíce metabolitů v kombinaci s následnou identifikací a případně kvantifikací metabolitů ve vzorku s využitím jediného typu analytického zařízení, jenž nepochybně vede k lepší charakterizaci metabolomu, a tím rozšiřuje znalosti o daném biologickém systému. Proto značná část metabolomických experimentů se neobejde bez účinné separační části – užití chromatografických, případně elektroforetických metod. Nejčastěji používaným detektorem je dnes prioritně hmotnostní spektrometr, jehož výhodou je právě požadovaná kombinace detegovat dostatečný počet metabolitů a současně identifikovat a provádět i kvantifikace metabolitů. Odlišnou platformu komplexního měření metabolomu pak ale například zastupují techniky nukleární magnetické rezonance (NMR). Mezi méně používané platformy patří např. metody přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru nebo infračervená a Ramanova spektrometrie.

Čtvrtým, neméně důležitým krokem, je předúprava naměřených dat (data processing) – surová data metabolomické studie mají nejčastěji strukturu chromatografického (elektroforetického) záznamu, v němž se jako další dimenze vyskytují příslušná hmotnostní nebo NMR spektra. To vše je znásobeno příslušným počtem provedených měření. Pro následnou statistickou analýzu je nejprve nutno tato surová data vhodně upravit, přičemž hlavním cílem je redukovat systematický a náhodný analytický šum. Konečným výsledkem, výstupem pro následovnou statistickou analýzu je pak zdrojová matice dat s obvyklým tvarem: $X (n \times m)$, která obsahuje n objektů (n -řádků odpovídajícím vzorkům) a m znaků (m -sloupců odpovídajícím plochám nebo koncentracím jednotlivých metabolitů).

Pro úpravu surových (raw) dat (chromatogramů) se dnes používá specifický software a výkonná výpočetní technika. Software pro data processing může být „komerční“, který dodávají přímo výrobci analytického zařízení a který je specializovaný na metabolomická data, nebo může být využit software z tzv. „otevřených-zdrojů“

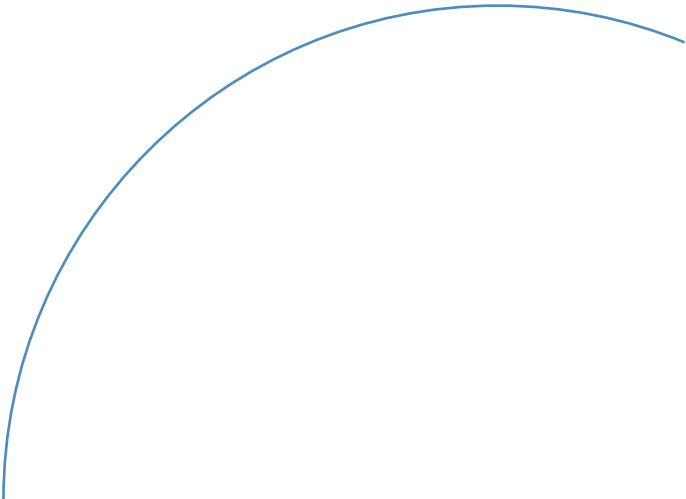
[„open-sources“) volně přístupných na internetu. Všechny vyjmenované programy zpracovávají naměřená surová data postupně v jednotlivých na sebe navazujících krocích, použité metody pro úpravu chromatogramů jsou více méně totožné.

Posledním cílovým krokem, v řadě pátým, je vlastní statistická analýza a interpretace nalezených výsledků – metabolomické experimenty a studie generují velké množství vícerozměrných dat, které je nutno efektivně statisticky zpracovat, interpretovat, prezentovat a archivovat. Tento závěrečný krok metabolomického workflow je obvykle časově velmi náročný a vyžaduje specializované matematicko-statistické metody vyplývající z charakteru získaných matic dat. Pro vyvození správných závěrů celého experimentu je však klíčový a je nutno mu věnovat stejnou pozornost jako plánování experimentu, zpracování vzorku nebo vlastní analýze vzorků. Nejčastěji používanými statistickým metodami jsou dnes vícerozměrné modely. Tyto statistické modely používané v metabolomice lze obecně rozdělit na dvě hlavní skupiny – v literatuře označované za „unsupervised“ a „supervised“. První skupina unsupervised metod analyzuje latentní proměnné (skryté proměnné) jedné zdrojové matice X, například metoda hlavních komponent, faktorová analýza nebo shluková analýza. Druhou supervised skupinou jsou metody, které analyzují latentní strukturu dvou a více matic X, Y prostřednictvím vztahu mezi latentními proměnnými, například kanonická korelační analýza, metoda PLS. V metabolomických studiích v oblasti bezpečnosti potravin se prioritně využívají tři základní statistické metody – analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA), metoda PLS (Partial Least Square, Projection of Latent Structure, PLS) – v českém překladu někdy uváděná jako metoda částečných nejmenších čtverců nebo metoda projekce latentních struktur a poslední metodou je její matematická varianta ortogonální – PLS (OPLS).

Metabolomická studie může dále pokračovat v následujících „nástavbových“ krocích, kterými jsou především identifikace vybraných metabolitů jako tzv. biomarkery,

výběr kandidátských biomarkerů, které budou nejlépe charakterizovat určité specifické metabolomické dráhy a následně jejich validace, ověření na reálných vzorcích. Pro výběr vhodných kandidátských biomarkerů se používají grafické zobrazovací techniky, které jsou součástí vícerozměrných statistických metod, například S-graf (S-plot). K chemické identifikaci se používají dva základní nástroje, prvním nástrojem je srovnání naměřených přesných hmot m/z (accuracy mass) jednotlivých metabolitů s některou z metabolomických databází, které jsou dostupné na internetu, například METLIN, KEGG a HMDB. Druhým nástrojem jsou speciální, vysoce sofistikované softwary, které umí pomocí analýzy hmotnostních spekter s vysokým rozlišením molekulárního iontu neznámého metabolitu v kombinaci s fragmentačními hmotnostními spektry identifikovat a predikovat chemické struktury s vysokou statistickou pravděpodobností, případně umožňují provádět následnou confirmaci navržených chemických struktur pro metabolity identifikované na základě srovnání s metabolomickou databází. Takovým programem je například MassFrontier [83].

Provedení celého metabolomického postupu je dnes při vývoji nových analytických metodik na bázi „omik“ velmi časově náročné a v konečném důsledku vede k výměru malého počtu specifických biomarkerů, které charakterizují zkoumaný biochemický děj, například použití anabolických steroidů ve výkrmu hospodářských zvířat. Tyto vybrané a následně validované biomarkery se pak analyzují „klasickými“ cílenými metodami. Dnes nejnovějším trendem v bioanalýze je využívat ke zkoumání jednoho biologického jevu více omických metod dohromady. Současný vývoj analytických metod jednoznačně směřuje k „multi-omikám“, které se v krátké budoucnosti stanou dominantními v široké oblasti použití.



6. DISKUZE – VYDĚLÁM NEBO SPÁCHÁM TRESTNÝ ČIN?

Anabolické steroidy – AAS jsou pro své významné anabolické účinky, které jsou již řadu let dobře známé, častokrát „využívány“ jako je tomu například ve sportovním doping. Anabolické steroidy jsou však využívány i v ekonomicky rozvinutých částech světa ve výkrmu hospodářských zvířat pro svou schopnost akcelarovat růst svaloviny a tím urychlit a zefektivnit výkrm a zisk z prodaného masa. Kosterní sval je ekonomicky nejvýznamnější tkáň v živočišné výrobě a aplikace anabolických steroidů je ve většině případů cílena právě na něj. Nárůst tělesných parametrů je nejlépe zdokumentován v literatuře u masného skotu po použití steroidních implantátů. AAS aplikované ve formě implantátů mohou zvýšit průměrný denní přírůstek o 21 % a zlepšit konverzi krmiva o 11 % u skotu ve výkrmu. Kromě toho se hmotnost jatečně upraveného těla zvýší o 7 % díky implantaci. Navíc bylo rovněž uvedeno 5% zvýšení velikosti žebí, 7% snížení tukové vrstvy a 5% snížení tukového mramorování [84]. Například další studie Perry a kol. porovnávali účinky steroidních implantátů na efektivitu a složení těla u vorů Holstein, Angus a Angus x Simmental. Denní přírůstky hmotnosti se zvýšily o 17 %, 26 % a 21 % u holštýnských, angusových a křížených volů. Použité implantáty s trembolonem a estradiolem zvýšily celkové denní přírůstky bílkovin v průměru o 23 % [85]. Naše experimentální studie provedená na prasatech po aplikaci testosteronu zvýšila hmotnostní přírůstek v průměru o 7 až 11 % a zlepšila konverzi krmiva v průměru o 4–5 %.

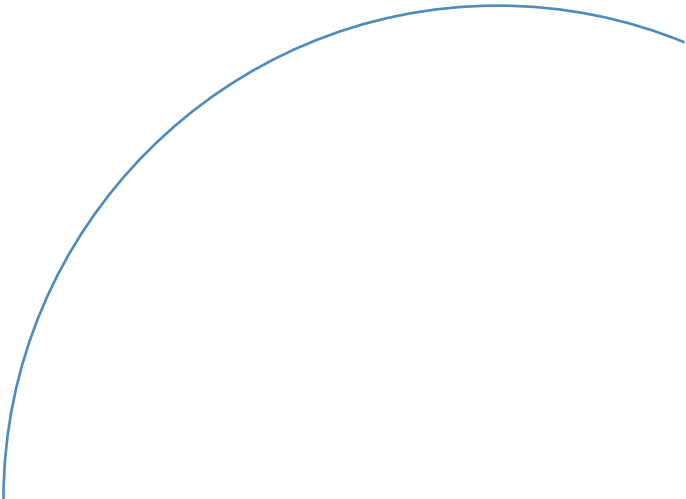
Poté, co se začal intenzivně vědecky zkoumat potenciální negativní vliv AAS na lidské zdraví a byla prokázána celá řada vedlejších účinků jejich konzumace, některé státy začaly využívání AAS ve výkrmu omezovat a regulovat vymezením ve své národní legislativě.

Jak již bylo několikrát uvedeno, členské státy EU se již před čtvrt stoletím dohodly na **absolutním zákazu** používání AAS ve výkrmu hospodářských potravinových zvířat. Důvody pro tento zákaz byly odborně zdůvodněny ve dvou rozsáhlých zprávách Evropské komise vydaných v roce 1999 a 2002, které dospěly na základě provedených toxikologických studií k závěru, že přítomnost steroidních

hormonů v masných výrobcích, může být potenciálně škodlivá pro lidské zdraví prostřednictvím narušujících endokrinní činnosti nebo pro své karcinogenní účinky u člověka, a to zvláště v reprodukčních orgánech a v mléčné žláze (SCVPH 1999, SCVPH 2002) [53, 54].

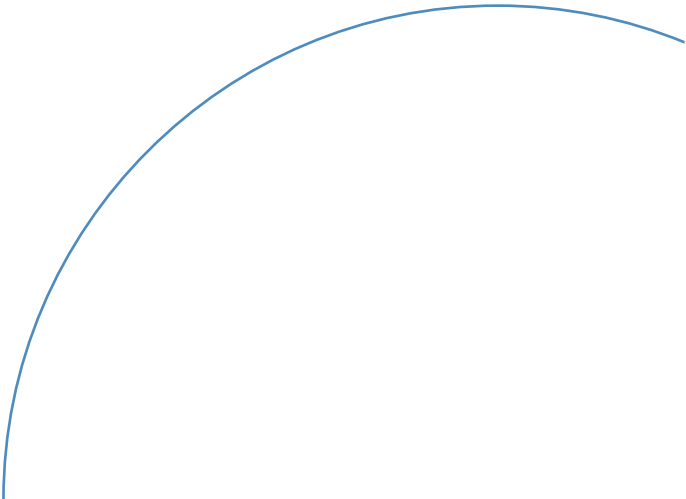
Vědecké názory na důvodové zprávy Evropské komise však nejsou jednotné; následná dvě stanoviska zveřejněná Výborem pro veterinární výrobky ve Spojeném království (UK), neprokázaly shodu s výsledky dřívějších studií provedených na základě požadavků Evropské komise (VPC 1999, VPC 2006) [55, 56]. Například druhá z těchto dvou britských zpráv (VPC 2006) uvádí jako odhad nejhoršího možného scénáře situaci, kdy by ženy po menopauze konzumovaly kilogram vnitřích orgánů (konkrétně ledviny) denně s obsahem nejvyšší koncentrace estradiolu (s průměrnou koncentrací 56 ng kg⁻¹). Tato nepřímá expozice steroidů z reziduí by zvýšila hladinu estrogenu pouze o 0,01 % oproti průměrné denní endogenní produkci organismu.

Nejen na základě tohoto je patrné, že vlastní účinky reziduí steroidních hormonů, včetně AAS, nelze v organismu vykládat jednotným způsobem. Ve světě obecně převládá názor, že vzhledem k nepatrnému reziduálnímu množství použitých hormonů, které se v těle zvířat pohybuje v rozmezí běžných fyziologických hodnot látek s odpovídajícím biologickým účinkem (endogenních hormonů), není riziko ve smyslu ohrožení zdraví konzumentů významné. Zákaz v evropských zemích vychází hlavně z odmítavého postoje široké veřejnosti k tomuto typu zvyšování produkce a z výše uvedeného prosazovaného principu evropské potravinové politiky, který zaručuje ochranu zdraví všem spotřebitelům. V této souvislosti se hovoří i o jiných faktorech než čistě toxikologických a zdravotních, z etického pohledu nepříjemných, např. zátěž pro zvíře při nadměrné stimulaci růstu nebo vyvolané nadměrné produkci mléka či vajec [46, 47 a 50]. Někdy se rovněž spekuluje, že zákaz může mít více co dočinění s regulováním obchodu a ochranné politiky EU, což vedlo a stále vede k obchodním sporům mezi EU a USA v rámci Světové obchodní organizace WTO [57].



7. ZÁVĚR

Závažná zdravotní rizika spojená s používáním anabolických steroidů byla již vědecky publikována a prokázána v celé řadě studií a dnes jsou, i díky medializaci zejména v souvislosti s užíváním u vrcholových sportovců, obecně známá široké veřejnosti. Relativně snadná dostupnost těchto látek na „černém“ trhu v dnešní době významně zvyšuje pravděpodobnost jejich zneužívání, a to především ve sportovním doping, vrcholovém i amatérském, při použití k zakázané stimulaci růstu svalové hmoty hospodářských zvířat, a rovněž ke zvýšení kvality svaloviny (snížení obsahu tuku) při produkci potravin živočišného původu. EU k této problematice používání různých stimulatorů růstu, včetně hormonálně účinných látek ve výkrmu hospodářských zvířat, na rozdíl od jiných průmyslově vyspělých států světa zaujala zásadní stanovisko na principu nulové tolerance, kdy bezpečnost potravin je základem pilířem evropské potravinové politiky, který zaručuje ochranu zdraví spotřebitelů. Ke kontrole dodržování tohoto zákazu je dnes, vedle klasických analytických metod, nutno intenzivně hledat nové analytické postupy, které by účinně bránily a odhalovaly používání zejména nových neznámých syntetických preparátů derivátů androgenních steroidů a nových způsobů podání. V tomto ohledu se jako velmi perspektivní ukazují nové analytické přístupy na základě metabolomiky a proteomiky, ale práce na jejich výzkumu a standardizaci jsou teprve na počátku.



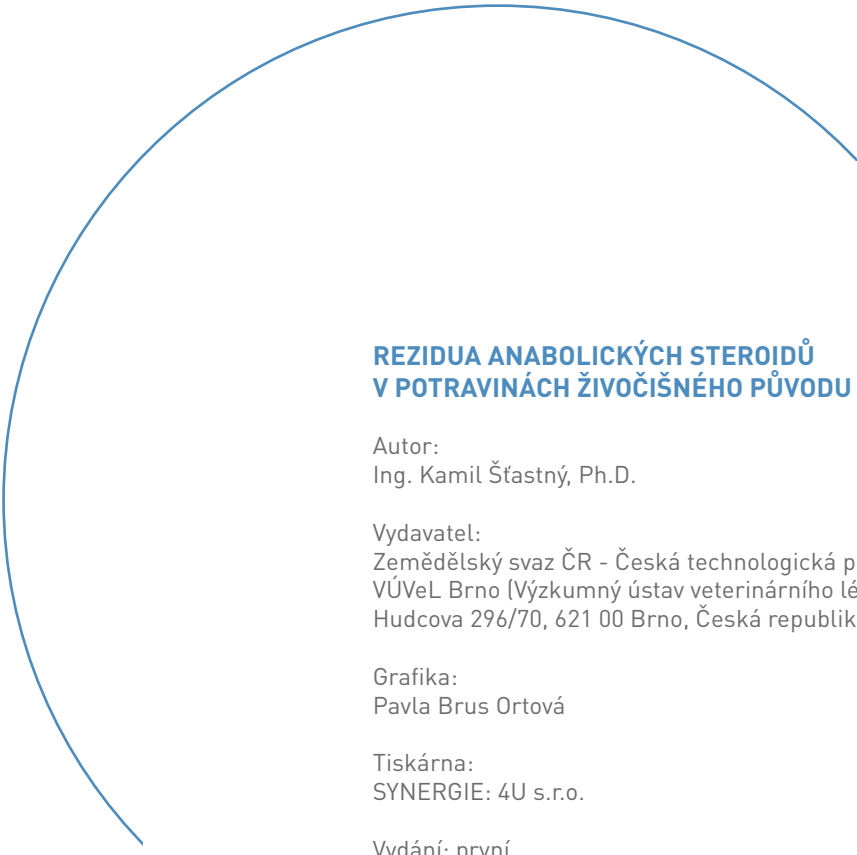
8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] O. Hanč, Z. Pádr (1982), *Hormony. Úvod do jejich chemie a biologie*, Academia, nakladatelství ČAV, Praha, 2. vydání.
- [2] IUPAC, (2010), *The nomenclature of steroids*. Dostupné na <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid/>
- [3] H. L. J. Makin, D. B. Gower, D. N. Kirk (Editor), (1995), 1-st. edition, *Steroid Analysis*, Blackie Academic and Professional, ISBN: 0-7514-0128-5.
- [4] Červinka O. et al, 1987, *Chemie organických sloučenin*, Nakladatelství SNTL, Praha.
- [5] Melichar B. et al., 1987, *Chemická léčiva* (3. vydání), Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha.
- [6] J. Koolman, K.-H. Roehm, (2005), *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, <http://www.thieme.de> , ISBN 3-13-100372-3.
- [7] S. Trojan a kol., (2003), *Lékařská fyziologie*, 4. přepracované vydání, Grada Publishing, Praha, ISBN 80-247-0512-5.
- [8] J. Doubek, E. Matalová, I. Uhríková, (2014), *Přehled fyziologie I. a II. pro VFU Brno*, dostupné na <http://kreativnifyziologie.upol.cz>.
- [9] D. Voet, J.G. Voetová, *Biochemie*, Victoria Publišing, ISBN 80-85605-44-5
- [10] Kicman A.T., *Pharmacology of anabolic steroids*, Review, *British Journal of Pharmacology* (2008) 154, 502–521; doi:10.1038/bjp.2008.165
- [11] U. Westphal, (1986) *Steroid-Protein Interactions*. Berlin, Springer-Verlag.
- [12] Behre H.M. et al, (2004), *Testosterone, Action, Deficiency, Substitution*, Third Edition, Cambridge University Press, UK, ISBN 0-521-83380-9
- [13] METLIN, *Metabolomics database*, The Scripps Research Institute, San Diego, California, USA (www.metlin.com, www.scripps.edu).
- [14] E. Houghton, M. C. Dumasia, (1980), *Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: The identification of some 16-oxygenated metabolites of 19- nortestosterone*. *Xenobiotica*, 10(5), 381-390.
- [15] M. Maghuin-Rogister, A. Bosseloire, P. Gaspar, C. Dasnois, G. Pelzer, (1988), *Identification of 19-nortestosterone (nandrolone) in the urine of non-castrated male pigs* *Ann. Med. Vet.* 132, 437.
- [16] B. De Geus, F. Delbeke, R. Meeusen, P. Van Eenoo, K. De Meirleir, B. Busschaert, (2004), *Norandrosterone and noretiocholanolone concentration before and after submaximal standardized exercise*. *International Journal of Sports Medicine*, 25(7), 528-532.
- [17] L. Dehennin, P. Silberzahn, A. Reiffsteck, I. Zwain, (1984), *19-norandrostenedione and 19-nortestosterone in human and equine follicular fluid. incidence on the accuracy of radioimmunoassay of some androgens*. *Pathologie Biologie*, 32(8), 828-829.
- [18] E. T. Bagu, S. Cook, C. L. Gratton, N. C. Rawlings, (2006), *Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls*, *Reproduction*, 132(3), 403-411.
- [19] A. A. Moura, B. H. Erickson, (2001), *Testicular development, histology and hormone profiles in three yearling angus bulls with spermatogenic arrest*, *Theor. riogenology*, 55(7), 1469-1488.
- [20] M. L. Scippo, P. Gaspar, G. Degand, F. Brose, G. Maghuin-Rogister, P. Delahaut, J. P. Willemart, (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.

- [21] C. J. M. Arts, M. J. Van Baak, J. M. P. Den Hartog, (1991), Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves, *Journal of Chromatography A* 564, 429-444.
- [22] K. Nakada, M. Moriyoshi, T. Kaka, G. Watanbe, K. Taya, (2000), Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinising hormone, estradiol-17 β , testosterone, progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty, *Domestic Animal Endocrinology* 18, 57-69.
- [23] H. Dobson, J. E. F. Rankin, W. R. Ward, (1977), Bovine cystic ovarian disease: Plasma hormone concentrations and treatment, *The Veterinary Record* 101(23), 459-461.
- [24] R. J. Heitzman, (1994), In *Veterinary Drug Residues: residues in food producing animals and their products: reference materials and methods*, Blackwell Scientific Publications, ISBN: 0-632-03786-5.
- [25] F. Schwarzenberger, G. S. Toole, H. L. Christie, J. I. Raside, (1993), Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs, *Acta Endocrinologica* 128, 173-177.
- [26] C. S. Park, Y. J. Yi, (2002), Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons, *Animal Reproduction Science* 73, 3-61.
- [27] S. A. McCoard, T. H. Wise, J. J. Ford, (2003), Endocrine and molecular influences on testicular development in Meishan and White Composite boars, *Journal of Endocrinology* 78, 405-416.
- [28] S. Walker, O. W. Robison, C. Whisnant, J. P. Cassady, (2004), Effect of divergent selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in boars, *Journal of Animal Science* 82, 2259-2263.
- [29] J. Nekola, (2000), *Doping a sport, Historické kořeny dopingu*, 1. vyd., Olympia, Praha, s. 8 - 70. ISBN 80-7033-137-2.
- [30] L. Pyšný, (1999), *Doping-zdraví-výkon*, 1.vyd. Praha: Karolinum, s.14-57, ISBN 80-7184-813-1.
- [31] Sustanon 250 injekční roztok, Registrační dokumentace CZ Reg. 56/357/91-C, Souhrn údajů o přípravku (SPC), 2014, sp.zn. suks56636/2014.
- [32] Kellermeier, J.D.; Tittor, A.W.; Brooks, J.C.; Galyean, M.L.; Yates, D.A.; Hutcheson, J.P.; Nichols, W.T.; Streeter, M.N.; Johnson, B.J.; Miller, M.F. Effects of zilpaterol hydrochloride with or without an estrogen-trenbolone acetate terminal implant on carcass traits, retail cutout, tenderness, and muscle fiber diameter in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 2009, 87, 3702-3711.
- [33] Fontana, K.; Campos, G.E.R.; Staron, R.S.; Cruz-Höfling, M.A. Effects of Anabolic Steroids and High-Intensity Aerobic Exercise on Skeletal Muscle of Transgenic Mice. *PLoS ONE*. 2013, 8, e80909.
- [34] Elgendy, H.; Alhawary, A.; El-Shahat, M.; Ali, A. Effect of Anabolic Steroids on the Cardiac and Skeletal Muscles of Adult Male Rats. *Int. J. Clin. Dev. Anat.* 2018.
- [35] Carson, J.A.; Manolagas, S.C. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone* 2015, 80, 67-78.
- [36] Hijazi, M.M.; Azmi, M.A.; Hussain, A.; Naqvi, S.N.H.; Perveen, R.; Hijazi, S. Androgenic Anabolic Steroidal-Based Effects on the Morphology of Testicular Structures of Albino Rats. *Pak. J. Zool.* 2012, 44, 1529-1537.
- [37] Tousson, E.; El-Moghazy, M.; Massoud, A.; Akel, A. Histopathological and Immunohistochemical Changes in the Testes of Rabbits After Injection With the Growth Promoter Boldenone. *Reprod. Sci.* 2012, 19, 253-259.
- [38] Kahal, A.; Allem, R. Reversible effects of anabolic steroid abuse on cyto-architectures of the heart, kidneys and testis in adult male mice. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 106, 917-922.
- [39] Yarrow, J.F.; Conover, C.F.; McCoy, S.C.; Lipinska, J.A.; Santillana, C.A.; Hance, J.M.; Cannady, D.F.; VanPelt, T.D.; Sanchez, J.; Conrad, B.P.; et al. 17 β -Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one (trenbolone) exhibits tissue selective anabolic activity: Effects on muscle, bone, adiposity, hemoglobin, and prostate. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011, 300, E650-E660.
- [40] M. O'Keeffe (editor), (2000), *Residue analysis in food, Principles and Applications*, Harwood Academic Publishers, ISBN 90-5702-441-1.
- [41] J. Ruprich, J. Drápal, I. Řehůřková, K. Šťastný, M. Kalivodová, (2015) Cattle tissues as a source of cadmium for consumers, *ACTA VET. BRNO*, 84, doi:10.2754/avb201584030000 (viz.příloha).
- [42] Beyermann K., *Organische Spurenanalyse*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1982).
- [43] United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service (USDA-FAS), Livestock and poultry: World Markets and Trade, October 2015, dostupné na: http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf.
- [44] Český statistický úřad, Kobes Z., Spotřeba potravin – 2018 (Prosinec 2019), Graf 2: Spotřeba masa v hodnotě na kosti, dostupné na: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2018>.
- [45] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), *Food and Nutrition in Numbers*, 2014, Rome, ISBN 978-92-5-108617-9.

- [46] H. Herbold, et al.: An overview of different aspects dealing with the analysis of androgenic anabolic steroids. The Netherlands: RIVM, 2004, 1-33.
- [47] R. J. Heitzman, (1975) The effectiveness of anabolic agents in increasing rate of growth in farm animals; report on experiments in cattle, Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. 5, 89-98.
- [48] K. P. Lone, (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(2), 93-209.
- [49] J. Kay (ed), (2010), Analyses for Hormonal Substances in Food-Producing Animals, ISBN: 978-0-85404-198-5.
- [50] J. Serratosa, A. Blass, B. Rigau, B. Mongrell, T. Rigau and col., (2006), Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in foodproducing animals: a European Union perspective, Rev.sci.tech.Off.int.Epiz., , vol. 25, no. 2, 637-653.
- [51] Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of β -agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC, Dostupné na: <http://eur-lex.europa.eu> .
- [52] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, Dostupné na: <http://eur-lex.europa.eu> .
- [53] Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (SCVPH). (1999). Assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. Dostupné na: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out21_en.pdf .
- [54] Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (SCVPH), (2002), Review of previous SCVPH opinions of 30 April 1999 and 3 May 2000 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products, Dostupné na http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out50_en.pdf .
- [55] Veterinary Products Committee (VPC), (1999), Executive summary and critical evaluation of the scientific reasoning and methods of argument adopted in the opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health which assessed the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. Dostupné na: <http://www.vmd.gov.uk/vpc/Working/finalrep.pdf>.
- [56] Veterinary Products Committee (VPC), (2006), Risks Associated with the Use of ormonal Substances in Food-Producing Animals. Report of the Veterinary Products Committee, Dostupné na: http://www.vmd.gov.uk/vpc/Working/Hormones_report.pdf .
- [57] C. Charlier and M. Rainelli, (2002), Hormones, risk management, precaution and protectionism: An analysis of the dispute on hormone-treated beef between the European Union and the United States, European Journal of Law and Economics, 14(2), 83-97.
- [58] European Food Safety Authority (EFSA), Report for 2021 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products, EFSA Supporting publication 2021:EN-1997.
- [59] 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044), Official Journal of the European Communities, L 221, 17 August 2002.
- [60] A. Církva, K. Šťastný, (2013), Method for the determination of thyreostats in milk samples using LC-MS/MS, Food Additives and Contaminants, Part A, (viz. příloha) <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.787651>.
- [61] S. Boschi, R. Deiasio, P. Mesini, G.F. Bolelli, R. Sciajno, R. Pasquali, M. Capelli, (1994) Clinical Chemical Acta 231 107.
- [62] L. T. Di Benedetto, T. Dimitrakopolous, R. M. Davy, P. J. Iles, (1996) Anal. Lett. 29, 2125.
- [63] H. F. De Brabander, H. Noppe, K. Verheyden, J. Vanden Bussche, K. Wille, L. Okerman, L. Vanhaecke, W. Reybroeck, S. Ooghe and S. Croubels, (2009), Residue analysis: Future trends from a historical perspective. Journal of Chromatography A, 1216(46), 7964-7976.
- [64] A. R. Mc Kinney, (2009), Modern techniques for the determination of anabolic –androgenic steroid doping in the horse, Bioanalysis, 1(4), 785-803.
- [65] K. Skoupá, K. Šťastný and Z. Sládek, (2022), Anabolic Steroids in Fattening Food-Producing Animals, A Review; Animals 2022, 12.
- [66] A. A. M. Stolker and U. A. Th. Brinkman, (2005), Analytical strategies for analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals a review, Journal of Chromatography A, 1067 (1-2), 15-33.
- [67] J. P. Scarth, J. Kay, P. Teale, C. Akre, B. Le Bizec, H. F. De Brabander, L. Vanhaecke, L. Van Ginkelf, J. Points, (2012), A review of analytical strategies for the detection of 'endogenous' steroid abuse in food production, Drug Test. Analysis 4, 40-49.

- [68] B. Kinsell, J. O'Mahony, E. Malonec, M. Moloney, H. Cantwell, A. Furey, M. Danaher, (2009), Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis, *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977–8015.
- [69] Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, Document 32017R0625;
- [70] Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC; Document 32021R0808.
- [71] EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) for Specific Pharmacologically Active Substances in Specific Animal Matrices (2022).
- [72] D. H. Catlin, M. H. Sekera, B. D. Ahrens, B. Starcevic, Y. Chang, C. K. Hatton, (2004), Tetrahydrogestrinone: Discovery, synthesis and detection in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(12), 1245–1249.
- [73] Official Medicines Control Laboratories (OMCLs): Market Surveillance of Suspected Illegal Products, MSSIP003: Illegal Anabolic Steroids - Summary Report 2018
- [74] Tircova B., Kozlík P., Bosáková Z., (2018), Development of an UHPLC- MS/MS method for the determination of anabolic steroids currently available on the black market in the Czech Republic and Slovakia, *Drug Testing and Analysis* - November 2018
- [75] O. Fiehn, (2002), Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes, *Plant Molecular Biology* 48: 155–171.
- [76] S. G. Villas-Bôas, U. Roessner, M. A. E. Hansen, J. Smedsgaard, J. Nielsen (ed.), (2007), *Metabolome analysis: An introduction*, J. Wiley, New Jersey.
- [77] P. Teale, E. Houghton, (2010), Metabolism of anabolic steroids and their relevance to drug detection in horseracing, *Bioanalysis* 2, 1085.
- [78] J. P. Scarth, J. Kay, P. Teale, C. Akre, B. Le Bizec, H. F. De Brabander, L. Vanhaecke, L. Van Ginkel, J. Points, (2012) A review of analytical strategies for the detection of 'endogenous' steroid abuse in food production, *Drug Test. Analysis* 4 (Suppl. 1), 40–49.
- [79] G. Pinel, S. Weigel, J.-P. Antignac, M.H. Mooney, C. Elliott, M.W.F. Nielen, B. Le Bizec, (2010), Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle, *Trends in Anal. Chem.*, Vol. 29, No. 11, 1269–1280.
- [80] G. Dervilly-Pinel, S. Weigel, A. Lommen, S. Chereau, L. Rambaud, M. Essers, J.-P. Antignac, M.W.F. Nielen, B. Le Bizec, (2011), Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves, *Anal. Chim. Acta* 700, 144–154.
- [81] G. Dervilly-Pinel, F. Courant, S. Chéreau, A. L. Royer, F. Boyard-Kieken, J.-P. Antignac, F. Monteau, B. Le Bizec, (2012), Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances, *Drug Testing Analysis*, 4 (Suppl.1), 59–69.
- [82] W. B. Dunn, N. J. C. Bailey, H. E. Johnson, (2005), Measuring the metabolome: current analytical technologies, *The Analyst* 130 (5), 606.
- [83] R. Mistrik, MassFrontier, version 7.0, HighChem Ltd. and Thermo Fisher Scientific Ltd., dostupné na: <http://www.highchem.com>
- [84] Johnson, B. J.; White, M. E.; Hathaway, M. R.; Christians, C. J.; Dayton, W. R. Effect of a combined trenbolone acetate and estradiol implant on steady-state IGF-I mRNA concentrations in the liver of wethers and the longissimus muscle of steers. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 491–497.
- [85] Perry, T. C.; Fox, D. G.; Beermann, D. H. Effect of an implant of trenbolone acetate and estradiol on growth, feed efficiency, and carcass composition of Holstein and beef steers. *J. Anim. Sci.* 1992, 69, 4696–4702.
- [86] L. Schiffer et al., Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2019.



REZIDUA ANABOLICKÝCH STEROIDŮ V POTRAVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

Autor:
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

Vydavatel:
Zemědělský svaz ČR – Česká technologická platforma pro zemědělství
VÚVeL Brno (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Česká republika)

Grafika:
Pavla Brus Ortová

Tiskárna:
SYNERGIE: 4U s.r.o.

Vydání: první

Rok vydání: 2022

Náklad: 1000 výtisků

ISBN: 978-80-7672-037-4

Za obsahovou a jazykovou správnost díla odpovídá autor.

