

Ocena aktywności estrogennej mleka i jego przetworów z wykorzystaniem testu *in vitro* aktywacji transkrypcyjnej receptora estrogenowego

Assessment of the estrogenic activity of milk and milk products with the use of *in vitro* estrogen receptor transactivation bioassay

Sylwia Stypuła-Trębas^(a, b, c, d, e), Maria Minta^(a, b, d, f), Lidia Radko^(b, d), Andrzej Posyński^(f)

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Zakład Farmakologii i Toksykologii. Kierownik: prof. dr hab. A. Posyński

^(a) koncepcja

^(b) zebranie materiałów do badań

^(c) opracowanie tekstu

^(d) zebranie piśmiennictwa

^(e) opracowanie statystyczne wyników

^(f) merytoryczny nadzór nad ostateczną wersją artykułu

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono porównanie aktywności estrogennej 30 produktów mleczarskich ogólnie dostępnych na polskim rynku. Próbkami wybranymi do badania były odtłuszczone, półtłuste i tłuste mleko krowie, mleko kozie, ser pleśniowy, jogurt, twaróg, śmietana i masło. Aktywność estrogenną w próbkach badano z użyciem testu *in vitro* opartego na transgenicznym komórkach drożdży po hydrolizie enzymatycznej i ekstrakcji dSPE. Aktywność estrogenną stwierdzono w 56,7% próbek. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy zawartością tłuszczu w badanych próbkach a zmierzoną aktywnością estrogenną. Najwyższą aktywność estrogenną stwierdzono dla próbek masła, najniższą dla mleka odtłuszczonego. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że mleko i jego produkty mogą być ważnym źródłem estrogenów, zwłaszcza dla grup najbardziej wrażliwych.

Słowa kluczowe: mleko, produkty mleczne, estrogeny, ksenoestrogeny

SUMMARY

The work presents a comparison of estrogenic activity measured in 30 milk products generally available on the Polish market. The samples selected for the examination were skim, semi-skim, and full-fat cow's milk, goat's milk, blue cheese, yogurt, cottage cheese, sour crème, and butter. Estrogenic activity in samples was determined using *in vitro* yeast reporter bioassay after enzymatic hydrolysis and dSPE extraction. Estrogenic activity was found in 56,7% of the samples. There was a positive correlation between the fat content of the product and estrogenic activity. The highest estrogen activity was found in butter; the lowest, in skim milk. Our results lead to the conclusion that milk and its products may be an important source of estrogens, especially for the most vulnerable populations.

Key words: milk, milk products, estrogens, xenoestrogens

WSTĘP

Związki endokrynnie czynne (*endocrine-disrupting compounds*, EDCs) to grupa substancji naturalnych i antropogennych, zaburzających syntezę, aktywność lub metabolizm hormonów płciowych w organizmie ludzi i zwierząt. Konsekwencją ich działania mogą być trwałe zmiany funkcji lub wrażliwości na działanie hormonów, prowadzące do za-

burzeń dojrzewania płciowego, rozrodu a nawet do rozwoju hormonozależnych nowotworów [1]. Ważnym źródłem EDCs jest żywność pochodzenia zwierzęcego, w której obok naturalnych hormonów występują także niesteroidowe związki naturalne i antropogenne [2].

Mleko jest jednym z najczęściej spożywanych produktów spożywczych na świecie, a jednocześnie bogatym źródłem substancji odżywczych, witamin

i minerałów. Z drugiej strony, jest też głównym źródłem naturalnych estrogenów w diecie człowieka. Oszacowano, że 60–70% pobranych z dietą naturalnych estrogenów pochodzi z mleka i jego produktów [2]. Stężenia estrogenów w mleku zależne są od stanu fizjologicznego krowy, osiągając najwyższe poziomy w okresie ciąży [3]. Wprowadzenie nowoczesnych metod hodowli, ukierunkowanych na wzrost wydajności mlecznej związane jest z zacieleniem krów w odstępach rocznych oraz wydłużonym okresem udoju aż do ostatniego trymestru ciąży, kiedy poziom estrogenów w mleku osiąga bardzo wysokie stężenia [4]. Także stosowane do regulacji i synchronizacji rui prostaglandyny mają wpływ na wzrost poziomu estrogenów [5]. W rezultacie, współczesny konsument narażony jest na wyższe poziomy estrogenów w mleku aniżeli miało to miejsce w przeszłości [3].

Co więcej, obok naturalnych estrogenów mleko może zawierać szereg innych, zróżnicowanych strukturalnie ksenoestrogenów. Szczególnie wysoką aktywność estrogeną wykazują stosowane nielegalnie estrogeny syntetyczne, jak estry estradiolu, etnyloestradiol, dienestrol, heksestrol, dietylostilbestrol. Ponadto obecne w diecie krów fitoestrogeny (ekwol, kumestrol, daidzeina, genisteina), mykoestrogeny (zearalenon i jego metabolity), pozostałości endokrynnie czynnych pestycydów i zanieczyszczeń, jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenylole, bisfenol A, 2-izopropylotioksanton mogą wpływać na aktywność estrogeną mleka [6].

Ponieważ estrogeny są udowodnionymi czynnikami ryzyka rozwoju nowotworów hormonozależnych [7], ich relatywnie wysoka zawartość w mleku budzi obawy, że dieta bogata w mleko i jego produkty może powodować zaburzenia hormonalne a nawet nowotwory hormonozależne [2, 3]. Potwierdzeniem tych obaw wydają się badania epidemiologiczne przeprowadzone w ostatnich latach, wskazujące na związek pomiędzy wysokim spożyciem mleka i jego produktów a wzrostem ryzyka wystąpienia raka endometrium i jajnika u kobiet [8] oraz raka prostaty u mężczyzn [9].

Dla oceny ryzyka dla zdrowia konsumentów i zapewnienia bezpieczeństwa grup najbardziej wrażliwych, jak niemowlęta i dzieci, istotne jest badanie wpływu ksenohormonów na układ hormonalny z użyciem dostępnych modeli *in vitro* oraz *in vivo* [10]. Do oceny narażenia na obecne w diecie estrogeny szczególnie przydatne są testy *in vitro*, oparte na ich poznanym receptorowym mechanizmie działania. Na podstawie interakcji ligand – receptor estrogenowy α ($ER\alpha$), pozwalają one ocenić całko-

witą aktywność estrogeną próbki [11]. Testy te uwzględniają nie tylko wszystkie obecne w badanej próbce estrogeny ale także interakcje między nimi (addytywność, synergizm i antagonizm). W tym kontekście mogą pomóc zrozumieć i przewidzieć wpływ złożonych mieszanin na organizm. Wśród dostępnych narzędzi, testy oparte na transgenicznym szczepach drożdży są szybkie, wydajne, stosunkowo niedrogie i zapewniają skuteczną strategię przesiewową [6, 11].

Celem przeprowadzonych badań był pomiar i porównanie aktywności estrogennej mleka i wybranych produktów mleczarskich różnych producentów. Aktywność estrogeną mierzono z uwzględnieniem metabolitów estrogenów, po przeprowadzeniu hydrolizy enzymatycznej. W badaniach użyto test *in vitro*, oparty na transgenicznym komórkach drożdży, w których w obecności estrogenów dochodzi do aktywacji ludzkiego receptora estrogenowego ER ($hER\alpha$) a w konsekwencji do ekspresji genu reporterowego, jakim jest białko zielonej fluorescencji yEGFP [11]. Białko yEGFP wykazuje fluorescencję, proporcjonalną do aktywności estrogennej próbki. Dla zbadania korelacji między zawartością tłuszczu a aktywnością estrogeną mleka, do badań włączono produkty o zróżnicowanej zawartości tłuszczu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły produkty mleczarskie o zróżnicowanej zawartości tłuszczu, oferowane przez różnych producentów, dostępne w placówkach handlowych na terenie województwa lubelskiego. Badaniem objęto 30 produktów: mleko krowie odtłuszczone (6 rodzajów), mleko krowie półtłuste (6 rodzajów), mleko krowie pełne (4 rodzaje), masło (6 rodzajów), mleko krowie zagęszczone (2 rodzaje), jogurty (2 rodzaje), 1 mleko kozie, 1 ser pleśniowy, 1 serek wiejski, 1 śmietanę.

Zhomogenizowany materiał, poddano hydrolizie enzymatycznej przy pomocy β -glukuronidazy/arylsulfatazy ślimaka winniczka (*Helix Pomatia*). Hydroliza była przeprowadzana w obecności kwasu L-askorbinowego, w warunkach kontrolowanego pH (zastosowano 0,1 M bufor octanowy o pH 5,0) oraz temperatury (inkubacja przez 18 godzin w temperaturze 37° C).

Następnie próbki poddawano ekstrakcji dyspersyjnej do fazy stałej dSPE (*dispersive Solid Phase Extraction*). W tym celu poddawano je wytrząsaniu z acetonitrylem, schładzano, wirowano i zbierano górną warstwę organiczną. W kolejnym etapie ekstrakt wytrząsano ze stężonym kwasem mrówkowym

i sorbentem na bazie tlenku cyrkonu (Supel Que Z-Sep+, Sigma Aldrich). Po schłodzeniu i odwirowaniu supernatant zbierano i zagęszczano pod strumieniem azotu i rozpuszczano w metanolu. Następnie ekstrakt odtłuszczano przez wytrząsanie z n-heksanem i zagęszczano pod strumieniem azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w acetonitrylu i przechowywano do czasu wykonania testu.

Aktywność estrogeną ekstraktów mleka i jego produktów badano z użyciem testu *in vitro*, opartego na genetycznie modyfikowanym szczepie drożdży *S. cerevisiae* (CEN.PK 102-5B, K20, URA³⁻, HIS³⁻, LEU⁻), zawierającym trwale transfekowany gen ludzkiego receptora estrogenowego (hER α) oraz gen reporterowy białka zielonej fluorescencji (yeast-enhanced green fluorescent protein, *yEGFP*). W obecności ligandów następuje aktywacja transkrypcyjna hER α i wzrost fluorescencji, której intensywność można zmierzyć ilościowo [11].

Ekstrakty badano w trzech powtórzeniach na płytkach 96-dołkowych, w obecności zawiesiny komórek drożdży (250 μ l/dołek) i DMSO (2,5 μ l/dołek). Pomiaru fluorescencji ($\lambda_{Wzb./Em.} = 485/528$ nm) i absorbancji ($\lambda = 620$ nm) dokonywano z użyciem czytnika Synergy 2 SLF Multi Detection Microplate Reader (BioTek[®] Instruments Inc., USA) przed i po 24-godzinnej inkubacji z ciągłym wytrząsaniem (w 30° C). Żywotność komórek drożdży oceniano na podstawie pomiarów gęstości optycznej. Spadek żywotności poniżej 70% decydował o odrzuceniu wyniku i powtórzeniu badania.

Względna aktywność estrogeną analizowanych próbek oceniano w równoważnikach stężenia 17 β -estradiolu (EEQ) na podstawie krzywej kalibracyjnej 17 β -estradiolu., wykorzystując równanie Hilla [6]. W obliczeniach uwzględniano wartości uzyskane dla ślepych próbek odczynnikowych oraz odzysków obliczonych dla próbek wzbogaconych na poziomie 0,1 i 1 μ g/kg. Obliczona średnia wartość odzysku wyniosła 48,3 \pm 3,4% (CV = 14%), granica wykrywalności wynosiła 0,01 μ g/L (μ g/kg).

WYNIKI BADAŃ

W tabeli I przedstawiono wyniki badań mleka i jego produktów, z których wynika, że w 19 spośród 32 zbadanych próbek (53,4%) wykryto aktywność estrogeną w teście *in vitro*. Aktywność estrogeną wykazano w 6 próbkach masła, 2 mleka zagęszczonego, 2 mleka półtłustego, 2 mleka pełnego oraz w mleku odtłuszczonym, mleku kozim, serze pleśniowym, serku wiejskim oraz w śmietanie. Aktywności estrogennej nie zaobserwowano w jogurtach,

w 5 z 6 próbkach mleka odtłuszczonego i 1 mleku pełnym. Jedna próbka serka homogenizowanego wykazała cytotoksyczność w stosunku do drożdży.

Tabela I. Aktywność estrogena mleka i jego produktów (μ g EEQ/kg) zmierzona w teście *in vitro* opartym na drożdżach

Table I. Estrogenic activity of milk and its products (μ g EEQ/kg) measured in the *in vitro* yeast-based bioassay

| Produkt | Zawartość tłuszczu (%) | Aktywność estrogena EEQ (μ g/kg) |
|----------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Jogurt 1 | 2,6 | <0,01 |
| Jogurt 2 | 7 | <0,01 |
| Mleko odtłuszczone 1 | 0,5 | 0,012 |
| Mleko odtłuszczone 2 | 0,5 | <0,01 |
| Mleko odtłuszczone 3 | 0,5 | <0,01 |
| Mleko odtłuszczone 4 | 0,5 | <0,01 |
| Mleko odtłuszczone 5 | 0,5 | <0,01 |
| Mleko odtłuszczone 6 | 0,5 | <0,01 |
| Mleko półtłuste 1 | 2 | 0,019 |
| Mleko półtłuste 2 | 2 | 0,016 |
| Mleko półtłuste 3 | 2 | <0,01 |
| Mleko półtłuste 4 | 2 | <0,01 |
| Mleko półtłuste 5 | 2 | <0,01 |
| Mleko półtłuste 6 | 2 | <0,01 |
| Mleko pełne 1 | 3,2 | 0,068 |
| Mleko pełne 2 | 3,2 | 0,025 |
| Mleko pełne 3 | 3,2 | <0,01 |
| Mleko kozie | 2,5 | 0,014 |
| Mleko zagęszczone 1 | 2,5 | 0,045 |
| Mleko zagęszczone 2 | 4 | 0,030 |
| Ser pleśniowy owczy | 34 | 0,161 |
| Serek homogenizowany | 5,5 | Cytotoksyczność |
| Serek wiejski | 3 | 0,016 |
| Śmietana | 18 | 0,034 |
| Masło 1 | 60 | 0,228 |
| Masło 2 | 82 | 0,124 |
| Masło 3 | 82 | 0,050 |
| Masło 4 | 82 | 0,048 |
| Masło 5 | 82 | 0,033 |
| Masło 6 | 82 | 0,027 |

DYSKUSJA

Przeprowadzone badanie *in vitro* wskazuje na dużą zmienność aktywności estrogennej mleka i jego produktów. Na podstawie obliczonych wartości EEQ (Tabela I) najwyższą względną aktywność estrogeną spośród badanych próbek stwierdzono dla masła (0,228 μ g EEQ/kg) i sera pleśniowego

owczego (0,161 μg EEQ/kg). Spośród różnych rodzajów mleka, najwyższą aktywność estrogenną stwierdzono dla mleka pełnego (0,068 μg EEQ/kg). Najniższe wartości EEQ uzyskano dla mleka odtłuszczonego (od $<0,01$ do 0,012 μg EEQ/kg). Zebrane z piśmiennictwa wyniki badań mleka także wskazują na dużą rozpiętość stężeń estrogenów. Przykładowo w badaniu Tso i Aga [12] w zakresie 71–319 ng/L, z kolei badanie Yang i wsp. [13] oceniło średnią zawartość 17β -estradiolu i jego metabolitów na poziomie 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=20$). Biorąc pod uwagę odmienną metodykę badań oraz fakt, że mleka handlowe są mieszaniną mleka zbieranego od zwierząt w różnym wieku, stanie fizjologicznym i pozostających na różnej diecie, duża zmienność obserwowana pod względem stężeń hormonów nie wydaje się być zaskakująca.

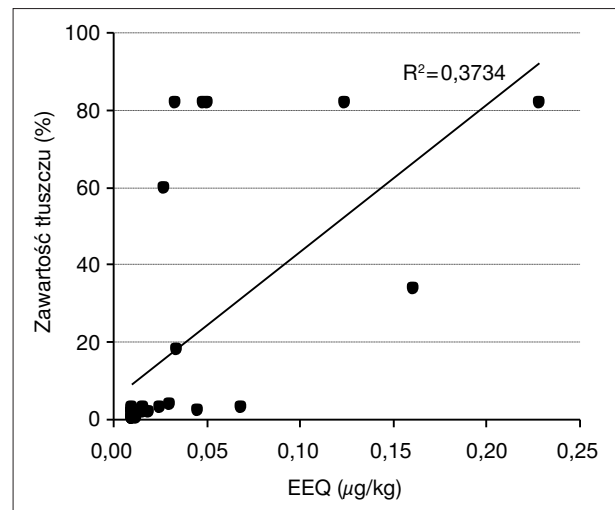
Po inkubacji mleka z wyznakowanymi radioaktywnie estrogenami Wolford i Argoudelis [14] zaobserwowali, że 80% estronu i 65% estradiolu w mleku, jest związana z tłuszczem. Zatem uzasadnione jest założenie, że produkty o wysokiej zawartości tłuszczu będą wykazywały proporcjonalnie wyższą aktywność estrogenną w porównaniu z produktami o niskiej zawartości tłuszczu. Dla zbadania prawdziwości tej hipotezy, zbadano zależność między zawartością tłuszczu a aktywnością estrogenną produktów o zróżnicowanej zawartości tłuszczu, wyrażoną w μg EEQ/kg. Na podstawie obliczonego współczynnika korelacji liniowej Pearsona, który wyniósł $r = 0,61$ ($p = 0,01$), można stwierdzić umiarkowaną korelację dodatnią pomiędzy zawartością tłuszczu a aktywnością estrogenną badanych produktów (Ryc.1). Silniejszą korelację dodatnią pomiędzy zawartością tłuszczu a stężeniem estrogenów w mleku o różnej zawartości tłuszczu stwierdzono także w innych badaniach [3, 6].

W piśmiennictwie brakuje badań *in vitro*, porównujących aktywność estrogenną mleka i jego produktów. Z kolei badania samego mleka często nie uwzględniają bardzo istotnego w badaniach aktywności estrogennej etapu hydrolizy enzymatycznej. Hydroliza enzymatyczna pozwala na uwzględnienie aktywności metabolitów estrogenów, stanowiących ponad 80% całkowitej puli estrogenów w mleku [6]. Co więcej, metabolity estrogenów (glukuroniany i siarczany) mogą być hydrolizowane do wolnych hormonów w przewodzie pokarmowym przez enzymy bakteryjne, jak również *in situ*, przez komórki wykazujące aktywność sulfatazy steroidowej [15].

Niewiele jest także wyników porównawczej analizy ilościowej zawartości estrogenów. Hartmann i wsp. [2] z użyciem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) porównali stę-

żenia samego tylko estronu i jego metabolitów uzyskując najwyższe stężenia, podobnie jak w bieżącym badaniu w maśle (1,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Istotnie niższe stężenia estronu oznaczono kolejno w śmietanie (0,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$), serze Gouda (0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$), jogurcie (0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oraz w mleku (0,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Biorąc pod uwagę bardzo niskie poziomy endogennych estrogenów u dzieci przed pokwitaniem, wysokie spożycie egzogennych estrogenów z diety może prowadzić do zaburzeń równowagi hormonalnej i problemów zdrowotnych w wieku dorosłym. Z przeprowadzonych badań mleka i jego produktów wynika, że produkty o wysokiej zawartości tłuszczu mogą być istotnym źródłem estrogenów. Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że oznaczone wartości EEQ w produktach o wysokiej zawartości tłuszczu bywają na poziomie stężenia estradiolu we krwi dorosłych mężczyzn tj 10-40 ng/l (6), pożądane wydają się dalsze badania aktywności estrogennej mleka i jego produktów z użyciem modeli *in vivo*.



Ryc. 1. Zależność między zawartością tłuszczu a aktywnością estrogenną w mleku i jego produktach ($n=29$). Obliczony współczynnik korelacji $r=0,61$ ($p=0,01$)

Fig. 1. Relationship between the fat content and estrogenic activity in milk and its products ($n=29$). The calculated correlation coefficient $r=0,61$ ($p=0,01$)

WNIOSKI

Ponad 50% badanych próbek mleka i produktów mlecznych wykazała aktywność estrogenną w teście *in vitro*. Stwierdzono umiarkowaną korelację dodatnią z zawartością tłuszczu. Najwyższą względną aktywność estrogenną stwierdzono dla masła i sera pleśniowego, najniższą aktywność stwierdzono dla

mleka odtłuszczonego. Nie stwierdzono aktywności estrogennej w jogurtach.

Źródło finansowania badań: temat statutowy S/250 „Ocena aktywności estrogennej mleka i produktów mlecznych z wykorzystaniem biotestów in vitro i in vivo”

PIŚMIENNICTWO

- [1] Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J., Giudice L.C., i wsp.: Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 293–342.
- [2] Hartmann S., Lacorn M., Steinhart H.: Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 1998; 62: 7–20.
- [3] Malekinejad H., Scherpenisse P., Bergwerff A.: Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows). *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 9785–9791.
- [4] Maruyama K., Oshima T., Ohya K.: Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant cows. *Pediatrics Int.* 2010; 52: 33–38.
- [5] Dailey R.A. Price J.C. Simmons K.R., i wsp.: Synchronization of estrus in dairy cows with prostaglandin F2 alpha and estradiol benzoate. *J Dairy Sci* 1986; 69: 1110–1114.
- [6] Stypuła-Trębas S., Minta M., Radko L., i wsp.: Application of the yeast-based reporter gene bioassay for the assessment of estrogenic activity in cow's milk from Poland. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 40: 876–885.
- [7] Nelson R.: Steroidal oestrogens added to a list of known human carcinogens. *Lancet* 2002; 360: 2053.
- [8] Ganmaa D., Cui X., Feskanich D., i wsp.: Milk, dairy intake and risk of endometrial cancer: a 26-year follow-up. *Int. J. Cancer* 2012; 130: 2664–2671.
- [9] Qin L.Q., Xu J.Y., Wang P.Y., i wsp.: Milk consumption is a risk factor for prostate cancer: meta-analysis of case-control studies. *Nutr. Cancer.* 2004; 48:22–27.
- [10] Minta M., Stypuła-Trębas S.: Wykrywanie i ocena aktywności związków hormonalnie aktywnych. *Med. Wet.* 2012; 68: 25–29.
- [11] Bovee T.F.H., Helsdingen R.J.R., Koks P.D., i wsp.: Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004; 325: 187–200.
- [12] Tso J., Aga D.S.: A systematic investigation to optimize simultaneous extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of estrogens and their conjugated metabolites in milk. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 4784–4795.
- [13] Yang Y., Shao B., Zhang J., i wsp.: Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009; 877: 489–496.
- [14] Wolford S.T, Argoudelis C.J.: Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products. *J Dairy Sci.* 1979; 62:1458–1463.
- [15] Macdonald I., Bokkenheuser V., Winter J., i wsp.: Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* 1983; 24: 675–700.

Adres do korespondencji:

dr Sylwia Stypuła-Trębas
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
tel. 81 889 32 46
e-mail: sylwia@piwet.pulawy.pl