

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО

Кваліфікаційна освітньо-наукова
праця на правах рукопису

КОЧЕТОВА ГАЛИНА СТЕПАНІВНА

УДК 637.074

ДИСЕРТАЦІЯ
ОЦІНКА БЕЗПЕЧНОСТІ ТА ОБҐРУНТУВАННЯ ДОПУСТИМОГО
ВМІСТУ 17 β -ЕСТРАДІОЛУ В МОЛОЦІ-СИРОВИНІ КОРОВ'ЯЧОМУ

211 – Ветеринарна медицина
21 – Ветеринарія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Г. С. Кочетова
(підпис, ініціали і прізвище здобувача)

Науковий керівник – **Салата Володимир Зеновійович**, доктор ветеринарних наук,
професор

ЛЬВІВ – 2023

Кочетова Г.С. Оцінка безпечності та обґрунтування допустимого вмісту 17β -естрадіолу в молоці-сировині коров'ячому. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового рівня доктора філософії за галуззю знань 21 – Ветеринарія, спеціальність 211 – Ветеринарна медицина – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, Міністерства освіти і науки України, Львів, 2023.

Оцінка безпечності молока є важливим завданням для забезпечення населення корисними повноцінними молочними продуктами. Споживання молочних продуктів, що містять високі рівні естрогенів викликає занепокоєння у науковців різного профілю через те, що існує пряма залежність між хронічним впливом естрогенних гормонів і поширеністю різного виду онкологічних захворювань. Серед стероїдних гормонів 17β -естрадіол є найбільш біологічно активним. Відповідно до вимог Комісії Codex Alimentarius максимальна кількість зовнішнього естрадіолу, що надходить в організм разом з харчовими продуктами, не повинна перевищувати 50 000 пг/кг/добу. Аналіз українських нормативних документів виявив, що контроль молока-сировини, що поступає на переробку за вмістом 17β -естрадіолу не передбачено. Водночас з молоком та молочними продуктами надходить приблизно 60-80 % естрогенів від усіх харчових продуктів.

Отже, зважаючи на значний вплив високих концентрацій естрогенів на організм споживачів на даний час повною мірою не обґрунтовано кількісні безпечні рівні 17β -естрадіолу у молоці та молочних продуктах, враховуючи інтенсивні технології отримання молока. Тому проведення системних досліджень з врахуванням впливу максимальної кількості чинників на вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому є перспективним та актуальним. Це дозволить на науковій основі визначити максимальну допустиму кількість даного природного гормону у молоці-сировині при передачі на переробку.

Дисертаційне дослідження спрямоване на визначенні вмісту 17β -естрадіолу в молоці коров'ячому та розроблення методології визначення і критеріїв оцінки гранично допустимої концентрації даного гормону в молоці-сировині при

прийманні на переробку. Встановлено, що середнє значення вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому збірному отриманого протягом доби на одній фермі не залежить від часу отримання молока. Водночас вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання. Змішування на переробному підприємстві молока незбираного від різних ферм не призводить до суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівнюючи із молоком отриманим на конкретній фермі в даному регіоні. Виявлено, що молоко незбиране з більшою масовою часткою молочного жиру містить більшу кількість 17β -естрадіолу. Процес сепарування молока впливає на розподіл 17β -естрадіолу між вершками та знежиреним молоком. Кількість 17β -естрадіолу в знежиреному молоці була практично в 5-7 разів менша, ніж у вершках.

Під час дослідження зміни 17β -естрадіолу в молоці протягом періоду тільності корів виявлено, що концентрація естрогенного гормону поступово зростала, про що вказують вірогідні зміни ($p < 0,05$) при порівнянні із першим місяцем тільності. Зокрема протягом перших трьох місяців тільності кількість 17β -естрадіолу не перевищувала 100 пг/мл молока та в середньому коливалася в межах від $42,4 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл. Починаючи з четвертого місяця тільності кількість стероїдного гормону, в середньому зростала до $139,4 \pm 11,8$ пг/мл, що в 3,2, 2,7 та 2,0 раза ($p < 0,05$) більше, проти першого, другого і третього місяця тільності, відповідно. Динаміка зростання 17β -естрадіолу в наступні місяці тільності була ще більш суттєва. Зокрема, на п'ятому місяці кількість гормону становила $489,2 \pm 37,1$ пг/мл, що в 3,5 раза ($p < 0,05$) більше, ніж на четвертому місяці й практично в 10 разів більше ($p < 0,05$), проти першого місяця тільності. Перед запуском – кінець сьомого і початок восьмого місяця тільності спостерігається максимальна кількість 17β -естрадіолу в молоці – $1105,3 \pm 78,5$ та $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл, відповідно.

Під час визначення вмісту 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом естрального циклу у корів встановлено, що найменша кількість гормону була протягом перших сім діб дослідження від 57,1 до 65,6 пг/мл. З 15 по 16 добу естрального циклу кількість 17β -естрадіолу знаходилася в межах від 365,5 до 391,3 пг/мл. Однак, найбільшу кількість 17β -естрадіолу реєстрували у молоці на 19 добу

естрального циклу $407,3 \pm 39,5$ пг/мл. Отже, молоко отримане в кінці лактації та на закінчення естрального циклу є значним джерелом естрогенних гормонів, які з молочними продуктами надходять в організм споживачів.

Дослідження вмісту 17β -естрадіолу в різних молочних продуктах виявило закономірність зростання гормону у молоці питному із збільшенням масової частки жиру. Зокрема, у пробах молока питного з вмістом жиру 3,2 та 3,8 % кількість 17β -естрадіолу становила $395,9 \pm 34,1$ та $547,8 \pm 49,8$ пг/мл, що практично в 10 разів більше ($p < 0,05$), порівняно з молоком жирністю 1,0 % та в 1,8-2,5 раза більше ($p < 0,05$), ніж у молоці з 2,5 % жиру. При дослідженні вмісту 17β -естрадіолу у кисломолочних продуктах (йогурт, кефір), встановлено, що кількісний вміст 17β -естрадіолу також залежав від масової частки жиру в них. Зокрема, в йогурті та кефірі з жирністю 1,0 % кількість 17β -естрадіолу становила від $25,5 \pm 3,0$ до $35,3 \pm 3,4$ пг/мл, що, в середньому, в 4,7 раза менше ($p < 0,05$), ніж у продуктах з масовою часткою жиру 2,0 та 2,5 %. Проведені дослідження встановили вірогідні зміни вмісту 17β -естрадіолу у пробах сметани та масла, залежно від кількісного вмісту масової частки жиру. Виявлено, що вміст 17β -естрадіолу в сметані та маслі був в декілька разів (5-10) більший, ніж у молоці питному та кисломолочних продуктах, не залежно від їх жирності. Отже, кількісний вміст 17β -естрадіолу у молочних продуктах перш за все залежить від його вмісту в молоці сировині, яка використовується для виробництва та від масової частки жиру в готовому молочному продукті. Простежується чітко виражена тенденція, що чим більш високожирніший молочний продукт, тим більша кількість у ньому естрогенного гормону – 17β -естрадіолу.

Під час визначення гострої токсичності за умови вмісту у молоці-сировині 17β -естрадіолу в кількості від 20,0 до 2500 пг/мл змін рухової активності, форми тіла та пригніченості розмноження інфузорій не спостерігали. За вмісту 17β -естрадіолу у молоці в межах 5000,0-5500,0 пг/мл спостерігали сповільнення рухової активності інфузорій без зміни характеру руху. Таким чином кількість 17β -естрадіолу в молоці більше 5000,0 пг/мл спричиняє незначний вплив на життєдіяльність і рухову активність інфузорій *Tetrachymena pyriformis*. Протягом

96 годин існування інфузорій в молоці хронічного токсичного впливу на клітини не спостерігали за вмісту 17 β -естрадіолу від 20,0 до 2500,0 пг/мл. Додавання 17 β -естрадіолу в молоко-сировину у кількості від 5000,0 до 5500,0 пг/мл спричиняло хронічний токсичний вплив на інфузорії, внаслідок чого загальна бальна оцінка у всіх визначених показниках збільшилася до 2 балів. Таким чином молоко-сировина з кількістю 17 β -естрадіолу від 5000,0 до 5500,0 пг/мл може проявляти деякий хронічний токсичний вплив на клітини війчастої інфузорії. Встановлено, що відносна біологічна цінність молока-сировини з вмістом 17 β -естрадіолу до 2500,0 пг/мл становила від 98,6 до 97,7 %, а у пробах молока-сировини з максимальною кількістю гормону (5000,0 – 5500,0 пг/мл) зменшилася в середньому на 10 % до 89,22 %. Отже, за кількості 17 β -естрадіолу у молоці більше 5000,0 пг/мл можливий хронічний токсичний вплив на клітини *Tetrachymena pyriformis*.

Встановлено, що низькотемпературна обробка молока за $77,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв не змінює структуру естрогенного гормону 17 β -естрадіолу, внаслідок чого його кількість практично не змінюється у пастеризованому молоці. Виявлено, що 17 β -естрадіол у молоці є стійким до температури гормоном, який не має тенденції до значного зменшення під впливом високої теплової обробки ($85,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв) та під час кип'ятіння, оскільки кількість гормону зменшується, в середньому на 5 %. Тому можна стверджувати, що у молоці питному після пастеризації чи стерилізації концентрація 17 β -естрадіолу вірогідно не буде відрізнятися від початкової кількості у молоці-сировині. Виявлено істотне зростання 17 β -естрадіолу у маслі ($3896,1 \pm 67,5$ пг/г), порівнюючи з вмістом у молоці сирому ($189,4 \pm 12,5$ пг/мл) та незначна кількість у маслянці ($29,3 \pm 1,8$ пг/мл). Під час зберігання масла за температури -18 °C протягом 9 місяців відбувається зменшення кількості 17 β -естрадіолу на 25 %, а за температури -9 °C на 20 %. Даний процес можна використати для масла вершкового, яке отримане від корів на останніх місяцях лактації, яке містить високий рівень естрогену.

Встановлено, що стероїдний гормон 17 β -естрадіол не руйнується під дією молочної кислоти, яка накопичується в результаті молочнокислого бродіння, як за

участі змішаної мікрофлори молока сирого, так за участі чистих молочнокислих бактерій закваски для йогурту.

Встановлено, що добове надходження 17β -естрадіолу в організм дітей з молоком навіть за максимального його вмісту в молоці-сировині може становити 12000 пг/кг живої маси, а для дорослих 3428,5 пг/кг. Дана кількість гормону в 4,1 та 14,5 разів менша ($p < 0,05$), ніж максимально дозволена Комісією Codex Alimentarius. Аналогічно індекс коефіцієнта небезпеки щодо вмісту такої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині становив 0,24 для дітей та 0,06 для дорослих, що вказує на відсутність помітного токсичного впливу на здоров'я людини у короткостроковій перспективі. Визначені й запропоновані гранично допустимі кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині. Розроблено методологію визначення гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень: $n = 3$, $s = 2$, $m = 500$, $M = 1000$. Це дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів концентрацію естрогенного гормону та у разі виявлення перевищення встановлених показників застосовувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

Ключові слова: молоко-сировина, 17β -естрадіол, безпечність, естрогенні гормони, гранично допустима кількість.

Kochetova H. S. Safety evaluation and substantiation of the permissible content of 17β -estradiol in raw cow's milk – Qualifying scientific paper with manuscript rights.

Dissertation for graduation the educational and scientific level of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 21 – Veterinary, specialty 211 - Veterinary medicine. – Stepan Gzhytsky Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2023.

The evaluation of the milk safety is an important task for providing the population with useful and complete dairy products. The consumption of dairy products containing high levels of estrogens causes concern among scientists of various profiles due to the fact that there is a direct relationship between chronic influence to estrogen hormones and

the prevalence of various types of oncological diseases. Among steroid hormones, 17β -estradiol is the most biologically active. According to the requirements of the Codex Alimentarius Commission, the maximum amount of external estradiol entering the organism with food should not exceed 50000 pg/kg/day. The analysis of Ukrainian regulatory documents revealed that the control of 17β -estradiol content of raw milk for processing is not provided for. At the same time, approximately 60-80% of estrogens from all food products come with milk and milk products. Therefore, taking into account the significant influence of high concentrations of estrogens on the organism of consumers, the safe quantitative levels of 17β -estradiol in milk and dairy products are not fully substantiated at the moment, taking into account the intensive technologies of milk production. Therefore, conducting systematic research taking into account the influence of the maximum number of factors on the level of 17β -estradiol in raw milk is perspective and actual. This will allow on a scientific basis to determine the maximum permissible amount of this natural hormone in raw milk when it is transferred for processing.

The dissertation research is aimed at determining the content of 17β -estradiol in cow's milk and developing a methodology for determining and evaluating criteria for the maximum permissible concentration of this hormone in raw milk when it is accepted for processing. It was found out that the average value of the content of 17β -estradiol in raw skimmed milk received during the day on one farm does not depend on the time of milk collection. At the same time, the content of 17β -estradiol in the whole milk from one herd undergoes significant changes during the year of its receipt. Mixing at a processing plant of the whole milk from different farms does not lead to a significant difference in the content of 17β -estradiol, compared to milk got from a specific farm in a given region. It was found that whole milk with a higher mass fraction of milk fat contains a greater amount of 17β -estradiol. The milk separation process affects the distribution of 17β -estradiol between cream and skimmed milk. The amount of 17β -estradiol in skimmed milk was almost 5-7 times less than in cream.

During the research of changes in 17β -estradiol in milk during the period of gestation of cows, it was found that the concentration of the estrogen hormone was gradually increased, which is indicated by probable changes ($p < 0.05$) when compared

with the first month of gestation. In particular, during the first three months of gestation, the amount of 17β -estradiol did not exceed 100 pg/ml of milk and on average ranged from 42.4 ± 7.7 to 68.3 ± 7.8 pg/ml. Beginning with the fourth month of pregnancy, the amount of steroid hormone was increased on average to 139.4 ± 11.8 pg/ml, which is 3.2, 2.7 and 2.0 times ($p < 0.05$) more, compared to the first, the second and third months of pregnancy, accordingly. The growth dynamics of 17β -estradiol in the following months of pregnancy was even more significant. In particular, in the fifth month, the amount of the hormone was 489.2 ± 37.1 pg/ml, which is 3.5 times ($p < 0.05$) more than in the fourth month and almost 10 times more ($p < 0.05$), against the first month of pregnancy. Before the launch - the end of the seventh and the beginning of the eighth month of pregnancy, the maximum amount of 17β -estradiol in milk is observed - 1105.3 ± 78.5 and 1209.8 ± 82.4 pg/ml, respectively.

During the research of the content of 17β -estradiol in raw milk during the estrous cycle in cows, it was set up that the lowest amount of the hormone was during the first seven days of the investigation from 57.1 to 65.6 pg/ml. From the 15th to the 16th day of the estrous cycle, the amount of 17β -estradiol ranged from 365.5 to 391.3 pg/ml. However, the largest amount of 17β -estradiol was registered in milk on the 19th day of the estrous cycle, 407.3 ± 39.5 pg/ml. Therefore, milk got at the end of lactation and at the end of the estrous cycle is a significant source of estrogenic hormones that enter the organism of consumers with dairy products.

The research of the content of 17β -estradiol in various dairy products revealed the regularity of the growth of the hormone in drinking milk with an increase in the mass fraction of fat. In particular, in samples of drinking milk with a fat content of 3.2 and 3.8%, the amount of 17β -estradiol was 395.9 ± 34.1 and 547.8 ± 49.8 pg/ml, which is almost 10 times more ($p < 0.05$), compared to milk with 1.0% fat and 1.8 - 2.5 times more ($p < 0.05$) than in milk with 2.5% fat. When examining the content of 17β -estradiol in fermented milk products (yogurt, kefir), it was found out that the quantitative content of 17β -estradiol also depended on the mass fraction of fat in them. In particular, in yogurt and kefir with a fat content of 1.0%, the amount of 17β -estradiol ranged from 25.5 ± 3.0 to 35.3 ± 3.4 pg/ml, which, on average, is 4.7 times less ($p < 0.05$) than in products with a

mass fraction of fat of 2.0 and 2.5%. The conducted investigations defined probable changes in the content of 17 β -estradiol in samples of sour cream and butter, depending on the quantitative content of the mass fraction of fat. It was found that the content of 17 β -estradiol in sour cream and butter was several times (5–10) higher than in drinking milk and fermented milk products, regardless of their fat content. Therefore, the quantitative content of 17 β -estradiol in dairy products primarily depends on its content in raw milk used for production and on the mass fraction of fat in the ready dairy product. There is a clearly expressed tendency that the higher the fat content of the dairy product, the greater the amount of the estrogenic hormone - 17 β -estradiol.

During the determination of acute toxicity, under the condition of the content of 17 β -estradiol in the raw milk in the amount from 20.0 to 2500.0 pg/ml, no changes in motor activity, body shape and inhibition of reproduction of ciliates were observed. At the content of 17 β -estradiol in milk in the range of 5000.0–5500.0 pg/ml, a slowdown in the motor activity of infusorium was observed without changing the nature of the movement. Thus, the amount of 17 β -estradiol in milk greater than 5000.0 pg/ml causes a minor influence on the vital activity and motor activity of *Tetrachymena pyriformis* infusorium. During 96 hours of the existence of infusorium in milk, chronic toxic influence on cells were not observed for the content of 17 β -estradiol from 20.0 to 2500.0 pg/ml. Addition of 17 β -estradiol to raw milk in the amount of 5000.0 to 5500.0 pg/ml caused a chronic toxic influence on infusorium, as a result of which the total score in all determined indicators was increased to 2 points. Thus, raw milk with an amount of 17 β -estradiol from 5000.0 to 5500.0 pg/ml may exhibit some chronic toxic influence on the cells of the ciliated infusoria. It was found out that the relative biological value of raw milk with a content of 17 β -estradiol up to 2500.0 pg/ml was from 98.6 to 97.7%, and in samples of raw milk with the maximum amount of the hormone (5000.0 - 5500.0 pg/ml) was decreased by an average of 10% to 89.22%. Therefore, if the amount of 17 β -estradiol in milk is more than 5000.0 pg/ml, a chronic toxic influence on *Tetrachymena pyriformis* cells is possible. It was established that low-temperature processing of milk at 77.0 $\pm$ 1.0 °C for 1 minute does not change the structure of the estrogenic hormone 17 β -estradiol, as a result of which its amount is not practically changed in pasteurized milk. It was found

that 17 β -estradiol in milk is a temperature-stable hormone that does not tend to significantly decrease under the influence of high heat treatment ($85.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 1 min) and during boiling, since the amount of the hormone decreases, on average by 5%. Therefore, it can be stated that the concentration of 17 β -estradiol in drinking milk after pasteurization or sterilization will probably not differ from the initial amount in raw milk. A significant increase of 17 β -estradiol in butter (3896.1 ± 67.5 pg/g) was revealed, compared to the content in raw milk (189.4 ± 12.5 pg/ml) and a small amount in buttermilk (29.3 ± 1.8 pg/ml). During storage of butter at a temperature of -18°C for 9 months, the amount of 17 β -estradiol decreases by 25%, and at a temperature of -9°C by 20%. This process can be used for butter, which is got from cows in the last months of lactation, which contains high levels of estrogen. It was set up that the steroid hormone 17 β -estradiol is not destroyed under the action of lactic acid, which accumulates as a result of lactic acid fermentation, both with the participation of mixed microflora of raw milk and with the participation of pure lactic acid bacteria of yogurt starter. It was found that the daily intake of 17 β -estradiol in the organism of children with milk, even with its maximum content in raw milk, can be 12000 pg/kg of live weight, and for adults it is 3428.5 pg/kg. This amount of hormone is 4.1 and 14.5 times is less ($p<0.05$) than the maximum allowed by the Codex Alimentarius Commission. Similarly, the hazard ratio index for this amount of 17 β -estradiol in raw milk was 0.24 for children and 0.06 for adults, indicating no significant short-term toxic influence on human health. The maximum allowable concentrations of 17 β -estradiol in raw milk were determined and proposed. The methodology for determining the maximum permissible concentration of 17 β -estradiol in raw milk when accepted for processing was developed and the interpretation of the got quantitative values was proposed: $n=3$, $c=2$, $m=500$, $M=1000$. This allows for constant monitoring of the estrogen hormone concentration that is safe for consumers and in case of detection of exceeding the established indicators, to use preventive measures, both with regard to already received milk, and with producers.

Key words: raw milk, 17 β -estradiol, safety, estrogen hormones, maximum permissible concentration.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у закордонних виданнях, які проіндексовані у базі даних

Web of Science Core Collection та/ або Scopus:

1. Kukhtyn, M., Salata, V., Kochetova, H., Malimon, Z., Miahka, K., Horiuk, Y., Pokotylo, O. (2022). Content of 17 β -Estradiol in Raw Milk in Ukraine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 28 (6), 673–679.

2. Kochetova, H. S., Kukhtyn, M. D., Salata, V. Z., Horiuk, Y. V., Kladnytska, L. V., & Matviishyn, T. S. (2023). Dynamics of 17 β -estradiol under influence of technological operations during production of dairy products. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(1), 48–54.

Статті у фахових наукових виданнях України:

3. Salata, V., & Kochetova, H. (2022). The Study of the 17 β -estradiol content in raw milk during the lactation period. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 24(105), 44–49.

4. Кухтин, М., Салата, В., Кочетова, Г., Болтик, Н., Перкій, Ю., & Малімон, З. (2022). Оцінка молока і молочних продуктів за вмістом 17 β -естрадіолу. *Вісник аграрної науки*, 100(6), 30–37.

5. Kochetova, H., Salata, V., Kukhtyn, M., Zghozinska, O., & Melnyk, V. (2023). Toxicological characteristics of raw milk with different contents of 17 β -estradiol. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 25(109), 19–25.

6. Кочетова, Г. С., Салата, В. З., Кухтин, М. Д., Горюк, Ю. В., & Рогальський, І. О. (2023). Оцінка молока-сировини за вмістом 17 β -естрадіолу. *Подільський вісник: ветеринарна медицина, сільське господарство, техніка, економіка*, (38), 216–222.

Методичні рекомендації:

7. Салата В.З., Кочетова Г.С., Кухтин М.Д. Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу: *методичні рекомендації*. Львів, ЛНУВМБ. 2023. 25 с.

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

8. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З. (2021). Гормональні препарати в харчових продуктах та їх вплив на здоров'я населення. Матеріали II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові». (м. Львів, 18–19 листопада 2021 р.), *Львів: СПОЛОМ*, 82.

9. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2022). Оцінка молока коров'ячого незбираного за вмістом 17β -естрадіолу. Матеріали щорічної науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин.». (м. Київ, 21 липня 2022 р.). *Київ: Компринт*, 8.

10. **Кочетова Г. С.,** Салата В. С., Кухтин, М. Д. (2023). Зміна 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів. Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.), *ЛНУВМБ*, 29–30.

11. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2023). Дослідження 17β -естрадіолу у молоці. Матеріали II Міжнародної науково-технічної конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (м. Тернопіль, 24–25 травня 2023 р.), *ТНТУ*, 50.

12. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2023). Дослідження 17β -естрадіолу у молочних продуктах. Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції «Стан та перспективи харчової науки та промисловості» (м. Тернопіль, 28–29 вересня 2023 р.), *ТНТУ*, 115.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	11
ЗМІСТ	13
ВСТУП	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	21
1.1. Чинники, які впливають на безпечність сировини, харчових продуктів. Нормативно-правові документи, які регламентують вимоги щодо безпечності харчових продуктів (молока і молочних)	21
1.2. Проблема стимуляторів росту тварин, гормональних препаратів у сировині й харчових продуктах	24
1.3. Вплив естрогенів харчових продуктів на різні функції організму споживачів	26
1.4. Методи визначення гормональних препаратів у сировині й харчових продуктах, переваги і недоліки	31
1.5. Вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому й молочних продуктах та фактори, які впливають на його вміст	36
1.6. Вплив переробки молока на вміст 17β -естрадіолу у продукції тваринного походження	39
1.7. Підсумки з огляду літератури	41
РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
2.1. Матеріали досліджень	42
2.2. Етапи проведення досліджень	42
2.3. Хімічні методи досліджень	45
2.4. Фізико-хімічні методи	45
2.5. Токсикологічні методи	46
2.6. Статистичні методи	46
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	47

3.1. Моніторинг молока сирого за вмістом 17β -естрадіолу в Україні	47
3.2. Дослідження вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому протягом лактаційного періоду	55
3.3. Оцінка молока питного і молочних продуктів, які реалізуються в торговельній мережі за вмістом 17β -естрадіолу	60
3.4. Токсико-біологічна характеристика молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу	68
3.5. Дослідження зміни 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів	76
3.6. Розроблення методології визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку	88
3.7. Порівняльна оцінка методів визначення 17β -естрадіолу імуноферментним методом з різною підготовкою проб до дослідження	96
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	98
ВИСНОВКИ	113
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	117
ДОДАТКИ	143

ВСТУП

Актуальність теми. Загально відомо, що молоко і молочні продукти вважаються важливим джерелом поживних речовин і становлять основу раціону для більшості населення [147, 200]. У молоці міститься оптимальне для засвоєння співвідношення кальцію і фосфору, білки молока є повноцінними, а молочна сировина є базою для виробництва великої кількості молочних продуктів [138, 59]. Однак, корисність молока і молочних продуктів може бути тільки за умови відповідності показникам якості і безпечності [17, 149]. Забруднювачами молока можуть бути різні ксенобіотики, зокрема антибіотики та мийно-дезінфікуючі засоби [94], солі важких металів [36], пестициди [210], гормони, тощо [201]. Недавні дослідження повідомляють про можливість надходження на переробку молока і тваринницької продукції зі значним вмістом стероїдних естрогенних гормонів синтетичного і природного походження [45, 225, 148]. Тому дослідження продуктів тваринного походження зокрема молока на наявність стероїдних гормонів, які вважаються стимуляторами збільшення виробництва продукції є постійно актуальними, не зважаючи, що використання гормонів офіційно заборонено.

У молоці виявляють естрогенні гормони природного походження (17β -естрадіол, 17α -естрадіол, естріол і естрон), які в організмі впливають на ряд важливих функцій: синтез білка, передачі сигналів між рецепторами, регуляцію репродукції, тощо [156]. Естрогенні гормони природного походження наявні у молоці в результаті секреції внутрішніх залоз, відповідно певна їх кількість завжди буде присутня у молочній сировині [128, 135, 168]. Гормони штучного походження наявні у молоці при лікуванні репродуктивної системи тварин, а також при свідомому застосуванні для збільшення отримання продукції [116, 117]. Серед стероїдних гормонів 17β -естрадіол є найбільш біологічно активним і відомий, як промовтор розвитку пухлин [218, 116, 129]. Проте, сучасні методи визначення 17β -естрадіолу у молоці й молочних продуктів не можуть ідентифікувати його походження. Тому дослідження направлені на встановлені безпечного вмісту 17β -

естрадіолу у молоці та молочних продуктах, саме кількості гормону, яку синтезують тварини за звичайного фізіологічного стану є надзвичайно актуальними. Однак, на фермах зустрічаються випадки, коли тваринам водять 17β -естрадіол для збільшення виробництва молока [225], в такому разі кількість даного гормону суттєво зростає. Високий рівень 17β -естрадіолу в молоці й молочних продуктах викликає занепокоєння серед науковців різного профілю, так як вживання такої продукції призводить до зростання рівня естрогену у крові споживачів, що вважається небезпечним, оскільки ці гормони відповідальні за розвиток різних видів раку (молочної залози, матки, яєчників, сім'яників, простати, тощо) [206, 216, 232]. Крім того надходження значної кількості естрогенів з продуктами в організм дітей препубертатного періоду спричиняє порушення розвитку репродуктивної і нервової системи [156, 208].

Відповідно до вимог нормативно правових документів ЄС і Комісії Codex Alimentarius [79, 96, 97] максимальна кількість зовнішнього (синтетичного) естрадіолу, що надходить в організм разом продуктами харчування, не повинна перевищувати 50 000 пг/кг/добу. Аналіз українських нормативних документів виявив, що контроль молока сирого, що поступає на переробку за вмістом 17β -естрадіолу не передбачено. Водночас з молоком та молочними продуктами надходить приблизно 60-80 % від усіх естрогенів харчових продуктів [170].

Повідомляється, що вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому здорових корів залежить від багатьох чинників, які пов'язані з фізіологічним станом організму (період тільності, тічки), від складу кормів раціону, породи, віку тварин [184]. Наводяться закордонні дані про вміст 17β -естрадіолу в молоці від 5,6 до 922,3 пг/мг [157, 170]. Проте досліджень щодо вмісту 17β -естрадіолу у молоці-сировині та молочних продуктах виготовлених в Україні в оглянутій доступній літературі нами не виявлено.

Отже, зважаючи на значний вплив високих концентрацій естрогенів на організм споживачів на даний час у повній мірі не обґрунтовано кількісні безпечні рівні 17β -естрадіолу у молоці та молочних продуктах, враховуючи інтенсивні технології отримання молока. Тому проведення системних досліджень з

врахуванням впливу максимальної кількості чинників (вміст жиру, період лактації, сезонність, годівля, порода) на рівень 17β -естрадіолу у молоці сирому є перспективним та актуальним. Проведення в такому плані досліджень дозволить на науковій основі визначити максимальну допустиму кількість даного природного гормону у молоці-сировині при передачі на переробку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною експериментальних досліджень, які проводилися з 2020 по 2023 роки на кафедрі ветеринарно-санітарного інспектування Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького відповідно до науково-дослідної тематики 0119U101683 «Оцінка концентрації гормонів у молочних продуктах, як фактору, що стимулює порушення метаболізму та розвиток онкозахворювань у споживачів», запланованої на 2019-2023 рр.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було визначити вміст 17β -естрадіолу в молоці корів за різного фізіологічного стану та розробити методологію визначення і критерії оцінки гранично допустимої концентрації даного гормону в молоці-сировині при прийманні на переробку, як показника його безпечності.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- визначити кількість 17β -естрадіолу у молоці-сировині на молочних фермах протягом року та під час доставляння на переробку;
- дослідити кількість 17β -естрадіолу у молоці-сировині протягом лактаційного періоду;
- провести оцінку молока питного і молочних продуктів за вмістом 17β -естрадіолу в залежності від масової частки жиру в них;
- провести токсико-біологічну оцінку молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу з використанням культури інфузорій *Tetrachymena pyriformis*;
- дослідити зміни 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва та режимів зберігання молочних продуктів;
- удосконалити методику визначення 17β -естрадіолу у молоці-сировині імунноферментним методом;

– розробити критерії визначення та оцінки гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині при прийманні на переробку.

Об'єкт досліджень. Молоко-сировина, 17β -естрадіол, молочні продукти, технологічні процеси виробництва та режими зберігання молочних продуктів, культури інфузорій *Tetrachylena pyriformis*.

Предмет досліджень. Кількісні зміни 17β -естрадіолу у молоці-сировині протягом лактації, особливості розподілу 17β -естрадіолу під час технології виробництва молочних продуктів та режимів їх зберігання, гранично-допустимі концентрації 17β -естрадіолу в молоці, токсико-біологічна оцінка молока на клітинах *Tetrachylena pyriformis*.

Методи досліджень: органолептичні (колір, смак, запах, консистенція молока та молочних продуктів), хімічні (кількість 17β -естрадіолу, масова частка жиру, кислотність продукту) біологічні (рухова активність та життєздатність культур *Tetrachylena pyriformis*), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше науково обґрунтовано та розроблено методологію визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію кількісних значень даного гормону. Встановлено, що середнє значення вмісту 17β -естрадіолу у молоці збірному отриманого протягом доби на одній фермі не залежить від часу отримання молока. Водночас вміст 17β -естрадіолу в молоці істотно залежить від місяця тільності корів. Найменшу кількість 17β -естрадіолу виявляли на початку тільності (протягом перших трьох місяців) та в середньому 26 разів більшу на завершення лактації.

Доведено, що під час сепарування молока 17β -естрадіол концентрується у вершках, де його кількість 5-7 разів більша, ніж у знежиреному молоці. Виявлено вірогідну закономірність зростання вмісту 17β -естрадіолу в молоці питному та молочних продуктах із збільшенням у них масової частки жиру.

Встановлено, що під час теплової обробка молока (пастеризація та стерилізація), процесу сквашування за технології виробництва кисломолочних продуктів не відбувається значного зменшення 17β -естрадіолу. Водночас,

зберігання масла у замороженому стані за температури мінус 9 – мінус 18 °C протягом 6-9 міс. дозволяє зменшити кількість 17 β -естрадіолу, приблизно на 20- 25 % від його початкової кількості.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені системні дослідження щодо вмісту в молоці-сировині 17 β -естрадіолу та впливу різних технологічних операцій на його зміну в молочних продуктах підтверджують необхідність постійного контролю даного гормону при прийманні молока на переробку. Для цього розроблено критерії визначення та оцінки гранично допустимої концентрації 17 β -естрадіолу в молоці-сировині, які апробовані та увійшли у науково-практичні рекомендації виробництву «Методика визначення та методологія оцінка молока-сировини за кількістю 17 β -естрадіолу», які затверджено Вченою радою Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького(протокол №5 від 29.06.2023 р.).

Результати досліджень використовуються в навчальному процесі та науково-дослідницькій роботі студентів освітнього ступеня «магістр» за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» і 211 «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

Особистий внесок здобувача. Дисертантка самостійно провела патентний огляд (пошук) та аналіз наукових джерел, спільно з науковим керівником розробила програму та план наукових досліджень, відпрацювала і практично застосувала всі описані в дисертації методики, організовувала та провела виробничі і лабораторні дослідження. Розробила методологію визначення і критерії оцінки гранично допустимої концентрації 17 β -естрадіолу в молоці-сировині. Виконала статистичну обробку отриманих результатів. За участі наукового керівника д.вет.н., професора Салати В.З. провела аналіз і обговорення результатів досліджень, які виконано спільно.

Апробація результатів дисертаційних досліджень. Основні результати досліджень доповідались на: IX науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів». (Київ Експо Плаза, 2021); II конференції «Сучасні методи

діагностики, лікування та профілактики у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові». (Львів, 2021); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин». (Київ, 2022); Науково-практичній онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (Львів, 2023); II Міжнародній науково-технічній конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2023); VII Міжнародної науково-технічної конференції «Стан та перспективи харчової науки та промисловості» (м. Тернопіль, 2023).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано загалом 12 наукових праць, із них 4 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у закордонних виданнях, які проіндексовані у базі даних Web of Science Core Collection та Scopus, 5 праць – у матеріалах конференцій, розроблено і затверджено 1 методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 150 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів власних досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку літератури, додатків. Дисертація ілюстрована 16 таблицями, 11 рисунками. Список літератури включає 233 джерел, з яких 174 – латиницею. До додатків увійшли сканкопії акту впровадження результатів завершених наукових досліджень, методичні рекомендації (С.1-2), список опублікованих праць за темою дисертації.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Чинники, які впливають на безпечність сировини, харчових продуктів. Нормативно-правові документи, які регламентують вимоги щодо безпечності харчових продуктів (молока і молочних)

В Україні безпечність сільськогосподарської сировини і готових до споживання виробів регламентується наступними Законами України «Про ветеринарну медицину» [38], «Про молоко та молочні продукти» [39], «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» [40]. Зокрема, згідно даного закону України вважається, що «безпечний харчовий продукт – це харчовий продукт, який не створює шкідливого впливу на здоров'я людини безпосередньо чи опосередковано за умов його виробництва та обігу з дотриманням вимог санітарних заходів та споживання (використання) за призначенням» [40]. На безпечність сировини харчових продуктів впливають такі чинники як: умови вирощування тварин, якість сировини, технології виробництва, умови зберігання, транспортування і реалізації продукції [5].

З метою забезпечення населення безпечною харчовою продукцією на території України на базі Державного стандарту України 4161–2003 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги» [15] було впроваджено Систему аналізу ризиків і контролю критичних точок «Hazard Analysis Critical Control Points» (НАССР) [83], яка гарантує виробництво безпечної продукції шляхом ідентифікації й контролю небезпечних чинників і забезпечує виробникам більш ефективніший контроль за безпекою харчових продуктів, ніж випробування кінцевого продукту. Система НАССР повинна впроваджуватись в масштабах підприємства для кожного виробу і процесу окремо бо містить модельні програми для кожної категорії продукції. Науковці і виробники [6, 35, 51, 55] у галузі харчової промисловості особливо вважають актуальним впровадження даної системи (НАССР) на молокопереробних підприємствах, через те що, молоко і

молочні продукти, як високопоживні субстрати є добрими живильними середовищами, у яких мікроорганізми (як патогенні так і технічно-шкідливі) мають здатність до інтенсивного розвитку. Тому ВООЗ дану категорію продуктів відносить до першочергових, які зазвичай спричиняють харчові інфекції і токсикози у споживачів. Система містить описи продуктів, технологічні карти, супровідні аналізи ризиків та зведені таблиці з критичними контрольними точками, внаслідок цього вона визначається на всіх переробних підприємствах світу, як найефективніший на даний час спосіб запобігання ризиків захворювань споживачів через харчовий продукт і схвалена Продовольчою і сільськогосподарською організацією ООН та ВООЗ [1, 2, 4, 5, 7, 8].

Відповідно до Регламенту 2017/625/EU [43] в 2021 році було створено сектор оцінки ризиків при Держпродспоживслужбі України, який здійснює аналіз ризиків небезпечних чинників для організму людини на основі наукових висновків експертів контролюючих органів та операторів на всіх етапах виробництва, переробки та розповсюдження харчових продуктів, тварин і рослин.

У сфері державного контролю за виробництвом та обігом молока та молочної продукції молокопереробні заводи (згідно нормативної документації «оператори ринку харчових продуктів»), зобов'язані дотримуватися Закону України «Про молоко та молочні продукти» [39], Наказу Міністерства аграрної політики України, Державного Департаменту ветеринарної медицини «Про затвердження Правил ветеринарно-санітарної експертизи молока і молочних продуктів та вимог щодо їх реалізації» [32], Наказу МОЗ України «Про затвердження Державних гігієнічних правил і норм» «Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах» [33].

На молоко-сировину в Україні запроваджено ДСТУ 3662:2018 «Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови» [11], який визначає нормативи щодо показників, які визначають якість та його безпечність, зокрема цей стандарт описує три гатунки «екстра», «вищий» і «першого». Водночас на молоко питне запроваджено інший стандарт 2661:2010 «Молоко коров'яче питне. Загальні технічні умови» [10]. Даним наведеним нормативним документом

регламентуються показники до молока-питного, яке пройшло всі технологічні операції включаючи теплову обробку та охолодження і воно може безпосередньо вживатися споживачами.

Численні дослідження [62, 74, 184, 202, 233] демонструють що крім мікробіологічних та гігієнічних показників харчові продукти тваринного походження, такі як м'ясо й молоко, також у деяких випадках можуть містити залишкові кількості стероїдних гормонів природнього (вироблюються безпосередньо організмом) та неприроднього походження (застосовуються для стимулювання росту тварин при виробництві м'яса і молока). Надмірна дія великих кількостей у продуктах стероїдних гормонів може бути токсичною для організму людини і викликати онкологічні захворювання (рак простати, яєчників, молочної залози) [92, 99, 163, 177, 155].

У межах Європейського Союзу застосування фермерами гормональних препаратів та інших анаболічних сполук з метою відгодівлі поголів'я та стимулювання росту тварин для збільшення виробництва сировини заборонено, а їхні залишкові кількості в харчових продуктах строго контролюються [98]. Оскільки Україна експортує харчові продукти на ринки Європейського Союзу, то зобов'язується наблизити своє законодавство до законодавства Європейського Союзу.

В Україні згідно Закону [41] та Наказу МАП України [34], молоко й молочні продукти не можуть бути використанні для споживання, якщо вони у своєму складі містять залишки ветеринарних препаратів чи/або інші забруднюючі токсигенні речовини, відносно кількісного вмісту яких на законодавчому рівні встановлені обмеження (гранично допустимі кількості). При цьому у даних законодавчих нормативних документах вказується, що дослідження на кількісний вміст ветеринарних препаратів чи забруднюючих сполук повинні проводитися не рідше, ніж одного разу в місяць. До того ж мають використовуватися скринінгові методи, а один раз в півріччя такі дослідження мають визначатися референтними методами.

Отже, з аналізу цього підрозділу відмічається, що в загальному в Україні наявна затверджена досить сильна законодавча і нормативно-правова база щодо

контролю сировини та усіх харчових продуктів. Однак, при ретельному аналізуванні такого документів, як ДСТУ 3662-2018 Молоко-сировина [11], нами встановлено, що у ньому відсутні вимоги відносно визначення кількості естрогенних гормонів, тому контроль молока сирого, що поступає на переробку за вмістом 17β -естрадіолу не передбачено.

Таким чином, проведення системних досліджень, які направлені на визначення рівня вмісту 17β -естрадіолу в молоці сировині отриманого на українських фермах із з'ясуванням впливу на кількість даного гормону різних фізіологічних чинників, дозволить на науковій основі визначити максимальну допустиму кількість даного природного гормону у молоці.

1.2. Проблема стимуляторів росту тварин, гормональних препаратів у сировині й харчових продуктах Урбанізація та зростання чисельності населення у світу спричинили підвищення попиту на харчові продукти, в тому числі на продукти тваринного походження: рибу, м'ясо й молоко, зокрема на частку яких припадає близько 22 % від загальної калорійності дієти населення [37, 54, 70]. З метою забезпечення потреб населення у продуктах тваринного походження, фермери почали використовувати гормональні препарати не лише з лікувальною метою, а й для стимулювання росту та збільшення маси тварин [16, 23, 58, 66]. Неправильні обробки, передозування та недотримання періодів корекції зрештою призвели до появи залишків гормонів та їх метаболітів в харчовому ланцюгу людини, що несе ризик для здоров'я споживачів [87, 174].

Гормональні препарати – це речовини, які продукуються залозами внутрішньої секреції або отримуються синтетичним шляхом [49, 128, 135, 209]. За хімічною структурою вони поділяються на: стероїдні (кортикостероїди, прогестини, андрогени, естрогени), нестероїдні (гормони білково-пептидної природи, похідні амінокислот та жирних кислот) та β - агоністи (кленбутерол, циматерол, рактопамін, сальбутамол та зилпатерол) [216, 232].

Найнебезпечнішими стероїдними гормонами через свої канцерогенні та геннотоксичні властивості вважаються естрогени (17β -естрадіол, 17α -естрадіол,

естріол і естрон) [22, 107, 175]. Вони синтезуються фолікулами яєчників, плацентою, сім'яниками, наднирниковими залозами та впливають на репродуктивну систему організму. Крім того естрогени мають низьку молекулярну масу, тому легко поширюються з кров'ю в серцево-судинну, імунну та центральну нервову системи. А завдяки ліпофільній природі можуть проникати через клітинні мембрани, а також через гематоенцефалічний бар'єр [62, 91, 128, 202].

Стероїдні гормони є природнього та штучного походження. Природні гормони (ендогенні) виробляються в організмі людей та тварин в невеликих кількостях (від пікограм до мікрограм) а їх рівень залежить від вікового гормонального гомеостазу та від стану гормонально-залежних органів [91]. Гормони штучного походження (екзогенні) появляються в сировині тваринного походження при недотриманні правил профілактики чи лікування репродуктивної системи тварин, а також при свідомому застосуванні їх з метою збільшення кількості отриманої продукції [122, 123, 125, 158, 190].

Оскільки природні і штучні гормони, мають аналогічну активність і структуру людським гормонам і здатні накопичуються в жирових фракціях сировини тваринного походження (м'ясо, молоко) [88, 90, 139, 154], то навіть незначні на перший погляд кількості гормонів можуть активно впливаючи на важливі морфофункціональні зрушення в організмі [112, 120, 156]. Наприклад, при гіпоестрогенії (концентрація естрогену в організмі нижче норми) розвиваються остеопороз, гормональна кардіопатія, депресивний стан, сенільні психози а при гіперестрогенії (концентрація естрогену в організмі вище норми) – гіперпластичні процеси і гормонозалежні пухлини [50].

У Сполучених Штатах Америки існує шість різних видів гормонів, схвалених Управлінням з санітарного нагляду якості харчових продуктів і медикаментів для використання у виробництві продуктів харчування [179]. До них належать два природні жіночі статеві гормони (естрадіол і прогестерон), один природний чоловічий статевий гормон (тестостерон) і три штучні гормони (зеранол, тренболон ацетат і ацетат меленгестеролу) [212]. Американські фермери застосовують дані гормони як стимулятори росту тварин. Так наприклад,

гормональні препарати естрадіолу у вигляді вушних імплантів або ін'єкцій, сприяють двократному або кількакратному збільшенню м'язової тканини у великої рогатої худоби [88]. Меленгестрол ацетат або медроксипрогестерону ацетат застосовуються окремо або в комбінації з естрогенами і вводяться перорально, як кормова добавка для підвищення ефективності кормів [148]. З гормональних анаболічних ксенобіотиків, що мають естрогенну дію при відгодівлі м'ясної худоби використовується зеранол [213]. Відомі приклади використання, так званих «дизайнерських препаратів» – це нові гормональні анаболіки, але зі структурними аналогами «старих» варіацій (норболетон, тетрагідрогестринон, дезоксиметилтестостерон, вінсент та інші) [148, 137, 181].

Отже, оскільки гормональні препарати використовується не лише з лікувальною метою, а й для підвищення рентабельності сировини харчових продуктів, а їх залишкові кількості в харчових продуктах несуть ризики для здоров'я споживачів, оцінка безпечності харчових продуктів стала важливою для країн всього світу. Тому дослідження продуктів тваринного походження зокрема молока на наявність стероїдних гормонів, які вважаються стимуляторами збільшення виробництва продукції є постійно актуальним, не зважаючи, що використання гормонів офіційно заборонено.

1.3. Вплив естрогенів харчових продуктів на різні функції організму споживачів

З 1980-х років Всесвітня організація охорони здоров'я та Продовольча і сільськогосподарська організація ООН вивчають питання безпечності застосування гормональних препаратів при виробництві харчових продуктів [126].

Найбільше занепокоєння у вчених [62, 135, 184, 202, 233] викликає канцерогенна дія естрогенів, а саме 17β -естрадіолу, який вважається найпотужнішим серед стероїдних гормонів. На їхню думку регулярне та тривале споживання харчових продуктів, які містять 17β -естрадіол здатне викликати рак молочної залози, яєчників, сім'яників та простати [99, 177, 195, 197], а також впливати на аномальні вторинні статеві ознаки та передчасне статеве дозрівання

[92, 155, 163, 164]. Насамперед науковці [50, 88, 156] наголошують на безпечності молочної сировини, оскільки молоко і молочні продукти є основними продуктами дитячої дієти. Вони повідомляють, що навіть незначні концентрації 17β -естрадіолу в молоці та молочних продуктах здатні порушити гормональний баланс в дитячому віці і викликати порушення розвитку сечостатевої системи. Слід також пам'ятати, що гормони які застосовуються у тваринництві здатні проходити через плацентарний бар'єр і можуть потрапляти у кров плода [91, 175].

Дослідження показують, що вплив естрогенів під час внутрішньоутробного та раннього постнатального періоду може підвищити ризик розвитку раку яєчок у дорослому віці [85, 86]. Також систематичний огляд і мета-аналіз встановили зв'язок між споживанням молочних продуктів та надмірною вагою (ожирінням) у дітей і підлітків [65, 118, 164]. Дослідницька програма Національного центру статистики охорони здоров'я для оцінки стану здоров'я та харчування дорослих і дітей у Сполучених Штатах (NHANES) і Тегеранські дослідження повідомляють, що споживанням коров'ячого молока, але не кисломолочних продуктів сприяє більш ранньому статевому дозріванню у дітей (молодших 10 років) [173, 188, 221], а також підвищує сприйнятливості до канцерогенезу молочної залози на 30 % в дорослому віці [119, 159].

Кагортне дослідження, яке було проведене в Роттердамі і обстежувало 3 405 матерів під час вагітності [166] продемонструвало зв'язок між регулярним споживанням матер'ю коров'ячого молока більше 3 склянок (450 мл молока) на день в третьому триместрі вагітності і збільшенням ваги немовля при народженні більше 4000 грам (середня вага при народженні 2500–3800 г.), а жінки мали до 20 раз вищі ризики розвитку онкології молочної залози [73, 101, 132].

У 2005 році рак молочної залози було визнано найпоширенішим видом раку у світі [113, 114, 176]. Автори наукових статей, які проводили когортні дослідження типу «випадок-контроль» [185, 233], мета-аналізи/систематичні огляди [185] проведені на людях протягом останніх років у промислово розвинутих країнах, де споживання коров'ячого молока та молочних продуктів є основними

компонентами дієти, вони пов'язують споживання коров'ячого молока з ризиком ракових захворювань у жінок [77, 112]. Чисельні повідомлення стверджують, що молочні продукти відповідають за понад 60 % споживання естрогену в звичайному німецькому раціоні [177, 178], тому за їхніми даними існує пряма залежність між хронічним впливом естрогенів і поширеністю раку молочної залози [155, 225].

Згідно з дослідженням Норвезького канцер-реєстру, щоденне споживання більше 750 мл незбираного коров'ячого молока, підвищує ризик раку молочної залози у 2,91 рази [115]. Дослідження типу «випадок-контроль» у західній Мексиці (97 пацієнтів з раком молочної залози, 104 контрольні) показало, що споживання великої кількості молока збільшує ризик раку у 7,2 рази [108]. Дослідження у Сполучених Штатах Америки типу «випадок-контроль» (1857 випадків і 1202 контрольні) теж виявило позитивний зв'язок між споживанням коров'ячого молока та ризиком ER-негативного раку молочної залози [161]. А в перспективному когортному дослідженні спостерігалось, що споживання цільного молока корелюється з ER-позитивним раком молочної залози, тоді як між споживанням сиру та йогурту такого зв'язку не виявлено [84, 103, 192]. Щоб дослідити фактори, які можуть підвищувати ризик і швидкість розвитку раку молочної залози у китайських жінок, було проведене широкомасштабне перехресне опитування 122 058 жінок, які проживають у міських і сільських районах східного Китаю. Опитування виявило підвищений ризик розвитку раку молочної залози у жінок, які споживали молоко у сільських районах [217]. Експеримент, проведений шведською мамографічною когортою [136, 152] показав, що у жінок, які споживали більше чотирьох порцій молочних продуктів на день, в два рази частіше виявляли розвиток серозного раку яєчників, порівнюючи зі жінками, які споживали менше двох порцій вдень. Водночас, у жінок, які не споживали або рідко вживали молочні продукти, розвиток даної патології був в два рази нижчий, порівнюючи з жінками, які споживали дві порції вдень.

Відома також значна кількість публікацій, де автори спростовують зв'язок між споживанням коров'ячого молока та частотою розвитку раку у жінок, зокрема молочної залози. Наприклад, Nilsson та інші [171] не виявили стійкого зв'язку між

споживанням молока й молочної продукції і ризиком ракових захворювань, а дослідження типу «випадок-контроль», яке було проведене у Польщі шляхом опитування жінок (823 випадки раку молочної залози) протягом 10-15 років показало, що високе споживання молока навпаки знижує ризик захворювання на рак, як у жінок в пременопаузі, так і в постменопаузі [215]. Mc Glynn Dong та інші [162] провівши мета-аналіз когортних досліджень повідомили, що збільшене споживання молочних продуктів, але не молока, може супроводжуватись зниженням ризиків розвитку раку молочної залози.

У 2015 році дослідники Zang та інші [229] проаналізували 22 проспективних когортних досліджень (1 566 940 учасників) і п'ять досліджень типу «випадок-контроль» (33 372 учасники), опублікованих між 1989 і 2013 роками. Вони не виявили доказів лінійного чи нелінійного зв'язку між споживанням молока та ризиком розвитку раку молочної залози. У іншому дослідженні [75] проведеному в 2019 році вчені погодилися, що всі доступні епідеміологічні дані не підтверджують міцного зв'язку між споживанням коров'ячого молока чи молочних продуктів і ризиком розвитку захворювання. Суперечливі результати, щодо впливу молочних продуктів на репродуктивну систему чоловіків отримав і Larsson у 2006 році, провівши дослідження типу «випадок-контроль» [152]. Таку ж думку висловили у 2021 році група дослідників [127], які провівши мета-аналіз, враховуючи 36 статей із 1 019 232 учасниками, включаючи осіб європейського та азіатського населення.

Отже, зробивши огляд літератури останніх років ми виявили, що наукові публікації [64, 93, 117, 206, 208] переглянути наголошують на зв'язок між споживання молока і млочних продуктів та репродуктивними розладами у чоловіків, такими як: гіпоспадія, крипторхізм та рак яєчок. Результати всебічного мета-аналізу, який був проведений серед чоловіків з Північної Америки, Європи та Австралії протягом 1973 – 2011 років, переконливо свідчать про значне погіршення репродуктивного здоров'я чоловіків, проте щоб стверджувати причини цього погіршення потрібні додаткові дослідження.

Зацікавленість становлять дослідження здійсненні Maquyama та інші [159], які стверджували, що чоловіки, які споживали щонайменше 600 мл/м² поверхні тіла

коров'ячого молока, мали більший вміст стероїдних гормонів, включаючи естрадіол, естрон та прогестерон у сечі та сироватці крові. Ці чоловіки мали зниження рівня тестостерону та гіпофізарних гонадотропінів у сироватці крові приблизно через годину після вживання молока. У аналогічному дослідженні [155] виявили, що ніякого шкідливого ефекту для здоров'я не можна очікувати, якщо щоденне споживання естрогенів менше 540 нг/день, що буде становити близько 1% добового виробництва у сегменті населення з найнижчою продукцією естрогену (хлопчики в пубертатному періоді). Відповідно до вказівок Управління з продовольства і медикаментів США [214] не очікується фізіологічних ефектів естрогенів, коли споживання становить менше 1% ендогенних кількостей, вироблених сегментом населення з найнижчою продукцією естрогену (хлопчики в пубертатному періоді). Однак, з точки зору споживача, важливо зазначити, що молоко та молочні продукти не єдині харчові продукти, що містять естрогени, і тому необхідно враховувати загальну кількість спожитих естрогенів при оцінці потенційних наслідків для здоров'я.

Дослідження на гризунах [121, 105, 187] показали, що серед вчених немає одностайної думки про те, що ризик виникнення раку репродуктивних органів споживачів залежить від тривалості та кількості спожитої ними молочної продукції.

Група вчених [233] вигодовували щурів комерційним та отриманим безпосередньо від корів без будь-якої обробки молоком протягом 7 днів. Вони відмітили збільшення відношення маси матки до тіла у щурів порівняно з контрольною групою, яку не годували молоком. Так само Ganmaa та інші [111, 112, 120] повідомили про утеротрофічний ефект комерційного молока з низьким вмістом жиру у незрілих і молодих зрілих щурів після видалення яєчників.

Дослідники [172] вивчали початок статевого дозрівання у щурів, які вживали комерційне молоко, і виявили, що статеве дозрівання, за оцінкою часу відкриття піхви, настало раніше у щурів, які споживали молоко, порівняно з щурами, які не піддавалися впливу молока.

Вчені [153] провели експеримент у групі щурів Вістар, яких годували звичайним комерційним молоком і порівнювали з групою щурів, яких годували штучним молоком без естрогенів (контрольна група). Вони оцінювали репродуктивні (індекс фертильності, індекс вагітності, маса матки та яєчників, дні відкриття піхви та тривалість циклу тічки) та гістологічні параметри між групами і дійшли висновку, що естрогени присутні в комерційному молоці, не впливають на репродуктивну функцію. Аналогічно Furnari та інші [105] також досліджували можливі утеротрофічні ефекти у щурів і не виявили жодних подібних ефектів щодо впливу комерційного молока на репродуктивну систему тварин. Дослідники [110] годували щурів молоком протягом двох поколінь, і ні в першому поколінні, ні в другому поколінні репродуктивних ефектів не спостерігалось.

Отже, з аналізу виявлено, що оскільки немає одностайної думки між науковцями світу, а численні дослідження свідчать, що споживання молока і молочних продуктів може мати як шкідливий, нейтральний та і захисний вплив на розвиток ракових захворювань, то це питання залишається і надалі предметом дискусій. Тому необхідні подальші глибокі і ґрунтовні дослідження, як на лабораторних тваринах, так і на добровольцях із врахуванням впливу багатьох факторів на розвиток даного процесу.

1.4. Методи визначення гормональних препаратів у сировині й харчових продуктах, переваги і недоліки

Визначення залишкових кількостей гормональних препаратів та їх метаболітів в харчових продуктах тваринного походження у світі проводяться за допомогою різних аналітичних методів, проте широкого використання набули дві основні групи методів – це імунологічний та хроматографічний аналізи, їх ще класифікують як скринінгові та підтверджуючі методи. Для отримання надійних результатів важливо використовувати акредитовані та відвалідовані методи про що вказано у Законі України [40]. У якості матриць для досліджень в даних методах здебільшого використовується сировина сільськогосподарських тварин (м'ясо, молоко, печінка, сеча). Оскільки сировина тваринного походження є складною

субстанцією (містить жири, білки, вуглеводи та інші компоненти), а вимірювання залишкових кількостей гормональних препаратів потребує низьких рівнів виявлення (від пг до мкг/кг) всі ці фактори несуть ризики одержання хибних результатів. З цією метою, щоб усунути вплив небажаних факторів (матричний ефект) на результати досліджень необхідна попередня підготовка зразка, яка включає подрібнення, гомогенізацію, екстрагування органічними розчинниками (метанол, ацетонітрil) та очищення [69, 175, 198]. Слід також зазначити, що кожна методика має свої особливості в підготовці зразків, це залежить перш за все від аналіту, що визначається. До нових методів екстракції та очищення зразків відноситься: прискорена екстракція розчинником, екстракція надкритичною рідиною, твердофазна екстракція, твердофазна мікроекстракція, рідкофазна мікроекстракція порожнистими волокнами, мікрохвильова екстракцію, твердофазна полімерна екстракція за допомогою молекулярного імпринтингу та ексклюзійна хроматографію. Вони є економічно ефективними оскільки вимагають менше органічних реагентів і затрат праці, дозволяють аналізувати більшу кількість залишкових компонентів і є більш специфічними [67, 199].

Методика екстракції та очищення зразків за допомогою молекулярно імпринтованих полімерів (MIP) володіє хорошою термічною та хімічною стабільністю [57, 60, 180]. MIP недорогі, прості, стабільні, відтворювальні та викликають міцні хімічні зв'язки. Недоліком MIP є неправильна форма матеріалу [230], яка викликає асиметричні піки, низьку спорідненість, слабкі сили зв'язування та неповне видалення шаблонних молекул, що обмежує ефективність екстракції та здатність до імпринтингу [205].

Метод твердофазної екстракції з молекулярним відбитком (MISPE) у поєднанні з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) легко та швидко функціонує, проте має малий поділ досліджуваного аналіту [134]. Залишки β -агоністів у харчових продуктах тваринного походження, можуть бути проаналізовані за допомогою твердофазної екстракції (ТФЕ) у поєднанні з LC-тандемною мас-спектрометрією [167]. Метод твердофазної екстракції є простим у виконанні, дає високу доставку, зберігає невелику кількість органічних

розчинників, може бути автоматизовано, має швидку екстракцію і меншу вартість, а також доступний широкий асортимент стаціонарних фаз. Твердофазна мікроекстракція [191] дозволяє адсорбувати аналіти на поверхні невеликого волокна з плавленого кремнезему, відзначеного відповідною полімерною фазою, поміщеного в картриджі, схожого на шприц. Ця методика заснована на розподілі аналітів, між фазою екстракції (полімером) і матрицею. Переваги твердофазної мікроекстракції пов'язані з екстракційним розчинником, комбінацією відбору проб та екстракцією. Високий відсоток аналітів дає і метод трифазної системної мікроекстракції (HF-LPME), крім того він споживає низьку кількість органічних розчинників тому є низьковартісним [67, 203].

Хроматографічні методи можуть використовуватися як скринінгові методи оцінки речовин, так і для кількісного аналізу. В залежності від фізико-хімічних властивостей молекули аналіту, що визначається у харчових продуктах вимірювання проводиться за допомогою методів: рідинної хроматографії (PX) або високоефективної рідинної хроматографії. Є аналіти, які одночасно аналізуються двома суміжними методами [67, 199].

Методи рідинної хроматографії та високоефективної рідинної хроматографії є простими, швидкими і широко доступними у більшості лабораторій, але з відносно обмеженою чутливістю, тому для того, щоб послабити матричний ефект та підвищити чутливість аналізу, необхідна інтенсивна підготовка зразків [134]. Наприклад, щоб покращити межу виявлення 17β -естрадіолу Shi та інші [199] використовували метод екстракції молекулярно імпринтованих полімерів у поєднанні з високоефективною рідинною хроматографією з ультрафіолетовим детектором (HPLC-UV), а дослідники [226] використали твердофазну мікроекстракцію вуглецевих нанотрубок із порожнистими волокнами (CNT-HF-SPME).

Також при аналізі гормонів у зразках харчових продуктів тваринного походження використовується рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-MS), зокрема методи PX-MS/MS, які забезпечують найнижчу межу виявлення і високу вибірковість, чутливість та точність [231]. Недоліком методу є висока

вартість обладнання та вимоги до навик оператора. Цей метод дозволяє проводити скринінг і кількісний аналіз сполук шляхом утворення прекурсорів й іонів-продуктів та дозволяє виявлення кожної сполуки за допомогою співвідношення заряду до маси кожної молекули захопленої на детекторі [222, 106].

Основні переваги у газової хроматографії заключаються в швидкому розподілі субстрату, суттєвій чутливості методу, аналіз можна здійснювати як газоподібних, твердих, так і рідких матеріалів, до того ж для досліду використовується незначна кількість субстрату. Недоліками методу є дотримання однакових умов за дослідження проби і еталонного взірця, близькі між собою характеристики піку багатьох речовин, на результати вимірювань суттєво впливає температура [231].

На даний час, такий метод як газова хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням вважається високоточним для визначення різних речовин у складі субстрату. Це метод базується на порівнянні мас-спектрів досліджуваного об'єкту з наявними у бібліотечній системі програмного забезпечення, такий підхід дозволяє додатково підтвердити ідентичність визначеного аналіту. Одним із методів газової хроматографії, щодо оцінювання залишків гормональних речовин у різних біологічних системах, в тому числі й харчовій сировині та продуктах вважається хроматографія з тандемною мас-спектрометрією у цьому методі виокремлюються дві квадруполі, які контролюють кожен досліджуваний аналіт, при цьому відбувається одночасне відфільтровування речовин, що заважають процесу вимірювання. Це надзвичайно важливо під час виконання досліджень, коли використовуються складні матриці. Даний метод добре підходить для виявлення гормональних залишків у субстратах навіть у низьких концентраціях. Також завдяки високій чутливості даного методу, суттєвою перевагою його вважається виконання великої кількості завдань, швидке аналізування зразку та не складні вимоги до пробопідготовки зразка, що оцінюється. Дослідники Fuh та колеги [81, 82, 104] використали метод газової хроматографії з електронним ударом іонної пастки та мас-спектрометрії (GC-EI-IT-MS) для визначення залишкового

анаболічного стероїду в яловичині, свинині та курятині, а також у внутрішніх органах (нирки, печінка).

Імунологічні методи аналізу – це методи лабораторної діагностики, що використовуються для скринінгового аналізу залишкових кількостей небезпечних речовин у сировині тваринного походження, а їхні позитивні результати потребують підтвердження кількісними методами. Одним із найкраще валідованих і найчастіше використовуваних імуноаналізів є метод імуноферментного аналізу ELISA. Цей метод був розроблений у 2012 році на основі методу радіоімунологічного аналізу, шляхом кон'югації міченого антигену та антитіла з ферментами. Переваги методу полягають у простоті процедури вимірювань, високій специфічності і чутливості, високій ефективності, оскільки дослідження можна проводити без складної попередньої підготовки зразків. Метод імуноферментного аналізу є безпечний та екологічно чистий, оскільки не потребує радіоактивних речовин та великих кількостей органічних розчинників. Економічно ефективний, оскільки використовуються недорогі реагенти. До недоліків методу відносять трудомісткість та дороговартісне приготування антитіл, висока ймовірність хибнопозитивних або негативних результатів через недостатнє блокування поверхні мікропланшета іммобілізованим антигеном [63, 89, 142, 216, 218, 219]. Сьогодні тестові набори ІФА дозволяють аналізувати велику кількість зразків протягом кількох годин, не вимагаючи складних приладів і здатні забезпечити суспільство безпечними харчовими продуктами згідно Закону України № 1446-VI від 04.06.2009 «Про Загальнодержавну цільову економічну програму проведення моніторингу» [42].

Отже, аналізуючи різні наявні методи визначення залишків гормонів у біологічних рідинах чи щільних субстратах, відзначаємо їх високоефективність, вартісність особливо хроматографічних та простоту імуноферментних методів. Проте, всі сучасні методи визначення 17β -естрадіолу у молоці і молочних продуктів не можуть ідентифікувати його походження – чи він природний чи синтетичний. Тому дослідження направлені на встановлені безпечного вмісту 17β -естрадіолу у молоці та молочних продуктах, саме кількості гормону, яку

синтезують тварини за нормального фізіологічного стану мають на меті відокремити продукцію отриману від тварин за застосування цих препаратів.

1.5. Вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому й молочних продуктах та фактори, які впливають на його вміст

На даний час на ринку молочної продукції в Україні відмічається наявність значного різноманіття молочних виробів на будь який смак (з різними наповнювачами, низько- та висококалорійні, білкові, безлактозні, тощо). Молочна промисловість вважається однією із найголовніших складових агропродовольчого ринку, оскільки забезпечує повсякденно споживачів необхідними для життєдіяльності продуктами харчування [5, 6, 7].

Коров'яче молоко за своїм хімічним складом, смаковими якостями та технологічними властивостями вважається найбільш повноцінним продуктом, у ньому містяться усі необхідні для людського організму поживні речовини в легкозасвоюваній формі. Завдяки цьому молоко і молочні продукти відносяться до категорії дієтичних та лікувальних харчових продуктів [9, 52, 28]. При споживанні 1 дм³ молока потреба людини у енергії задовольняється на 25 %, у жирах – на 100 %, у білку – на 63 %, у кальції – на 150 %, у фосфорі – на 102 %, у залізі – на 20 %, у вітаміні А – на 30 %, у вітаміні С – на 33 % [30, 48, 53].

Статистичні дані опублікованого звіту Продовольчої та сільськогосподарської організації (FAO) за 2017 р., відзначають споживання молока й молочних продуктів близько 100 кг/рік на одного громадянина в розвинутих країнах Європи [102].

На даний час існує багато суперечок між ендокринологами світу на рахунок джерела синтезу та виділення 17β -естрадіолу: чи це молочні залози, чи інші тканини та залози або можливо це їхня комбінація [156]. Проте, науковці стверджують, що 60-70 % 17β -естрадіолу надходить в організм людини саме з цільним молоком й молочною продукцією [187], тому споживання молочних продуктів викликає занепокоєння споживачів оскільки навіть незначна концентрація гормонів здатна підвищувати ризики онкологічних захворювань

репродуктивної системи у жіночої статті (рак молочної залози, яєчників, матки), чоловіків (рак сім'яників, простати) та порушувати розвиток статевої і центральної нервової системи у дітей препубертатного періоду.

Сучасні генетично покращенні молочні корови продовжують лактувати майже протягом всієї тільності. Як свідчать епідеміологічні дослідження [113, 114, 128, 156, 160] молоко тільних корів крім біологічно активних речовин, мікроелементів та вітамінів містить певну кількість природнього 17β -естрадіолу. Концентрація 17β -естрадіолу в коров'ячому молоці не є стабільною, а залежить від породи та віку тварини, стадії лактації, складу кормових раціонів. Так корів зазвичай годують комбінацією трави та концентратів (суміші зерна/білка та різноманітні побічні продукти), що дозволяє їм лактувати аж до 220 дня тільності [88]. Японські дослідники показали, що молоко від корови на пізніх термінах тільності містить до 33 разів більше естрогену, ніж від молока нетільної корови [92]. Дослідження проведенні в Нідерландах виявили, що концентрації 17β -естрадіолу в молоці між першим і третім триместром тільності збільшилася в 2,5 рази [62, 201]. Також на кількість 17β -естрадіолу в коров'ячому молоці впливає гормонотерапія тварин, яку застосовують як для профілактики та лікування, так і для підвищення молочної продуктивності тварин та зниження собівартості отриманого продукту [62, 133, 201].

Науковці, які вивчали концентрації 17β -естрадіолу в молоці повідомляють про широкий діапазон рівнів гормону. Згідно опублікованих даних [170, 178, 183] низькі концентрації естрогенів виявляються в молоці нетільних корів, тоді як із збільшенням терміну тільності концентрації збільшуються та досягає максимального рівня протягом третього триместру [177] відбирали молоко через кожні 28 дні протягом всього періоду тільності корови, вони відмітили що кількість 17β -естрадіолу в молоці зростає відповідно до дня тільності, так на 60 день концентрація становила 3,1 пг/мл а на 238 день тільності зросла до 7,4 пг/мл. У 2020 році в Хамадані (Іран) Nili-Ahmadabadi та інші дослідили шістдесят дев'ять зразків коров'ячого молока, вміст 17β -естрадіол був виявлений у всіх пробах молока в діапазоні від 75,6 до 922,3 пг/мл [170].

Дослідження також свідчать, що концентрація естрогенів у молоці корелюється із вмістом молочного жиру, що очікувано, оскільки естрогени є ліпофільними речовинами. Malkinejad та інші [157] повідомили, що рівні 17β -естрадіолу в обробленому молоці та необробленому сирому молоці коливаються в діапазоні від 5,6 до 51 нг/л, що залежало від вмісту жиру в молоці нетільних корів. Група дослідників на чолі з Vicini [224] відібрали для досліджень комерційне молоко та повідомили про середню концентрацію 17β -естрадіолу на рівні 4,97 пг/мл у звичайному незбираному молоці та 12,0 пг/мл в органічному незбираному молоці. Дослідження китайських дослідників [76] виявили рівень естрадіолу в товарних пробах молока в діапазоні від 0 до 70,12 нг/л. Farlow та інші [99, 100] виміряли вміст 17β -естрадіолу в незбираному і в знежиреному молоці звичайному та в незбираному і в знежиреному молоці органічному. Найвищі концентрації гормону були виявлені в органічному – 6,00 пг/мл і звичайному незбираному – 5,84 пг/мл коров'ячому молоці, а найнижчі рівні в органічному знежиреному – 0,48 пг/мл та звичайному знежиреному – 0,63 пг/мл молоці. Дослідження Goyona встановили середню концентрацію 17β -естрадіолу на рівні 0,4; 0,6; 0,9; 1,1; 6,0 і 15,8 пг/г відповідно у зразках знежиреного; 1%-ного; 2%-ного; незбираного молока; вершків і вершкового масла [120]. Дослідники зробили висновки, що кількість жиру в молоці суттєво впливала на концентрацію естрадіолу в ньому [120]. В іншому дослідженні Malekinejad і його колеги [157] визначали рівень 17β -естрадіолу в зразках обробленого молока з 0 %, 1,5 % і 3 % жиру. Вони повідомили, що рівень гормону в цих зразках становив $10,3 \pm 1,4$, $13,9 \pm 1,8$ і $20,6 \pm 1,5$ нг/л відповідно. Результатів досліджень, щодо вмісту 17β -естрадіолу в молоці сировині й молочних продуктах виготовлених в Україні в оглянутій літературі нами не виявлено.

Отже, підсумувавши огляд нормативної документації ми встановили, що 17β -естрадіол згідно «Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження» належать до групи заборонених речовин (групи A1 – A4). Проте виявлення 17β -естрадіолу в зразках молока згідно плану моніторингу

непередбачене. Запропоноване референс-лабораторією Європейського Союзу рекомендоване значення концентрації (RC) 1 мкг/кг встановлено лише для м'язової тканини [80]. Водночас, згідно Комісії Codex Alimentarius максимальна кількість зовнішнього естрадіолу який надходить в організм разом з продуктами харчування не повинна перевищувати 0,05 мкг/кг маси тіла/добу [79].

Оскільки, оцінити довгостроковий ефект токсикологічного впливу 17β -естрадіолу на здоров'я людини доволі складно, тому що онкологічні захворювання розвиваються протягом тривалого періоду часу і мають багатфакторну етіологію [67, 82], вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому повинен регулярно перевірятися та контролюватися.

1.6. Вплив переробки молока на вміст 17β -естрадіолу у продукції тваринного походження

Нажаль ми знайшли недостатньо наукової літератури з інформації про вплив термічної обробки, ферментації та переробки молока на вміст 17β -естрадіолу у харчових продуктах тваринного походження. Проте, науковці встановили динаміку зміни концентрації стероїдних естрогенів в м'ясі під час термічної обробки та зберігання його при низьких температурах [72, 148].

Теплова обробка широко використовується у молочній промисловості, оскільки свіже коров'яче молоко має короткий термін зберігання. Крім того сире молоко може бути мікробіологічно небезпечним для споживання людиною через наявність шкідливих бактерій, включаючи *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* і *Listeria monocytogenes* [68, 78, 95, 130, 144]. У молокопереробній промисловості широко використовується два основних види теплової обробки молока це: пастеризація і стерилізація. Так, пастеризація – це одноразове нагрівання сирого молока за високих температур, але нижче від 100 °C, зазвичай протягом кількох секунд чи хвилин, водночас стерилізація проводиться за температури вище 100 °C, тобто вище кипіння води [3].

Наявність 17β -естрадіолу у термічно обробленому товарному молоці описано закордонними дослідниками [133, 156, 157, 177, 178, 190]. Дослідники вважають

що пастеризація та стерилізація суттєво не вплинула на концентрацію гормону у молоці.

Водночас дослідники [156, 157] стверджують, що концентрація 17β -естрадіолу в молоці корелюється з вмістом жиру у ньому. Зокрема науковці [190], в 2019 році виміряли середню кількість естрадіолу в пастеризованому з низьким вмістом жиру, стерилізованому з низьким вмістом жиру, пастеризованому з високим вмістом жиру та стерилізованому молоці з високим вмістом жиру. Встановлено, що величина гормону склала відповідно $7,6 \pm 0,47$, $7,9 \pm 0,45$, $8,6 \pm 0,63$ і $8,9 \pm 0,54$ пг/мл. Тим самим підтвердили попередні ствердження, що на рівень 17β -естрадіолу впливає вміст жиру, а не термічна обробка молока. Повідомляється [67], що у молоці пастеризованому з масовою часткою жиру 1,0 % та 2,0 %, кількість 17β -естрадіолу була в 1,8 та 1,3 раза менша, ніж у молоці незбираному.

У поточному дослідженні Quist та інші заявили, що ні термічна обробка, ні скисання молока не вплинули на концентрації естрадіолу в зразках молока [186]. Snoj зі своєю групою науковців [201] провели дослідження, щодо концентрацій 17β -естрадіолу у сирому необробленому молоці, молоці нагрітому до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ та до $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ і в кислому молоці, результати становили відповідно $36,11 \pm 10,01$, $32,46 \pm 9,88$ та $31,78 \pm 9,56$ і $31,43 \pm 8,00$ пг/мл. Результати дослідження підтвердили дані попередніх досліджень [186] та показали, що термічна обробка не впливає на концентрацію естрадіолу, а концентрація 17β -естрадіолу у кислому молоці істотно не відрізнялися від концентрації у сирому необробленому молоці.

Про ліпофільну природу і перерозподіл 17β -естрадіолу за технології сепарування вказують результати досліджень Pape-Zambito [178], який встановив, що процес сепарування молока впливає на розподіл 17β -естрадіолу між вершками та знежиреним молоком, зокрема вміст гормону у вершках в 3,2 рази був вищий, порівнюючи з незбираним молоком та в 15 раз, ніж у знежиреному молоці [177, 178].

Отже, проведенні дослідження в 2006 та 2022 роках вказують на значну ліпофільність 17β -естрадіолу, як наслідок молоко з більшою масовою часткою жиру містило вищий вміст даного гормону.

1.7. Підсумки з огляду літератури

Отже, провівши ретельний аналіз літературних джерел щодо нормативно-правових документів, які контролюють показники безпеки, зокрема і за вмістом гормональних препаратів, ми виявили наступне. Зважаючи на значний вплив високих концентрацій естрогенів на організм споживачів на сьогоднішній день у повній мірі не обґрунтовано кількісні безпечні рівні 17β -естрадіолу у молоці та молочних продуктах, враховуючи інтенсивні технології отримання молока. Наукові дослідження про вміст 17β -естрадіолу в молоці сирому наявні, але вони дуже різноманітні, і немає остаточних даних про кількість естрогену присутнього у молоці питному та молочних продуктах. Оскільки, кількість 17β -естрадіолу у молоці корів зазнає змін під впливом різних чинників. Тому проведення досліджень в Україні з моніторингу вмісту 17β -естрадіолу в молоці та молочних продуктах дасть змогу виявити реальну кількість наявного гормону у різних видах продуктів та визначити продукти, які в найбільшій мірі містять 17β -естрадіол. Таким чином, у зв'язку з тим, що в українському законодавстві не нормують вміст 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні його на переробку, а факт недобросовісного застосування штучних гормонів для збільшення отримання продукції наявний у літературі то оцінка молока сирого за цим гормоном є надзвичайно актуальною.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційне дослідження виконувалося протягом 2020-2023 років на кафедрі ветеринарно-санітарного інспектування Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького та в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи на молочних фермах Тернопільської і Хмельницької областей: ТЗОВ «Агропродсервіс Інвест» с. Дмухівці, Козівського району Тернопільської області; ТЗОВ «Агрокомплекс» с. Дубівці, Тернопільського району Тернопільської області; ПП «Аграрна компанія 2004» МТФ с. Поляни Хмельницької області; на молокопереробних підприємствах Тернопільської області.

2.1. Матеріали досліджень

Під час виконання досліджень з визначення кількісного вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому отриманому на молочних фермах за впливу різних чинників було досліджено 278 проб молока, 30 проб молока-сировини при прийманні на переробному підприємстві від різних молочних ферм. При проведенні моніторингових досліджень щодо вмісту 17β -естрадіолу у молочних продуктах в залежності від концентрації масової частки молочного жиру було досліджено 133 проби молока. Під час вивчення впливу різних технологічних операцій виробництва та режимів зберігання молочних продуктів на вміст 17β -естрадіолу досліджено 24 проби.

2.2. Етапи проведення досліджень

Основним напрямом дисертаційного дослідження було дослідити вміст 17β -естрадіолу в молоці протягом року та розробити методологію визначення і критерії оцінки гранично допустимої концентрації даного гормону в молоці-

сировині при прийманні на переробку. Експериментальна частина дисертаційної роботи складалася з п'ятих етапів, які наведено на рис. 2.1.

Перший етап дослідження полягав у визначити кількість 17β -естрадіолу у молоці-сировині на молочних фермах протягом року та під час доставляння на переробку. Результати досліджень даного етапу мали визначити кількості значення 17β -естрадіолу у молоці сирому отриманого протягом доби, у різні періоди року, протягом тільності та естрального циклу. Тобто встановити максимальні та мінімальні фізіологічні межі гормону у молоці сирому.

Другий етап роботи мав на меті провести оцінку молока питного і молочних продуктів за вмістом 17β -естрадіолу в залежності від масової частки жиру в них. Дослідження мали виявити продукти з максимальною кількістю 17β -естрадіолу та вплив жирності на концентрацію гормону в продукті.

Третій етап роботи був направлений на дослідженні змін 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва та режимів зберігання молочних продуктів. Дослідження даного етапу полягали у з'ясуванні впливу теплової обробки молока на кількість 17β -естрадіолу у молоці пастеризованому та стерилізованому. Крім того впливу технологій виробництва вершків і масла (сепарування) та кисломолочних продуктів (молочнокислий процес) на зміну концентрації 17β -естрадіолу в готових продуктах.

Четвертий етап роботи мав на меті провести токсико-біологічну оцінку молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу з використанням культури інфузорій *Tetrachylena pyriformis*. Дослідження даного етапу полягали в оцінці токсичності та біологічної цінності молока з різним вмістом гормону.

У п'ятому заключному етапі дослідження були направлені на розробку критеріїв визначення та оцінки гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині при прийманні на переробку.

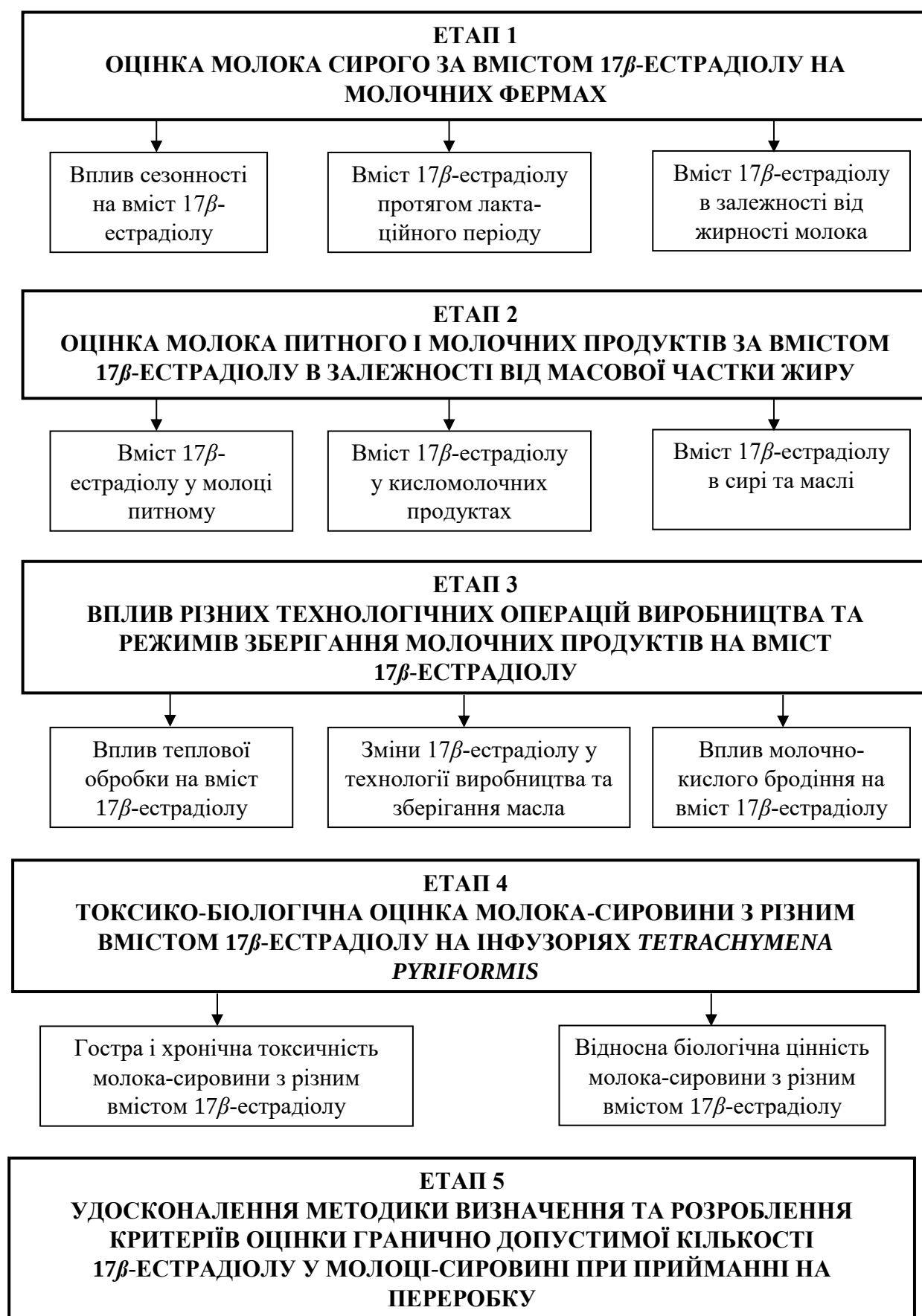


Рис. 2.1. Схема проведення експериментів за темою дисертації

2.3. Хімічні методи досліджень

Проби молока відбирали та доставляли в лабораторію в замороженому стані за температури мінус 12 – мінус 18 °С.

Кількісне визначення 17β -естрадіолу в зразках молока коров'ячого проводили методом імуноферментного аналізу з використанням тест-системи RIDASCREEN® 17β -*o*stradiol Art. No. R2301 (manufactured by firm Art-Biopharm / R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Перед використанням тест-систему витримали 20-30 хв. при температурі 20-25°C, реагенти готували відповідно до протоколу виробника. Для побудови калібрувальної кривої використали стандартні розчини 17β -естрадіолу з концентраціями 0; 50; 200; 800; 3200; 12800 пг/мл.

Перед дослідженням проби молока підігрівали в термостаті до температури 20 – 25 °С та гомогенізували за допомогою гомогенізатора ІКА, для забезпечення однорідності. У лунки мікротитрувального планшету, сенсibilізованого антитілами до 17β -естрадіолу, внесли по 20 мкл стандартних розчинів та досліджуваних зразків, і по 50 мкл розведеного препарату антитіл та кон'югату 17β -естрадіолу. Інкубували планшет протягом 2 год. при температурі 20-25°C. Після чого на приладі для промивання планшетів (BIORAD PW 40) промивали лунки планшету дистильованою водою. В кожну лунку внесли по 50 мкл розчину субстрату та хромогену і знову інкубували 30 хв. при 20-25°C. Після інкубації у лунки додали по 100 мкл стоп-реагенту. Оптичну густину виміряли на імуноферментному рідері Sunrise (Австрія) при довжині хвилі 450 нм. Для комп'ютерної обробки результатів вимірювань використали спеціалізоване програмне забезпечення RIDA®Soft.

Також проводили визначення кількості 17β -естрадіолу за допомогою рідинного хроматографа з мас-спектричним детектором Waters TQ-XS (США).

2.4. Фізико-хімічні методи

Визначення масової частки жиру у молоці-сировині проводили ультразвуковим методом на приладі «Ekomilk Bond» згідно ДСТУ 7057:2009 [14]. Титровану кислотність кисломолочних продуктів визначали стандартним

титрометричним методом [27].

2.5. Токсикологічні методи

Для отримання молока з необхідною кількістю 17β -естрадіолу (2000,0-2500,0 пг/мл та 5000,0-5500,0 пг/мл) додавали до нього контроль з вмістом гормону, який наявний в тест-системі.

Токсико-біологічну експертизу молока проводили згідно з «Методичними рекомендаціями з токсико-біологічної оцінки м'яса, м'ясних продуктів і молока з використанням інфузорії *Tetrahymena pyriformis* (експрес метод)» [29, 165]. В експериментах використовували штам інфузорії *Tetrachymena pyriformis* W-14. Відносну біологічну цінність молока з різним вмістом 17β -естрадіолу визначали за формулою:

$$ВБЦ = \frac{I_d}{I_k} \times 100 \quad (2.1)$$

де ВБЦ – відносна біологічна цінність молока; I_d – кількість інфузорій у молоці; I_k – кількість інфузорій в контролі.

2.6. Статистичні методи

Отримані дані піддавалися статистичним обрахункам з використанням комп'ютерної програми *Statistica* 10,0 (StatSoft Inc., USA). Різницю отриманих даних вважали вірогідною за $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Моніторинг молока сирого за вмістом 17β -естрадіолу в Україні

У зв'язку з тим, що дані наявні в літературі про вміст 17β -естрадіолу у молоці-сировині значно різняться між собою нами було проведено визначення кількості 17β -естрадіолу в молоці отриманому на різних фермах України та при переробці його на молочному заводі. Адже вказується, що вміст естронених гормонів у молоці корів може змінюватися під впливом різних чинників, як фізіологічних, так і кормових, тощо [169].

На першому етапі досліджень було визначено кількість 17β -естрадіолу у молоці різного доїння (ранкове, обіднє, вечірнє) на трьох молочних фермах. Проби молока відбирали після доїння із танка охолоджувача (загальний надій) три рази протягом доби, щоб отримати молоко ранкового, обіднього та вечірнього доїння. Дослід проведено протягом двох місяців у лютому березні. Результати досліджень наведено в табл. 3.1.

З досліджень видно (табл. 3.1), що вірогідної різниці між вмістом середньої кількості 17β -естрадіолу у молоці сирому отриманому в різні періоди доби не виявлено, як в межах однієї ферми, так і на трьох різних фермах. Кількість гормону коливався від $439,8 \pm 41,8$ до $585,5 \pm 61,2$ пг/мл у ранковому молоці, від $497,6 \pm 46,5$ до $605,7 \pm 71,0$ пг/мл в молоці обіднього доїння та від $543,3 \pm 53,2$ до $641,3 \pm 62,8$ пг/мл в молоці вечірнього доїння. При цьому встановлено значні коливання вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому отриманому протягом доїння, як в один, так і в різні періоди доби. Зокрема, на фермі номер №1 різниця між мінімальною і максимальною кількістю гормону становила від 3,0 до 3,7 раза ($p < 0,05$), на другій фермі дана різниця була найменша від 2,3 до 2,5 раза ($p < 0,05$) і найбільша різниця виявлена на третій фермі між мінімальною і максимальною кількістю гормону від 3,4 до 4,5 раза ($p < 0,05$).

Таблиця 3.1

**Вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому на трьох фермах України, пг/мл,
($\bar{x} \pm SE$; n = 90)**

Номер ферми	Час відбирання молока	Кількість досліджених проб	Мінімальна кількість	Максимальна кількість	Середня кількість, $\bar{x} \pm SE$
№1	1	n=10	257,3	851,6	514,9 $\pm$ 66,5
	2	n=10	242,5	918,3	605,7 $\pm$ 71,0
	3	n=10	268,2	797,4	583,2 $\pm$ 55,3
№2	1	n=10	324,7	819,9	439,8 $\pm$ 41,81
	2	n=10	348,5	833,7	497,6 $\pm$ 46,5
	3	n=10	371,7	875,1	543,3 $\pm$ 53,2
№3	1	n=10	198,6	903,4	585,5 $\pm$ 61,2
	2	n=10	206,5	747,1	604,8 $\pm$ 59,4
	3	n=10	238,8	825,5	641,3 $\pm$ 62,8

Примітки:

1 – молоко ранкового доїння; 2 – молока надоїне в обід; 3 – молоко вечірнього доїння.

Отже, різниця між максимальною і мінімальною кількістю 17β -естрадіолу у молоці сирому збірному отриманого протягом доби на одній фермі зазнає суттєвих коливань, проте середнє значення не залежить від часу отримання молока.

З метою встановлення впливу різних факторів, зокрема періоду року на зміну вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому було визначено кількість даного гормону протягом року. Проби молока відбирали на даних трьох фермах два рази в місяць. Результати наведено в табл. 3.2.

**Кількість 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом року, пг/мл,
($\bar{x} \pm SE$; n = 48)**

Місяці дослідження	Кількість досліджених проб	Мінімальна кількість	Максимальна кількість	Середня кількість $\bar{x} \pm SE$
Січень-лютий	12	582,3	1,243	836,9 $\pm$ 79,2*
Квітень-травень	12	247,7	739,5	404,5 $\pm$ 40,6
Липень-серпень	12	358,4	912,1	512,4 $\pm$ 47,6
Жовтень-листопад	12	436,5	875,8	571,7 $\pm$ 54,3

Примітка. * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці відібраного в інших місяцях.

З табл. 3.2 видно, що найбільшу кількість 17β -естрадіолу виявляли у пробах молока відібраних на фермах у січні та лютому – $836,9 \pm 79,2$ пг/мл. Кількість 17β -естрадіолу в даний період була в 2,0 раза більша ($p < 0,05$), порівнюючи з вмістом у молоці відібраного в квітні травні та в 1,6-1,5 раза ($p < 0,05$) більша, ніж у липні-серпні та вересні-жовтні, відповідно. Збільшення кількості 17β -естрадіолу у молоці в січні-лютому можна пояснити тим, що ймовірно у даному періоді найбільша кількість корів, які перебувають на третьому триместрі тільності, які фізіологічно продукують молоко з великим вмістом даного гормону [159, 169]. Очевидно, найменша кількість тільних корів, які дають молоко була в квітні-травні.

Отже, дослідження вказують, що вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання.

У зв'язку з тим, що молоко незбиране після доставки на переробне підприємство піддається змішуванню з молоком від інших ферм і резервуванню у

великих танках до переробки, нами було визначено кількість 17β -естрадіолу у загальному молоці, перед пастеризацією. Дослідження проведено в жовтні і листопаді. Результати досліджень наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Вміст 17β -естрадіолу у сирому молоці на молокопереробному підприємстві України, пг/мл, ($\bar{x} \pm SE$; $n = 30$)

Місяці дослідження	Дні дослідження	Досліджених проб	Мінімальна кількість	Максимальна кількість	Середня кількість, $\bar{x} \pm SE$
Жовтень	1	n=5	302,5	627,2	423,4 $\pm$ 40,3
	15	n=5	323,2	716,4	518,7 $\pm$ 52,5
	30	n=5	281,6	519,3	437,5 $\pm$ 42,7
Листопад	40	n=5	311,8	775,1	514,2 $\pm$ 45,1
	50	n=5	353,2	807,9	564,1 $\pm$ 50,3
	60	n=5	430,7	756,4	578,7 $\pm$ 52,8

Як видно з табл. 3.3, що вміст 17β -естрадіолу у збірному молоці незбираному на переробному підприємстві в загальному відображає кількість гормону у молоці на фермах. В середньому кількість 17β -естрадіолу у жовтні місяці становила від $423,4 \pm 40,3$ до $518,7 \pm 52,5$ пг/мл, тобто коливання в межах 100 пг/мл. У листопаді вміст 17β -естрадіолу збільшився до середніх значень $578,7 \pm 52,8$ пг/мл.

Отже, дослідження показують, що змішування на переробному підприємстві молока незбираного від різних ферм не призводить до суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівнюючи із молоком отриманого на конкретній фермі в даному регіоні.

На рис 3.1 наведено результати, щодо розподілу усіх досліджених нами проб молока-сировини за вмістом 17β -естрадіолу при поступленні на молокопереробне підприємство у жовтні-листопаді.

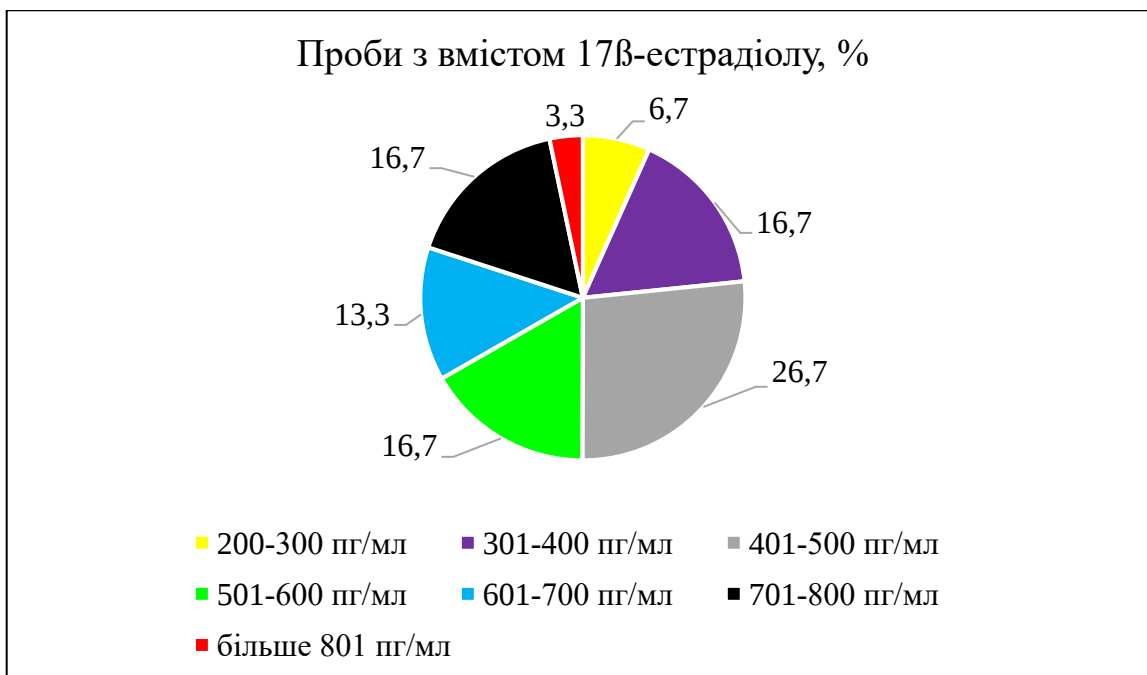


Рис. 3.1. Характеристика проб молока-сировини при прийманні на переробку з вмістом 17β -естрадіолу

З рис. 3.1 відмічаємо, що кількість проб молока-сировини з вмістом 17β -естрадіолу до 500 пг/мл становила $50,1 \pm 3,3$ %. До того ж серед усіх досліджених проб практично у третини 26,7 % кількість 17β -естрадіолу була в межах від 401 до 500 пг/мл. Практично рівномірно розподілилася кількість проб молока від 501 до 800 пг/мл. Зокрема, по 16,7 % проб молока-сировини мали вміст 17β -естрадіолу від 501 до 600 пг/мл та від 701 до 800 пг/мл. Кількість проб з вмістом гормону від 601 до 700 пг/мл становила 13,3 %, а найменше було проб більше 800 пг/мл – 3,3 %.

Отже, з результату досліджень видно, що у даний період року молоко-сировина, яка поступала на переробку мала вміст естрогенного гормону, 17β -естрадіол, в середньому 500 пг/мл з найменшою кількістю до 200 пг/мл та найбільшою 800 пг/мл.

Наступним етапом роботи було визначити і порівняти вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому незбираному залежно від вмісту у ньому масової частки жиру. Адже відомо, що стероїдний гормон 17β -естрадіол належить до ліпофільних, які більше концентруються у молочній фракції [190]. Результати дослідження наведено в табл. 3.4.

Кількість 17β -естрадіолу у сирому молоці залежно від вмісту масової частки жиру, ($x \pm SE$; $n = 40$)

Молоко з вмістом жиру, %	Кількість досліджених проб	Мінімальна кількість	Максимальна кількість	Середня кількість, $x \pm SE$
2,8 – 3,0	n=10	327,1	689,3	551,4 $\pm$ 51,7
3,1 – 3,5	n=10	373,3	707,6	565,7 $\pm$ 54,5
3,6 – 4,0	n=10	395,2	819,5	663,5 $\pm$ 57,3
4,1 – 4,5	n=10	398,8	925,6	704,8 $\pm$ 58,6*

Примітка. * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці з масовою часткою жиру 2,8–3,0 %.

З табл. 3.4 видно, що значної різниці між вмістом 17β -естрадіолу у молоці сирому з масовою часткою жиру від 2,8 до 3,5 % не відмічається. Проте у молоці незбираному з вмістом жиру від 3,6 до 4,0 % кількість 17β -естрадіолу була в середньому на 20 % більша, ніж у молоці з масовою часткою жиру 2,8 – 3,0 %. У молоці з вмістом жиру 4,1 – 4,5 % кількість 17β -естрадіолу становила $704,8 \pm 58,6$ пг/мл, що на 27,8 % більше, порівнюючи з молоком з найменшим вмістом молочного жиру.

Отже, отримані дані вказують, що молоко незбиране з більшою масовою часткою молочного жиру містить більшу кількість 17β -естрадіолу.

Враховуючи те, що рівень стероїдних гормонів у молоці залежить від концентрації молочного жиру було досліджено вплив знежирення на розподіл 17β -естрадіолу по фракціях (вершки, молоко знежирене). У досліді взято молоко незбиране з різним початковим вмістом 17β -естрадіолу: у першому варіанті початкова кількість становила $387,3 \pm 25,6$ пг/мл; у другому – $544,1 \pm 39,3$ пг/мл; у

третьому – $712,6 \pm 55,4$ пг/мл і четвертому – $908,2 \pm 63,7$ пг/мл. Результати досліджень наведено на рис. 3.2.

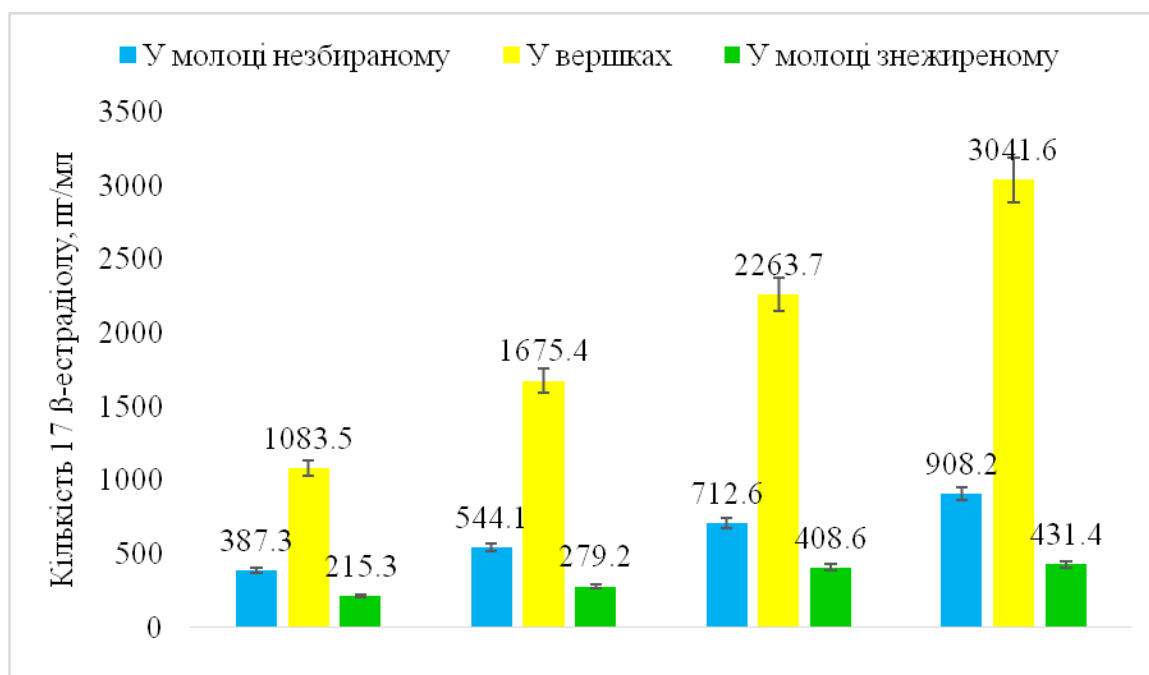


Рис. 3.2. Вплив знежирення молока незбираного на вміст 17β-естрадіолу

З результатів рис. 3.2 видно, що процес сепарування молока впливає на розподіл 17β-естрадіолу між вершками та знежиреним молоком. Зокрема, найвищий рівень 17β-естрадіолу виявлено у вершках, вміст даного гормону був у 2,8-3,3 раза ($p < 0,05$) більший у вершках, ніж у молоці незбираному. Водночас у знежиреному молоці виявлено у 1,7-2,1 раза ($p < 0,05$) меншу кількість 17β-естрадіолу, ніж у молоці незбираному. Результати даного дослідження вказують, що жировмісні молочні продукти будуть значно більшим джерелом поступлення в організм споживачів стероїдного гормону 17β-естрадіолу, ніж знежирені. Так як кількість 17β-естрадіолу в знежиреному молоці була практично в 5-7 раз менша, ніж у вершках. Очевидний факт, що для можливого зменшення добового надходження 17β-естрадіолу разом із молочними продуктами під час споживання необхідно знизити масову частку жиру в них.

Підсумовуючи результати досліджень з даного підрозділу, необхідно відзначити наступне. Середнє значення вмісту 17β-естрадіолу у молоці-сировині збірному отриманого протягом доби на одній фермі не залежить від часу отримання

молока. Водночас вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання. Змішування на переробному підприємстві молока незбираного від різних ферм не призводить до суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівнюючи із молоком отриманого на конкретній фермі в даному регіоні.

Виявлено, що молоко незбиране з більшою масовою часткою молочного жиру містить більшу кількість 17β -естрадіолу. Процес сепарування молока впливає на розподіл 17β -естрадіолу між вершками та знежиреним молоком.

Кількість 17β -естрадіолу в знежиреному молоці була практично в 5-7 раз менша, ніж у вершках.

Отже, для можливого зменшення добового надходження 17β -естрадіолу разом із молочними продуктами під час споживання необхідно знизити масову частку жиру в них.

Результати даних досліджень наведені в наступних публікаціях статті:

Kukhtyn, M., Salata, V., Kochetova, H., Malimon, Z., Miahka, K., Horiuk, Y., Pokotylo, O. (2022). Content of 17β -Estradiol in Raw Milk in Ukraine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 28 (6), 673-679 [150].

Кочетова Г. С., Салата В. З., Кухтин М.Д. Оцінка молока коров'ячого незбираного за вмістом 17β -естрадіолу. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щоріч. наук.- практ. конф. молодих вчених* (Київ, 21 липня 2022 р.). Київ: Компринт, 2022. С. 8. [19].

Кочетова Г. С., Салата В. З., Кухтин М. Д. (2023). Дослідження 17β -естрадіолу у молоці. Матеріали II Міжнародної науково-технічної конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (м. Тернопіль, 24–25 травня 2023 р.), *ТНТУ*, 51. [21].

3.2. Дослідження вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому протягом лактаційного періоду

Повідомляється, що вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому здорових корів залежить від багатьох чинників, які пов'язані з фізіологічним станом організму (період тільності, тічки), від складу кормів раціону, породи, віку тварин [61]. Наводяться дані про вміст 17β -естрадіолу в молоці від 5,6 до 922,3 пг/мл [157, 170]. Результатів досліджень щодо вмісту 17β -естрадіолу у молоці сировині та молочних продуктах виготовлених в Україні в оглянутій доступній літературі нами не виявлено. Водночас відповідно до вимог Комісії Codex Alimentarius максимальна кількість зовнішнього (синтетичного) естрадіолу, що надходить в організм разом з продуктами харчування, не повинна перевищувати 50 000 пг/кг/добу (Codex Alimentarius Commission 2015; EU 2003) [79, 96, 97]. Аналіз українських нормативних документів виявив, що контроль молока сирого, що поступає на переробку за вмістом 17β -естрадіолу не передбачено.

Отже, проведення системних досліджень, які направлені на визначення рівня вмісту 17β -естрадіолу в молоці сировині отриманого на українських фермах із з'ясуванням впливу на кількість даного гормону різних фізіологічних чинників, дозволить на науковій основі визначити максимальну допустиму кількість даного природного гормону у молоці. Враховуючи вище сказане нами було визначити вміст 17β -естрадіолу в молоці сирому протягом лактаційного періоду та протягом естрального циклу.

Зважаючи на те, що кількість 17β -естрадіолу у молоці сирому величина, яка зазнає певних коливань під впливом різних чинників (вміст жиру, термін тільності, годівля, порода, тощо), тому для визначення максимально можливого періоду вмісту гормону під час лактації було проведено дослідження на двох фермах. При цьому на першому етапі метою дослідження було з'ясувати, як змінюється концентрація 17β -естрадіолу в молоці тільних корів від першого місяця і до запуску. Для цього на двох фермах відібрано дві групи тільних корів ($n=10$) по 5 у кожній, молоко, яких досліджували щомісяця. Результати досліджень наведено в табл. 3.5.

З даних табл. 3.5 видно, що протягом тільності концентрація 17β -естрадіолу в молоці сирому поступово зростала, про що вказують вірогідні зміни при порівнянні із першим місяцем тільності на двох фермах. Зокрема на фермі №1 протягом перших трьох місяців тільності кількість 17β -естрадіолу не перевищувала 100 пг/мл молока та в середньому коливалася в межах від $42,4 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл.

Таблиця 3.5

**Вміст 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом лактації, пг/мл,
($\bar{x} \pm SE$; n = 80)**

Номер ферми, порода корів	Місяці (доби тільності)	Кількість досліджених проб	Міні-мальна кількість	Макси-мальна кількість	Середня кількість, $\bar{x} \pm SE$
№1 (чорно-ряба)	1 (15 – 20)	n=5	18,2	63,5	$42,4 \pm 7,7$
	2 (45 – 50)	n=5	27,1	77,3	$51,6 \pm 7,0$
	3 (75 – 80)	n=5	52,4	92,6	$68,3 \pm 7,8$
	4 (115 – 20)	n=5	123,7	156,4	$139,4 \pm 11,8^*$
	5 (145 – 150)	n=5	339,1	581,5	$489,2 \pm 37,1^*$
	6 (175 – 180)	n=5	607,0	1107,1	$836,7 \pm 61,2^*$
	7 (205 – 210)	n=5	912,5	1316,5	$1105,3 \pm 78,5^*$
	8 (230 – 235)	n=5	1133,7	1475,2	$1209,8 \pm 82,4^*$
№2 (голландська)	1 (15 – 20)	n=5	24,3	65,2	$49,3 \pm 7,2$
	2 (45 – 50)	n=5	32,5	81,3	$58,9 \pm 7,4$
	3 (75 – 80)	n=5	57,1	98,5	$76,4 \pm 7,5$
	4 (115 – 120)	n=5	138,4	177,3	$151,8 \pm 12,6^*$
	5 (145 – 150)	n=5	349,6	603,4	$497,3 \pm 36,7^*$
	6 (175 – 180)	n=5	697,8	1132,8	$885,2 \pm 62,1^*$
	7 (205 – 210)	n=5	954,7	1375,6	$1127,6 \pm 77,3^*$
	8 (230 – 235)	n=5	1162,1	1506,4	$1268,1 \pm 85,9^*$

Примітка: *— $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці відібраного в перший, другий та третій місяць тільності.

Починаючи з четвертого місяця тільності кількість стероїдного гормону, в середньому зросла до $139,4 \pm 11,8$ пг/мл, що в 3,2, 2,7 та 2,0 раза ($p < 0,05$) більше, проти першого, другого і третього місяця тільності, відповідно. Динаміка зростання 17β -естрадіолу в наступні місяці тільності була ще більш суттєва. Зокрема, на п'ятому місяці кількість гормону становила $497,3 \pm 36,7$ пг/мл, що в 3,5 раза ($p < 0,05$) більше, ніж на четвертому місяці і практично в 10 разів більше, проти першого місяця тільності. На закінчення терміну лактації, тобто перед запуском – кінець сьомого і восьмого місяця тільності, виявляли максимальну кількість 17β -естрадіолу в молоці – $1105,3 \pm 78,5$ та $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл, відповідно. Дана кількість гормону в 21,4-28,5 раза ($p < 0,05$) більша за початкову кількість, яка була в молоці на першому та другому місяці тільності. Дослідження динаміки зміни 17β -естрадіолу в молоці голштинської породи корів (на другій фермі) не виявило вірогідних змін, порівняно з його вмістом у молоці першої ферми отриманого від чорно-рябої породи корів.

Отже, з проведених досліджень випливає, що протягом лактації вміст 17β -естрадіолу у молоці, істотно залежить від місяця тільності корів. Найменша кількість 17β -естрадіолу виявляється на початку тільності (протягом перших трьох місяців), а найбільша на завершення лактації перед запуском. Це дає підставу вважати, що молоко, яке отримане в останні три місяці тільності буде набагато більшим джерелом 17β -естрадіолу для споживачів молочних продуктів, порівняно з молоком перших місяців тільності, що очевидно необхідно враховувати при виробництві молочних продуктів в цілому.

Наступними дослідженнями необхідно було з'ясувати динаміку вмісту 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом естрального циклу у корів. Дослідження проведено на двох фермах на двох породах корів. Результати наведено в табл. 3.6.

З рис. 3.6 видно, що під час періоду естрального циклу в корів величина вмісту 17β -естрадіолу у молоці зазнавала істотних змін у двох дослідних групах.

Таблиця 3.6

**Вміст 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом естрального циклу, пг/мл,
($\bar{x} \pm SE$; n = 60)**

Номер ферми	Час дослі- дження (доба)	Кількість досліджених проб	Мінімальна кількість	Макси- мальна кількість	Середня кількість, $\bar{x} \pm SE$
№1	3 – 4	n=5	46,3	72,5	$57,1 \pm 6,8$
	6 – 7	n=5	52,5	81,8	$65,6 \pm 7,3$
	9 – 10	n=5	73,4	97,5	$87,4 \pm 7,8$
	13 – 14	n=5	183,6	236,6	$198,7 \pm 12,3^*$
	15 – 16	n=5	328,7	501,4	$365,5 \pm 31,1^*$
	19	n=5	387,5	433,7	$407,3 \pm 39,5^*$
№2	3 – 4	n=5	48,2	77,9	$60,3 \pm 7,0$
	6 – 7	n=5	55,6	92,3	$72,5 \pm 6,7$
	9 – 10	n=5	79,1	108,1	$97,8 \pm 8,6$
	13 – 14	n=5	196,5	243,5	$211,6 \pm 14,5^*$
	15 – 16	n=5	341,4	536,7	$391,3 \pm 33,4^*$
	19	n=5	381,0	479,8	$427,6 \pm 36,1^*$

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці відібраного в перші десять діб естрального циклу.

Зокрема, виявлено, що найменша кількість гормону була протягом перших сім діб дослідження від $57,1 \pm 6,8$ до $65,6 \pm 7,3$ пг/мл. Починаючи з 10 доби естрального циклу кількість 17β -естрадіолу в молоці вірогідно збільшувалася, порівнюючи з вмістом в перші сім діб. Так, на 13-14 добу кількість 17β -естрадіолу становила $198,7 \pm 12,3$ пг/мл, що в 3,5 раза ($p < 0,05$) більша, проти кількості в молоці на третю-четверту добу та в 3,0 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з вмістом на шосту-сьому добу. З 15 по 19 добу естрального циклу кількість 17β -естрадіолу знаходилася в межах, які не мали вірогідного значення. Однак, найбільшу кількість

17 β -естрадіолу реєстрували у молоці у двох групах корів на 19 добу естрального циклу $407,3 \pm 39,5$ пг/мл, що практично в 7,1 раз (p<0,05) більше, ніж у молоці на третю-четверту добу. При порівнянні кількості 17 β -естрадіолу у молоці корів чорно-рябої і голштинської породи протягом усього періоду естрального циклу встановлено дещо більшу кількість гормону в молоці від голштинських корів, проте даний вміст не мав вірогідної різниці.

Таким чином, отримані дані дослідження вказують, що вміст 17 β -естрадіолу у молоці корів протягом естрального циклу вірогідно збільшується, порівнюючи з першими днями циклу. Найбільша його кількість виявлялася починаючи з 15 доби циклу. Це дає підставу вважати, що молоко у даний період може суттєво впливати на величину гормону у молочних продуктах виготовлених із даного молока. При цьому виявлено, що кількість 17 β -естрадіолу у молоці чорно-рябої і голштинської породи корів не має вірогідної різниці.

Отже, в загальному підсумовуючи наші дослідження даного підрозділу можна відзначити, що під час лактаційного періоду у корів відбувається значна зміна рівня естрогенного гормону – 17 β -естрадіолу у молоці. Зокрема, в кінці лактаційного періоду (третій триместр тільності) їх кількість суттєво зростає та також збільшується під час естрального циклу. Встановлена дана динаміка накопичення 17 β -естрадіолу у молоці дає можливість виявляти і прогнозувати виробництво молочних продуктів з мінімальним вмістом естрогенів природного походження. Крім того, враховуючи те, що естрогені гормони синтетичного походження можуть надходити з іншими продуктами тваринного походження за умови їх застосування для стимулювання приростів, молочні продукти у виявлені фізіологічні терміни можуть бути додатковим значним джерелом надходження 17 β -естрадіолу в організм споживачів.

Тому ми вважаємо, що протягом лактації вміст 17 β -естрадіолу у молоці, істотно залежить від місяця тільності корів. Найменшу кількість 17 β -естрадіолу виявляли на початку тільності (протягом перших трьох місяців) від $42,4 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл, а найбільшу на завершення лактації перед запуском – $1105,3 \pm 78,5$ та $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл. Вміст 17 β -естрадіолу у молоці корів протягом естрального

циклу вірогідно збільшується, порівнюючи з першими днями циклу. Найбільшу його кількість виявляли починаючи з 15 доби циклу від 365,5 до 407,3 пг/мл, що практично в 7,1 раза ($p < 0,05$) більше, ніж у молоці на третю-четверту добу.

Отже, молоко отримане в кінці лактації та на закінчення естрального циклу є значним джерелом 17β -естрадіолу, який з молочними продуктами надходить в організм споживачів.

Результати даних досліджень опубліковані в наступній статті: Salata, V., & Kochetova, H. (2022). The Study of the 17β -estradiol content in raw milk during the lactation period. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(105), 44–49 [194].

3.3. Оцінка молока питного і молочних продуктів, які реалізуються в торговельній мережі за вмістом 17β -естрадіолу

Актуально було визначити вміст естрогенного гормону – 17β -естрадіол у молочних продуктах, які реалізуються у торговельній мережі України, оскільки даних про вміст даного гормону в продуктах у нашій країні в доступній літературі не знайдено. Проведення досліджень з моніторингу вмісту 17β -естрадіолу в молоці та молочних продуктах дасть змогу виявити реальну кількість наявного гормону у різних видах продукції та визначити продукти, які найбільше містять 17β -естрадіол. При цьому також було визначено кількість 17β -естрадіолу в молоці питному й молочних продуктах залежно від вмісту масової частки жиру в них.

Виходячи з попередніх наших досліджень, які виявили, що вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання (від $42,4 \pm 7,7$ до $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл), особливо на кількість впливає триместер (період) тільності корів та стадія естрального циклу. Змішування на переробному підприємстві молока незбираного від різних ферм не призводить до суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівняно з молоком отриманим на конкретній фермі в даному регіоні. Проте, технології виробництва молока питного і молочних продуктів передбачають застосування

різних технологічних режимів, які впливають на складові компоненти молочної сировини. Тому дослідження з визначення вмісту 17β -естрадіолу в різних молочних продуктах були предметом подальших досліджень.

На першому етапі досліджень нами було визначено кількісний вміст 17β -естрадіолу в молоці питному з різним вмістом жиру від різних виробників. Результати дослідження наведено в табл. 3.7.

З наведених даних табл. 3.7 видно, що відмічається закономірність зростання вмісту 17β -естрадіолу у молоці питному із збільшенням у ньому масової частки жиру. При цьому найменшу кількість 17β -естрадіолу – $38,1 \pm 4,8$ пг/мл реєстрували у молоці з найнижчим вмістом молочного жиру – 1,0 %. У досліджених пробах молока з масовою часткою жиру в молоці 1,6 % кількість 17β -естрадіолу виявляли в 2,0 рази ($p < 0,05$) більше, порівнюючи з молоком у якому жирність становила 1,0%.

Значно більший вміст 17β -естрадіолу виявляли у молоці питному з вмістом жиру 2,5 % – $218,4 \pm 21,6$ мг/мл, що в 2,8 та 5,7 рази ($p < 0,05$) більша кількість, ніж у пробах молока з 1,6 та 1,0 % жиру, відповідно.

Дослідження проб молока питного з вмістом жиру 3,2 та 3,8 % виявили кількість 17β -естрадіолу $395,9 \pm 34,1$ та $547,8 \pm 49,8$ пг/мл, що практично в 10 разів більший вміст порівнюючи з молоком жирністю 1,0 % та в 1,8 та 2,5 рази ($p < 0,05$) відповідно, ніж у молоці з 2,5 % жиру.

Таблиця 3.7

**Кількість 17β -естрадіолу у молоці питному з різним вмістом жиру,
пг/мл, ($\bar{x} \pm SE$)**

Молоко питне з вмістом жиру, %	Кількість досліджено проб	Мінімальна кількість	Максимальна кількість	Середня кількість, $\bar{x} \pm SE$
1,0	n=5	24,3	51,5	$38,1 \pm 4,8$
1,6	n=5	67,6	97,8	$78,5 \pm 6,3^*$

2,5	n=5	179,5	256,4	218,4±21,6*
3,2	n=5	305,1	531,6	395,9±34,1**
3,8	n=5	489,7	601,2	547,8±49,8**

Примітка.

* – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці питному з 1,0 % жиру;

** – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у молоці питному з 1,0 та 2,5 % жиру.

Таким чином отримані результати дослідження вказують на ліпофільну природу стероїдного гормону 17β -естрадіолу, що виражається значно більшим вмістом його у молоці питному з більшим вмістом жиру. Це також вказує на те, що процес гомогенізації і нормалізації під час технології виробництва молока питного має змогу збільшити або зменшити кількість 17β -естрадіолу шляхом зниження вмісту жиру у готовому продукті.

Наступним етапом досліджень необхідно було визначити вміст 17β -естрадіолу у кисломолочних продуктах, які виготовлені з використанням заквасочних мікроорганізмів різних родів і видів. Крім того проведені в такому напрямку дослідження дозволять з'ясувати чи відбувається вплив молочнокислого бродіння на кількісний вміст естрогеного гормону 17β -естрадіолу у готових молочних продуктах – йогурті та кефірі. У дослідженнях використано проби йогурту і кефіру різних товарних марок та з вмістом молочного жиру в йогурті 1,0 та 2,0 %, а у кефірі – 1,0 та 2,5 %. Результати досліджень наведено в табл. 3.8.

**Характеристика кисломолочних продуктів за вмістом 17 β -естрадіолу,
пг/мл, ($\bar{x} \pm SE$)**

Назва продукту, вміст жиру, %	Виробник продукту, №	Кількість проб	Кількість 17 β - естрадіолу
Йогурт, 1,0	1	3	33,2 $\pm$ 3,5
	2	3	25,5 $\pm$ 3,0
	3	3	36,1 $\pm$ 3,6
Йогурт, 2,0	1	3	157,3 $\pm$ 15,2*
	2	3	165,6 $\pm$ 17,0*
	3	3	144,8 $\pm$ 16,3*
Кефір, 1,0	1	3	35,3 $\pm$ 3,4
	2	3	31,7 $\pm$ 3,3
	3	3	28,6 $\pm$ 2,9
Кефір, 2,5	1	3	208,5 $\pm$ 21,5*
	2	3	178,3 $\pm$ 22,7*
	3	3	184,6 $\pm$ 19,8*

Примітка. * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17 β -естрадіолу у продукті з 1,0 % жиру.

З результатів табл. 3.8 видно таку ж саму закономірність щодо вмісту 17 β -естрадіолу в йогурті та кефірі, як у молоці питному з різним вмістом жиру. Тобто виявляється значно більша кількість 17 β -естрадіолу у молочних продуктах з більшим вмістом жиру, порівняно з такими самими видами продуктів, але з меншою жирністю. Зокрема, у йогурті з масовою часткою жиру 1,0 % кількість 17 β -естрадіолу становила від 25,5 $\pm$ 3,0 до 36,1 $\pm$ 3,6 пг/мл, що залежало від виробника. У йогуртах з жирністю 2,0 % вміст 17 β -естрадіолу виявляли, в середньому, в 4,7 рази ($p < 0,05$) більший, порівнюючи з йогуртами від цих виробників з масовою часткою жиру 1,0 %.

У кефірі з жирністю 1,0 % вміст 17β -естрадіолу був приблизно такий самий, як у йогурті такої жирності і становив від $28,6 \pm 2,9$ до $35,3 \pm 3,4$ пг/мл, що вказує на те, що дані продукти були виготовлені з молока сирого практично від одних виробників. Проте, відмічаємо найбільшу кількість 17β -естрадіолу у кефірі з масовою часткою жиру 2,5 %, в середньому, – 190,5 пг/мл, що в 5,9 раза ($p < 0,05$) більше, ніж у кефірі з 1,0 % жиру. Також виявлено в 1,2 раза більший вміст 17β -естрадіолу в кефірі з 2,5 % жиру, порівняно з йогуртами, які мали вміст жиру 2,0 %. Дане збільшення кількості гормону ймовірно пов'язане з більшим вмістом жиру у продукті.

Загалом отримані результати досліджень вказують не те, що у кисломолочних продуктах, які виготовляються з нормалізованого за вмістом жиру молока, вміст 17β -естрадіолу залежить від масової частки жиру в них. Крім того встановлено, що процеси молочнокислого бродіння, які відбуваються у йогурті під впливом термофільних заквасок молочнокислих паличок і стрептококів та у кефірі під впливом симбіоти кефірного грибка не спричиняють зміни естрогенного гормону 17β -естрадіолу.

Значний науковий інтерес становили дослідження з визначення вмісту 17β -естрадіолу у високожирних продуктах, таких як сметана та масло з різним вмістом молочного жиру [13]. Це перш за все пов'язане із ліпофільною природою стероїдного гормону 17β -естрадіолу. Крім того визначення 17β -естрадіолу у даних продуктах, залежно від вмісту жиру дозволить провести розрахунок можливої кількості надходження даного естрогенного гормону в організм споживачів. У табл. 3.9 наведено результати дослідження сметани відібраної від різних виробників та з різною масовою часткою молочного жиру.

Таблиця 3.9

**Кількість 17β -естрадіолу в сметані з різною масовою часткою жиру,
пг/мл, ($\bar{x} \pm SE$)**

Назва продукту, вміст жиру, %	Виробник продукту, №	Кількість проб	Кількість 17β - естрадіолу
Сметана, 15,0	1	3	$1171,9 \pm 98,3$

	2	3	1258,7 ± 95,2
	3	3	1154,6 ± 92,7
Сметана, 20,0	1	3	1392,6 ± 102,1
	2	3	1408,5 ± 94,3
	3	3	1414,2 ± 93,8
Сметана, 30,0	1	3	1538,4 ± 109,7*
	2	3	1507,8 ± 111,2*
	3	3	1629,5 ± 123,4*

Примітка. * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у продукті з 15,0 % жиру.

З даних табл. 3.9 бачимо, що відмічаються вірогідні зміни вмісту 17β -естрадіолу у пробах сметани, залежно від кількісного вмісту масової частки жиру у них. Так, у сметані з вмістом 15 % жиру, в середньому, кількість естрогенного гормону становила $1195,1 \pm 98,3$ пг/мл. Проте у сметані із більшою масовою часткою жиру – 20,0 % кількість 17β -естрадіолу реєструвалася, в середньому, $1405,1 \pm 102,1$ пг/мл, що практично на 200 пг/мл більше, ніж у сметані жирністю 15 %.

Найвищий вміст 17β -естрадіолу було виявлено у сметані з масовою часткою молочного жиру 30 %, який, в середньому, становив $1558,5 \pm 123,4$ пг/мл. Дана кількість 17β -естрадіолу переважала в 1,3 раза ($p < 0,05$) вміст у сметані з масовою часткою жиру 15 %, що є безпосереднім свідченням ліпофільності естрогенного гормону 17β -естрадіолу.

Загалом, як підсумок даного дослідження бачимо, що вміст 17β -естрадіолу в сметані в декілька разів (5-10) більший, ніж у молоці питному та кисломолочних продуктах, що безпосередньо залежить від вмісту жиру. Також можемо констатувати, що вживання сметани високої жирності буде зумовлювати надходження більшої кількості 17β -естрадіолу в організм споживачів, ніж молока питного і кисломолочних продуктів.

Отже, з даного дослідження випливає, що для зменшення кількісного вмісту 17β -естрадіолу в раціоні людей необхідно домогтися використання низькокалорійних за вмістом молочного жиру продуктів.

Також були проведені дослідження з визначення вмісту 17β -естрадіолу в маслі вершковому селянському з масовою часткою жиру 72,5 %, екстра 82,0 % та бутербродному – 63 %. Результати досліджень наведено в табл. 3.10.

Таблиця 3.10

**Кількість 17β -естрадіолу в маслі з різною масовою часткою жиру,
пг/мл, ($\bar{x} \pm SE$)**

Назва продукту, вміст жиру, %	Виробник продукту, №	Кількість проб	Кількість 17β - естрадіолу
Масло вершкове бутербродне, 63,0	1	3	$2144,3 \pm 156,2$
	2	3	$2028,5 \pm 164,4$
	3	3	$2057,6 \pm 139,5$
Масло вершкове селянське, 72,5	1	3	$3516,5 \pm 247,1$
	2	3	$3702,2 \pm 216,8$
	3	3	$3565,8 \pm 224,3$
Масло вершкове екстра, 82,0	1	3	$4721,3 \pm 304,4^*$
	2	3	$4547,5 \pm 314,2^*$
	3	3	$4631,6 \pm 308,5^*$

Примітка. * – $p < 0,05$ – порівняно з вмістом 17β -естрадіолу у продукті з 63,0 % молочного жиру

З даних табл. 3.10 видно, що кількісний вміст 17β -естрадіолу у маслі, як і в інших молочних продуктах, залежав від масової частки жиру в ньому. Серед досліджених проб масла вершкового найбільший вміст виявляли у пробах масла екстра, в середньому, $4633,5 \pm 308,5$ пг/мл, що практично в 2,2 раза ($p < 0,05$) більша кількість, ніж у маслі бутербродному.

У маслі вершковому селянському виявляли середній вміст 17β -естрадіолу – $3594,8 \pm 247,1$, що в 1,3 раза менша кількість, порівнюючи з пробами масла екстра.

Тобто збільшення вмісту молочного жиру у маслі екстра на 20 і 10 %, порівнюючи з маслом бутербродним і селянським сприяє зростанню кількості 17β -естрадіолу в 2,2 та 1,3 раза відповідно.

Отже, якщо порівняти вміст 17β -естрадіолу в досліджених нами молочних продуктах то у маслі його кількість найбільша, що очевидно пов'язано із найбільшою масовою часткою жиру у даному продукті.

Загалом з отриманих даних щодо моніторингу вмісту стероїдного гормону 17β -естрадіолу в молочних продуктах можна підсумувати наступне. Кількісний вміст 17β -естрадіолу у молочних продуктах перш за все залежить від його вмісту в молоці сировині, яка використовується для виробництва та масової частки жиру в готовому молочному продукті. Простежується чітко виражена тенденція, що чим більш високожирніший молочний продукт, тим більша кількість у ньому естрогенного гормону – 17β -естрадіолу. Очевидно, для зменшення надходження в організм споживачів 17β -естрадіолу необхідно дотримуватися вживання низькокалорійних за вмістом молочного жиру продуктів.

Отже, встановлено закономірність зростання вмісту 17β -естрадіолу в молоці питному із збільшенням у ньому масової частки жиру. При цьому найменшу кількість 17β -естрадіолу – $38,1 \pm 4,8$ пг/мл виявляли у молоці з найнижчим вмістом молочного жиру – 1,0 %, а найбільшу – $547,8 \pm 49,8$ пг/мл – у молоці жирністю 3,8%.

В йогурті та кефірі жирністю 1,0 % кількість 17β -естрадіолу становила від $25,5 \pm 3,0$ до $36,1 \pm 3,6$ пг/мл, що, в середньому, в 4,7 раза менше, ніж у кисломолочних продуктах з масовою часткою жиру 2,0 та 2,5 %.

Найвищий вміст 17β -естрадіолу було виявлено у сметані з масовою часткою молочного жиру 30 % – $1558,5 \pm 123,4$ пг/мл. Дана кількість 17β -естрадіолу переважала в 1,3 раза вміст у сметані з масовою часткою жиру 15 %. У маслі вершковому селянському (72,5 %) середній вміст 17β -естрадіолу становив $3594,8 \pm 247,1$ пг/мл, що в 1,3 раза менше, порівнюючи з пробами масла екстра (82,0 %).

Результати даних досліджень опубліковані в наступній статті: Кухтин, М., Салата, В., Кочетова, Г., Болтик, Н., Перкій, Ю., & Малімон, З. (2022). Оцінка

молока і молочних продуктів за вмістом 17 β -естрадіолу. *Вісник аграрної науки*, 100(6), 30-37 [26].

3.4. Токсико-біологічна характеристика молока-сировини з різним вмістом 17 β -естрадіолу

У науковому світі серед вчених [105, 121, 187] одностайної думки про те, що ризик виникнення раку репродуктивних органів залежить від тривалості та кількості споживання молочних продуктів не повністю підтримується. Дослідники [175] вказують на необхідності подальших глибоких і ґрунтовних досліджень, як на лабораторних тваринах, так і на добровольцях із врахуванням впливу багатьох факторів на розвиток даного процесу.

Отже, дослідження з визначення безпосереднього гострого та хронічного токсичного впливу естрогенних гормонів, зокрема 17 β -естрадіолу, наявного у молоці-сировині, на живих тест-об'єктах та встановлення його біологічної цінності дозволяє метод з використанням одноклітинних організмів, зокрема інфузорій *Tetrachylena pyriformis* [29, 165].

Нами було проведено дослідження з визначення токсико-біологічної оцінки молока-сировини з різним вмістом 17 β -естрадіолу на культурі вільчастої інфузорії *Tetrachylena pyriformis*. Адже, попередньо проведені нами дослідження [150, 194] виявили, що вміст 17 β -естрадіолу у молоці-сировині зазнає значних коливань під час лактації, естрального циклу та особливо впливає на кількість масова частка жиру в молоці питному та молочних продуктах. Враховуючи даний факт з наукової точки зору актуальним є проведення досліджень з визначення біологічної цінності та токсичності такого молока на клітинах тетрахімен. Інфузорії, як біологічні об'єкти мають інтенсивний обмін речовин та швидше реагують на вплив токсичних сполук, крім того зміна 2-4-ох генерацій протягом доби дозволяє виявити вплив токсикантів на генетичний апарат клітини. Показники гострої токсичності молока-сировини з різним вмістом 17 β -естрадіолу наведено в табл. 3.11.

Визначення гострої токсичності молока-сировини з різним вмістом 17 β -естрадіолу через 24 години дослідження, ($x \pm SE$; n=12)

Об'єкт дослідження	Кількість 17 β -естрадіолу, пг/мл	Оцінка форми клітин, рухової активності та розмноження <i>Tetrachylena pyriformis</i> , бали			
		рухова активність	характер руху	пригніченість розмноження	зміна форми
Молоко сировина	20,0-50,0	1	1	1	1
Молоко сировина	500,0-1000,0	1	1	1	1
Молоко сировина	2000,0-2500,0	1	1	1	1
Молоко сировина	5000,0-5500,0	2	1	2	2
Контроль (м'ясопептон-ний бульйон)	—	1	1	1	1

Примітки: у цій і наступній таблиці:

«1» бал – відсутність загибелі клітин, проте можливе зниження активності у 20 % *Tetrachylena pyriformis* – нетоксичне середовище;

«2» бали – зменшення рухової активності, характеру руху інфузорій та пригнічення розмноження до 30 % культур, можлива зміна форми клітин у 10 % інфузорій – помірно-токсичне середовище;

«3» бали – порушення рухової активності, характеру руху у 10-20 % інфузорій та пригнічення розмноження від 30 до 50 % культур, наявність загиблих клітин та зі зміною форми – виражено токсичне середовище;

«4» бали – пригнічення розмноження більше, як у 50 % культур, наявність загинувих клітин та зі значною зміною форми (вигляд барабанних паличок) – сильно токсичне середовище;

З досліджень наведених в табл. 3.11 видно, що за умови вмісту у молоці-сировині 17β -естрадіолу в кількості від 20,0 до 2500 пг/мл змін рухової активності, форми тіла та пригніченості розмноження не спостерігали. Зокрема, тетрахімени були активні, рухалися прямолінійно поступово, а форма тіла була веретеноподібна, без деформацій та випячування і нічим не відрізнялися від інфузорій у контрольному середовищі. Відповідно за такого вмісту естрогенного гормону молоко не спричиняло гострого токсичного впливу на життєдіяльність клітин інфузорій.

За вмісту 17β -естрадіолу у молоці в межах 5000,0-5500,0 пг/мл спостерігали сповільнення рухової активності інфузорій без зміни характеру руху. Крім того відмічали деяку пригніченість розмноження та зміни форми клітин тетрахімен. Появлялися інфузорії з подовженими і коротшими клітинами, порівняно з інфузоріями у контрольному середовищі. Відповідно до оцінки з методичними рекомендаціями [39], таке середовище проявляє помірно-токсичний вплив на культуру *Tetrachymena pyriformis*.

Отже, з результатів даного дослідження випливає, що кількість 17β -естрадіолу в молоці більше 5000,0 пг/мл спричиняє незначний вплив на життєдіяльність і рухову активність інфузорій *Tetrachymena pyriformis*.

У табл. 3.12 наведено дослідження з визначення хронічного впливу різної кількості 17β -естрадіолу наявного в молоці-сировині на культуру *Tetrachymena pyriformis*.

Таблиця 3.12

Визначення хронічної токсичності молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу через 96 годин дослідження, ($x \pm SE$; n=12)

Об'єкт дослідження	Оцінка форми клітин, рухової активності та розмноження <i>Tetrachymena pyriformis</i> , бали
--------------------	--

	Кількість 17β - естрадіолу, пг/мл	рухова активність	характер руху	пригніченість розмноження	зміна форми
Молоко сировина	20,0-50,0	1	1	1	1
Молоко сировина	500,0-1000,0	1	1	1	1
Молоко сировина	2000,0-2500,0	1	1	1	1
Молоко сировина	5000,0-5500,0	2	2	2	2
Контроль (м'ясопептон- ний бульйон)	—	1	1	1	1

З даних табл. 3.12 видно, що протягом 96 годин існування інфузорій в молоці хронічного токсичного впливу на клітини не спостерігали за вмісту 17β -естрадіолу від 20,0 до 2500,0 пг/мл. Тобто рухова активність та характер руху відповідали природнім, як у контрольній пробі, крім того змін у формі та пригніченості розмноження інфузорій не відмічали. Усі визначені нами показники були оцінені в 1 бал.

Додавання 17β -естрадіолу в молоко-сировину у кількості від 5000,0 до 5500,0 пг/мл спричиняло хронічний токсичний вплив на інфузорії, внаслідок чого загальна бальна оцінка по всіх визначених показниках збільшилася до 2 балів. Зокрема, відмічали порушення рухової активності та характеру руху інфузорій – тетраміени мали сповільнений рух, який нагадував маневрний чи коловий і відрізнявся від природного, що був притаманний клітинам у контрольній пробі. Також відмічали зміни форми клітин у деяких інфузорій, вони були з випячуванням, подовжені та деформовані і значно відрізнялися від тетраміен у контрольному середовищі. На

основі даного аналізу було визнано, що дане молоко-сировина з таким вмістом 17β -естрадіолу оцінюється, як помірно-токсичне через прояв хронічної дії.

Отже, результати даного дослідження вказують, що молоко-сировина з кількістю 17β -естрадіолу від 5000,0 до 5500,0 пг/мл може проявляти деякий хронічний токсичний вплив на клітини війчастої інфузорії.

Наступним завданням роботи було визначити біологічну цінність молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу на тест-культурі *Tetrachymena pyriformis*. Суть методу полягає у визначенні кількості інфузорій у дослідних пробах протягом певного часу культивування, порівнюючи з кількістю у контрольній пробі. Результати дослідження відносної біологічної цінності молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу протягом 24 години культивування наведено в табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Показник відносної біологічної цінності молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу через 24 години дослідження, ($x \pm SE$; $n=12$)

Об'єкт дослідження	Кількість 17β -естрадіолу, пг/мл	Кількість живих – активних інфузорій в 1 мл молока, шт.	Кількість загиблених інфузорій в 1 мл молока, шт.	Відносна біологічна цінність, %
Молоко сировина	20,0-50,0	$39,75 \pm 0,19 \times 10^4$	$1,37 \pm 0,11 \times 10^3$	98,5
Молоко сировина	500,0-1000,0	$39,37 \pm 0,16 \times 10^4$	$1,41 \pm 0,14 \times 10^3$	98,1
Молоко сировина	2000,0-2500,0	$39,18 \pm 0,15 \times 10^4$	$1,35 \pm 0,13 \times 10^3$	97,6
Молоко сировина	5000,0-5500,0	$37,58 \pm 0,11 \times 10^4$	$2,31 \pm 0,17 \times 10^3$	93,64*
Контроль (м'ясопепто)	—	$40,13 \pm 0,34 \times 10^4$	$1,43 \pm 0,15 \times 10^3$	100

ний бульйон)				
-----------------	--	--	--	--

Примітка. * $p < 0,05$ – порівняно з контролем

З даних табл. 3.13 видно, що кількість інфузорій у пробах молока-сировини з вмістом 17β -естрадіолу від 20,0 до 2500,0 пг/мл становила від $39,18 \pm 0,15$ до $39,75 \pm 0,19 \times 10^4$ штук в 1 мл, а кількість загиблих інфузорій становила, в середньому $1,35 \pm 0,13 \times 10^3$ штук в мл. При цьому відносна біологічна цінність такого молока коливалася у межах 97,6-98,5 %, тобто зниження біологічної цінності не мало вірогідного значення.

У пробах молока-сировини з кількістю 17β -естрадіолу 5000,0-5500,0 пг/мл кількість інфузорій становила $37,58 \pm 0,11 \times 10^4$ штук/мл, тобто в середньому на 2 тисячі менша кількість, ніж у пробах з меншим вмістом естрогенного гормону. При цьому у даних пробах відмічено збільшення в середньому в 1,7 раза ($p < 0,05$) кількості загиблих інфузорій, порівнюючи з пробами молока-сировини з меншим вмістом гормону та контрольним середовищем. Також, спостерігаємо зниження до 93,64 % відносної біологічної цінності молока-сировини з найбільшим вмістом 17β -естрадіолу, тобто, в середньому на 4-5 % нижча цінність даного молока, порівнюючи з молоком з кількістю естрогенного гормону від 20,0 до 2500,0 пг//мл.

Отже, з отриманих даних бачимо, що протягом 24 години культивування інфузорій в пробах молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу, найнижчу біологічну цінність спостерігали у молоці з найбільшою взятою у досліді кількістю гормону – 5000,0-5500,0 пг/мл.

У табл. 3.14 наведено дані дослідження визначення біологічної цінності молока-сировини за умови тривалішого культивування у ньому інфузорій – 96 годин.

Таблиця 3.14

Показник відносної біологічної цінності молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу через 96 годин дослідження, ($x \pm SE$; $n=12$)

Об'єкт дослідження	Кількість 17β -естрадіолу, пг/мл	Кількість живих – активних інфузорій в 1 мл молока, шт.	Кількість загинувших інфузорій в 1 мл молока, шт.	Відносна біологічна цінність, %
Молоко сировина	20,0-50,0	$31,09 \pm 0,14 \times 10^4$	$1,25 \pm 0,10 \times 10^3$	98,6
Молоко сировина	500,0-1000,0	$30,98 \pm 0,12 \times 10^4$	$1,21 \pm 0,12 \times 10^3$	98,2
Молоко сировина	2000,0-2500,0	$30,82 \pm 0,11 \times 10^4$	$1,22 \pm 0,09 \times 10^3$	97,7
Молоко сировина	5000,0-5500,0	$28,14 \pm 0,13 \times 10^4$	$3,01 \pm 0,14 \times 10^3$	89,22*
Контроль (м'ясопептонний бульйон)	—	$31,54 \pm 0,15 \times 10^4$	$1,13 \pm 0,07 \times 10^3$	100

Примітка. * $p < 0,05$ – порівняно з контролем

З даних табл. 3.14 видно зменшення загальної кількості інфузорій у всіх пробах молока та в контролі, порівнюючи з такими пробами, які були дослідженні протягом 24 год. Це вказує на те, що протягом 96 годин культивування відбулося збіднення проб на поживні речовини та накопичення токсичних продуктів. Однак, виявлено аналогічну тенденцію, щодо зменшення кількості живих інфузорій в молоці сировині з мінімальним вмістом 17β -естрадіолу, порівнюючи з пробами молока з максимальною кількістю естрогенного гормону. Зокрема, відносна біологічна цінність молока-сировини з вмістом 17β -естрадіолу до 2500,0 пг/мл становила від 98,6 до 97,7 %, а у пробах молока-сировини з максимальною

кількістю гормону (5000,0-5500,0 пг/мл) зменшилася в середньому на 10 % до 89,22 % ($p < 0,05$).

Отже, зниження відносної біологічної цінності молока при тривалішому культивуванні очевидно можна пояснити, як хронічним впливом 17β -естрадіолу, так і ймовірно через накопичення токсичних продуктів життєдіяльності інфузорій.

Таким чином підсумовуючи результати експериментального дослідження можна відзначити наступне. Чітко проглядається факт більш вираженого хронічного впливу значної кількості (5000,0-5500,0 пг/мл) 17β -естрадіолу у молоці-сировині на рухову активність, форму клітин та інтенсивність розвитку тетрахімен, порівнюючи з дослідженнями із визначення гострої дії. Крім того, виявлено вірогідні зміни зниження біологічної цінності молока з максимальним вмістом 17β -естрадіолу за гострого та хронічного впливу на інфузорій, порівнюючи з молоком із значно меншим вмістом естрогенного гормону. Тому отримані дані вказують на те, що за кількості 17β -естрадіолу у молоці більше 5000,0 мг/мл відбувається хронічний токсичний вплив на клітини *Tetrachymena pyriformis*.

Загалом, отримані результати дають підставу вважати, що кількість 17β -естрадіолу у молоці сирому навіть за найбільшого природного вмісту (до 1000 пг/мл у третьому триместрі тільності) не може спричиняти токсичного впливу та знижувати його відносну біологічну цінність відносно клітин *Tetrachymena pyriformis*.

Отже, за умови вмісту у молоці-сировині 17β -естрадіолу в кількості від 20,0 до 2500 пг/мл змін рухової активності, форми тіла та пригніченості розмноження інфузорій не відмічається. Встановлено, що за вмісту 17β -естрадіолу в молоці в межах 5000,0-5500,0 пг/мл проявляється більш виражений токсичний вплив на культури інфузорії *Tetrachymena pyriformis* за культивування протягом 96 годин, проти 24 години інкубації. Відносна біологічна цінність молока-сировини з вмістом 17β -естрадіолу до 2500,0 пг/мл становила від 98,6 до 97,7 %, а у пробах молока-сировини з максимальною кількістю гормону (5000,0-5500,0 пг/мл) зменшилася в середньому на 10 % до 89,22 %. За кількості 17β -естрадіолу у молоці більше 5000,0

мг/мл виявляється хронічний токсичний вплив на інфузорії *Tetrachymena pyriformis*.

Результати даних досліджень опубліковані в наступній статті: Kochetova, H., Salata, V., Kukhtyn, M., Zghozinska, O., & Melnyk, V. (2023). Toxicological characteristics of raw milk with different contents of 17β -estradiol. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 25(109), 19-25 [141].

3.5. Дослідження зміни 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів

Важливу частину нашої роботи становили дослідження щодо визначення кількісної зміни 17β -естрадіолу під час технологічних процесів виробництва багатьох молочних продуктів. Крім того у технології виробництва молочних продуктів завжди застосовують певні режими теплової обробки молока-сировини, залежно від мікробного забруднення та тривалості зберігання продукту. Тому важливо було з'ясувати вплив різної температури пастеризації на динаміку зміни 17β -естрадіолу у молоці питному. Також, загальновідомо, що в більшості технологіях виробництва молочних продуктів використовують заквасочні мікроорганізми, тобто відбувається молочнокислий процес під час їх виробництва. З наукової точки зору, зацікавленість становлять дослідження, які мають на меті з'ясувати чи під час молочнокислого бродіння відбувається зміна вмісту 17β -естрадіолу у готових продуктах. Визначення впливу мікробіологічних і біохімічних змін у молоці на кількість 17β -естрадіолу в перспективі дало б змогу використовувати молоко з підвищеним вмістом гормону, особливо в третьому триместрі тільності, у технологіях, які його зменшують.

Тому, на першому етапі даної частини досліджень ми вивчали вплив різних режимів пастеризації на динаміку 17β -естрадіолу у пастеризованому молоці. На другому етапі досліджень визначали, як змінюється кількість 17β -естрадіолу у технологіях виробництва високожирних молочних продуктів – масла вершкового з

різною масовою часткою жиру, які як показали попередні дослідження мають найбільшу кількість естрогенного гормону, порівнюючи з іншими продуктами. На третьому – вплив молочнокислого бродіння за участі різних заквасочних мікроорганізмів на вміст 17β -естрадіолу в кисломолочних продуктах.

На рис. 3.3 наведено результати досліджень впливу низькотемпературного (лагідного) режиму теплової обробки молока-сировини на вміст 17β -естрадіолу. Даний режим найчастіше застосовують для пастеризації молока сирого гатунку екстра, тобто за температури $77,0 \pm 1$ °C протягом 1 хв. При цьому у дослідженнях використано проби молока-сировини з різним початковим вмістом 17β -естрадіолу, який реєструється у корів на різних стадіях лактації. У пробах першої групи кількість 17β -естрадіолу становила $17,3 \pm 1,5$ пг/мл; другої – $57,6 \pm 3,9$ пг/мл та третьої – $409,5 \pm 34,1$ пг/мл.



Рис. 3.3. Вплив пастеризації молока-сировини за температури $77,0 \pm 1$ °C протягом 1 хв на величину 17β -естрадіолу у молоці пастеризованому, $\bar{x} \pm SD$, n = 5

З аналізу даних рис. 3.3 бачимо, що за використання низько температурного режиму пастеризації суттєвих змін щодо зменшення кількості 17β -естрадіолу у пастеризованому молоці, порівнюючи з сирим не спостерігається. Зокрема, за

умови мінімальної кількості гормону в молоці-сирому $17,3 \pm 1,5$ пг/мл, його вміст у пастеризованому молоці зменшився до $16,0 \pm 1,2$ пг/мл, тобто тільки на 1,3 пг/мл. У другому варіанті досліді з початковим вмістом гормону $57,6 \pm 3,9$ пг/мл, зменшення його у пастеризованому молоці також було не суттєвим, всього на 2,8 пг/мл. У третьому варіанті досліді з найбільшим початковим вмістом 17β -естрадіолу в молоці-сировині, після пастеризації його кількість була менша на 17,8 пг/мл і становила $391,7 \pm 31,4$ пг/мл.

Отже, результати даного досліді вказують на те, що низько температурна обробка молока за $77,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв не змінює структуру естрогенного гормону 17β -естрадіолу, внаслідок чого його кількість практично не змінюється у пастеризованому молоці.

Для молока-сировини нижчих гатунків за кількістю МАФАНМ (вищого та першого) на переробному підприємстві застосовують більш «жорсткі» вищі температури теплової обробки для максимального знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Тому нами досліджено вплив режиму пастеризації за температури $85,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв на зміну 17β -естрадіолу у питному молоці. Результати досліджень наведено на рис. 3.4.

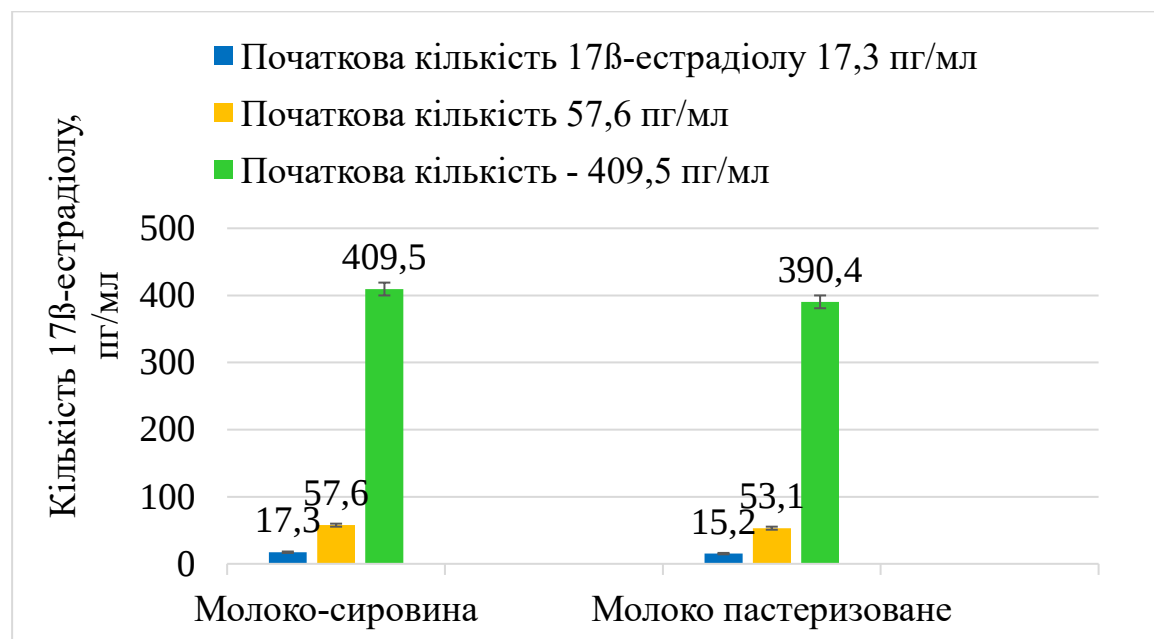


Рис. 3.4. Вплив пастеризації молока-сировини за температури $85,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв на величину 17β -естрадіолу у молоці пастеризованому, $x \pm SD$, $n = 5$

З даних рис. 3.4 видно, що температура пастеризації $85,0 \pm 1,0$ °C з витримкою протягом 1 хв, також не суттєво впливала на динаміку зменшення 17β -естрадіолу в молоці. Зокрема, відмічаються практично аналогічні зміни щодо зменшення гормону, як і в молоці, яке піддавалося тепловій обробці за температури $77,0 \pm 1$ °C. Так, за найменшої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині, його кількість після пастеризації зменшилася всього на 2,1 пг/мл і становила, в середньому $15,2 \pm 1,2$ пг/мл. У другому варіанті дослід з початковою кількістю 17β -естрадіолу $57,6 \pm 3,9$ пг/мл кількість гормону у пастеризованому молоці становила $53,1 \pm 3,0$ пг/мл, тобто, в середньому на 4,5 пг/мл менше, ніж у молоці-сировині. У третьому варіанті з найбільшою початковою кількістю естрогенного гормону, після пастеризації реєстрували в середньому кількість 17β -естрадіолу 390,4 пг/мл, що на 19,1 пг/мл (4,7 %) менше, порівнюючи з його вмістом до пастеризації.

Отже, отримані результати вказують, що 17β -естрадіол у молоці є термостійким гормоном, який не має тенденції до значного зменшення під впливом високих температур пастеризації. Проте, в загальному з дослідження випливає, що навіть високі режими теплової обробки не зменшують кількість гормону у молоці пастеризованому більше, як на 5 % від його початкового вмісту.

У молочній галузі, окрім пастеризації молока-сировини застосовують стерилізацію, яка відбувається за температури 100 і вище градусів Цельсія з метою повного знищення всієї мікрофлори, як вегетативних, так і спорових форм мікроорганізмів. Стерилізоване молоко, має ряд переваг, перед пастеризованим у плані можливого його довготривалого терміну зберігання (пів року і більше). Проте, для досягнення таких показників необхідно проводити його стерилізацію, яка крім впливу на мікробіологічні показники, значно змінює білкову і жирову структуру молекул молока, іннактивує ферменти, руйнує вітаміни, тощо. Тому нами було досліджено вплив кип'ятіння молока-сировини протягом 5 хв на зміну 17β -естрадіолу. Результати дослідження наведено на рис. 3.5.

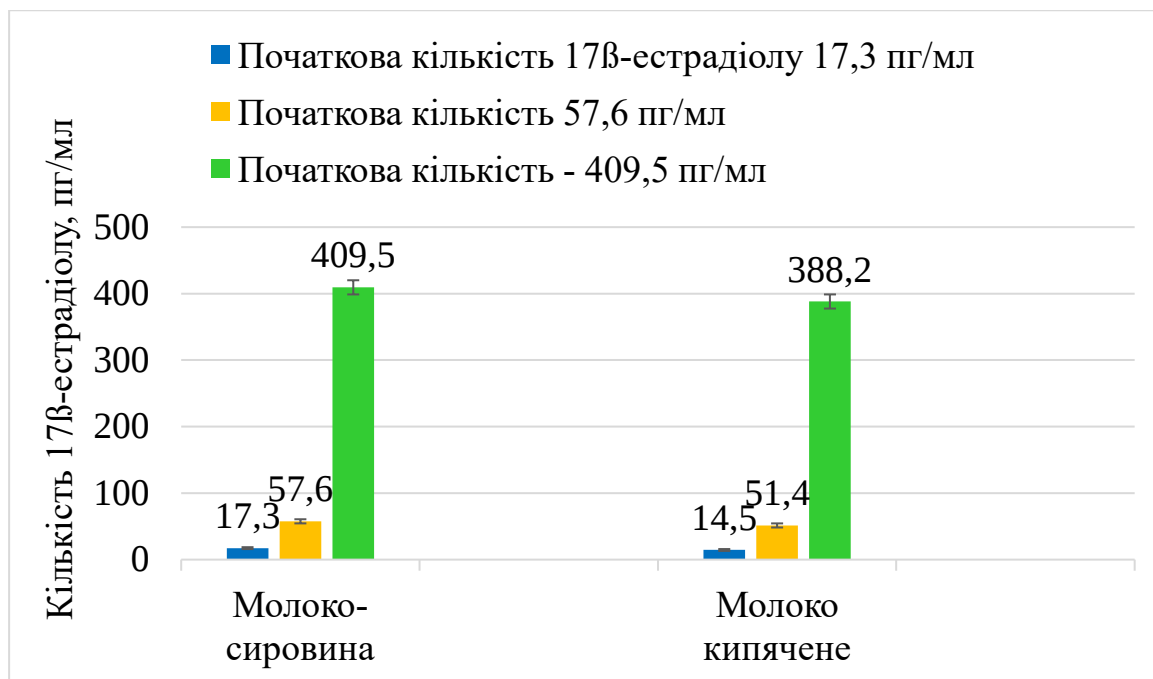


Рис. 3.5. Вплив кип'ятіння молока-сировини протягом 5 хв на величину 17β-естрадіолу у молоці кип'яченому, $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$

З даних рис. 3.5 видно, що процес кип'ятіння молока сировини протягом 5 хв істотно не впливав на зміну концентрації 17β-естрадіолу у прокип'яченому молоці. Загальна тенденція така ж, як при пастеризації за низької і високої температури. Проте, під час кип'ятіння кількість гормону зменшилася у першому варіанті досліду, в середньому на 2,8 пг/мл, проти 2,1 пг/мл за пастеризації при температурі $85,0 \pm 1$ °C.

У другому варіанті досліду з початковою кількістю 17β-естрадіолу $57,6 \pm 3,9$ пг/мл вміст гормону зменшився у кип'яченому молоці, в середньому на 6,2 пг/мл, проти 4,5 пг/мл у пастеризованому молоці за $85,0 \pm 1$ °C. Водночас, у третьому варіанті досліду з найбільшим вмістом естрогенного гормону в молоці-сировині, зменшення, в середньому було на 21,3 пг/мл в молоці кип'яченому. Проте, різниця між вмістом 17β-естрадіолу в молоці кип'яченому та пастеризованому за найвищої температури була не вірогідною.

Отже, з дослідження випливає, що хоч кип'ятіння, як тепловий процес, спричиняє більш інтенсивні зміни фізико-хімічного складу молока, проте значного руйнування естрогенного гормону – 17β-естрадіолу не спостерігається. Очевидно,

це пов'язано з тим, що 17β -естрадіол відноситься до термостабільного гормону, який не зазнає істотного руйнування за різних температурних режимів, які використовуються у молочній галузі для пастеризації і стерилізації молока-сировини. Тому можна стверджувати, що у молочних продуктах, які піддавалися пастеризації чи стерилізації концентрація 17β -естрадіолу суттєво не буде відрізнятися від початкової кількості у молоці-сировині.

Попередні наші дослідження, які наведені в розділі 3.3, виявили, що високожирні молочні продукти (сметана, масло) містять в декілька разів більшу кількість 17β -естрадіолу, порівнюючи з низькокалорійними молочними продуктами та молоком питним. Це пов'язано з більшою розчинністю естрогенного гормону в ліпідах молока та саме його концентрування в молочному жирі. Тому високожирні молочні продукти вважаються потенційним та більш вагомим джерелом 17β -естрадіолу для споживачів. Враховуючи те, що під час технології виробництва масла вершкового застосовується велика кількість складних технологічних операцій з оброблення вершків, нами було досліджено на переробному підприємстві зміни вмісту 17β -естрадіолу по всьому технологічному ланцюгу виробництва масла способом збивання вершків. При цьому враховували розподіл гормону по ходу його виробництва: молоко-сировина, вершки, масло, маслянка. Досліджено масло під час двох технологій виробництва: екстра з масовою часткою молочного жиру – 82,0 % та селянське з вмістом жиру 72,5 %. Результати дослідження наведено на рис. 3.6.

З даних рис. 3.6 видно, що під час технології сепарування молока і відділення вершків у них виявляється в середньому в 7 разів ($p < 0,05$) більша кількість 17β -естрадіолу, порівнюючи з кількістю, яка була в молоці. Після збивання вершків у готових продуктах з масовою часткою жиру 72,5 та 82,0 %, кількість 17β -естрадіолу становила $3361,0 \pm 54,3$ пг/мл та $3896,1 \pm 67,5$ пг/мл, відповідно. Тобто вміст 17β -естрадіолу у маслі збільшувався в 2,6 та 2,9 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з його кількістю у вершках, що залежало від масової частки жиру в ньому.

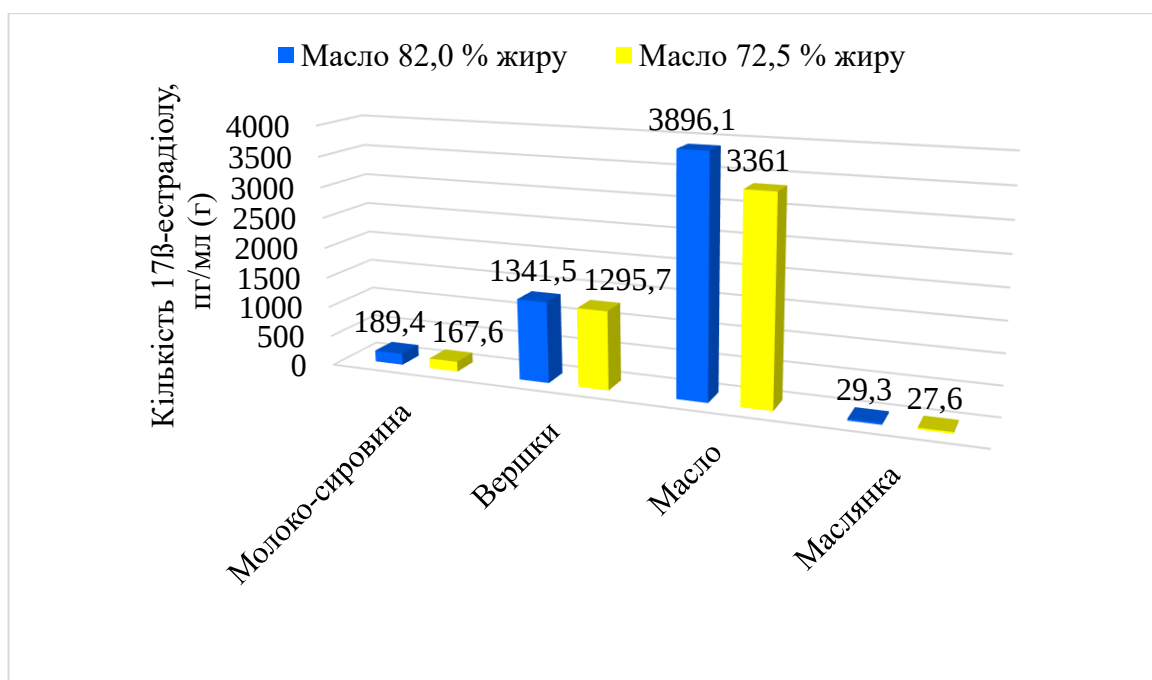


Рис. 3.6. Динаміка зміни вмісту 17β -естрадіолу за технології виробництва масла вершкового, $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$

Водночас у пробах маслянки виявили значно менші кількості 17β -естрадіолу, порівнюючи з пробами масла та навіть молока-сировини. Зокрема концентрація гормону у маслянці з двох видів масла була в межах 27,6-29,3 пг/мл, що вказує на погану розчинність 17β -естрадіолу у водних розчинах та його гідрофобність.

Отже, узагальнюючи результати даного дослідження відмічаємо, що за технології виробництва масла методом збивання вершків основна частина 17β -естрадіолу концентрується у маслі, а у маслянку переходить, в середньому 0,8 % гормону від загальної його кількості в маслі. Тому на нашу думку технологія виробництва масла не може бути використана для зменшення частки 17β -естрадіолу у випадку його високого вмісту у молоці-сировині чи вершках. Для цього необхідно пошук інших можливих технологій переробки чи режимів зберігання для зменшення вмісту 17β -естрадіолу у молоці-сировині, особливо отриманого в третій триметстер тільності корів.

З досліджень відомо [148], що застосування режимів холодильного зберігання м'яса яловичини дозволило зменшити в ньому кількість такого естрогенного синтетичного гормону, як зеранол, приблизно до 30 % протягом 3 міс.

зберігання. Враховуючи дані результати нами було проведено дослідження впливу різних режимів холодильного зберігання масла на зміну 17β -естрадіолу в ньому. Використали стандартні режими зберігання масла вершкового, які наведені в ДСТУ 4399:2005 [12], зокрема за температури $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 міс, мінус $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 9 міс, і за мінус $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 9-12 місяців. Результати досліджень наведено на рис. 3.7.

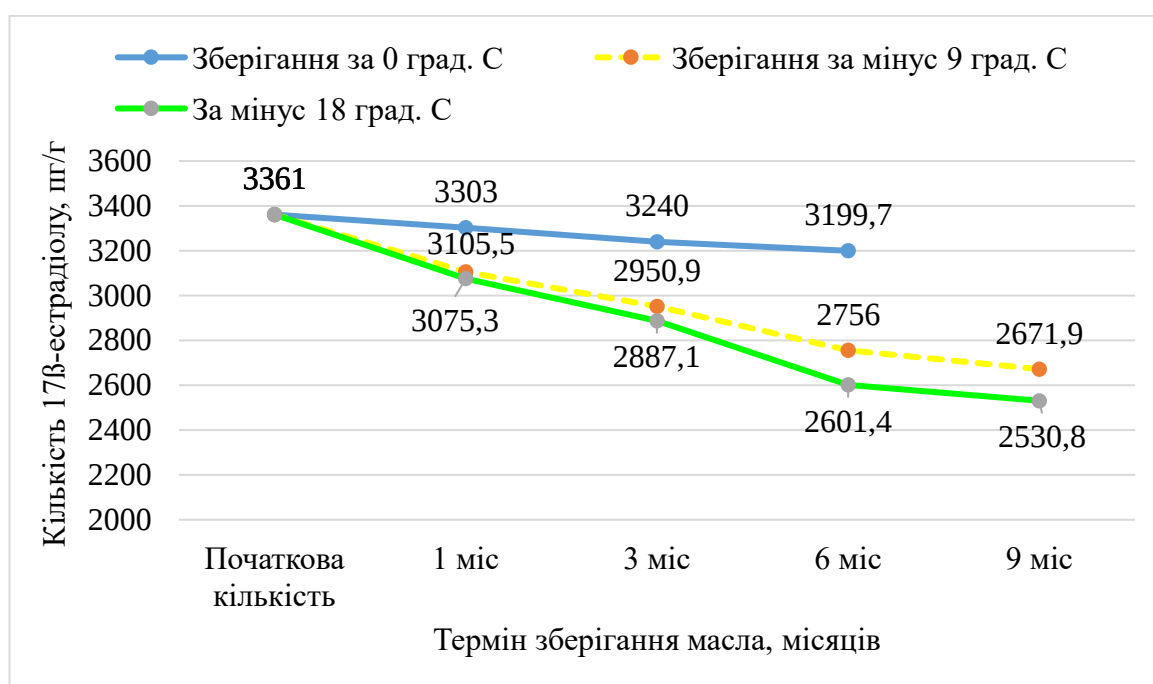


Рис. 3.7. Зміни вмісту 17β -естрадіолу у маслі під час холодильного зберігання, $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$

З даних рис. 3.7 видно, що спостерігається тенденція до зменшення кількості 17β -естрадіолу у маслі під час зберігання за всіх трьох режимів, але найінтенсивніше за найнижчого температурного режиму ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Зокрема, за зберігання при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом трьох місяців, як це дозволено стандартом кількість 17β -естрадіолу зменшилася всього на 3,6 %. Під час вдвічі довшого терміну зберігання (6 міс) зменшення гормону було незначним до 5 %.

Зниження температурного режиму зберігання масла до $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ більш інтенсивно впливало на зменшення кількості 17β -естрадіолу, порівнюючи з температурою $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Так, протягом трьох місяців зберігання продукту кількість гормону зменшилася, в середньому на 12,2 %, що практично в 3,4 раза ($p < 0,05$)

інтенсивніша динаміка, ніж за температури 0 °С. Наступне зберігання масла протягом трьох місяців (6 міс від початку) також зумовило зменшення вмісту 17 β -естрадіолу, в середньому в 1,5 раза ($p < 0,05$) до 18,0 %. При цьому кількість гормону у маслі в даний період була у 3,8 раза ($p < 0,05$) меншою, ніж за зберігання при 0 °С. Проте, подальше зберігання до 9 місяців значною мірою не вплинуло на зменшення кількості 17 β -естрадіолу в маслі, так як його вміст зменшився на 20,5 % від початкової кількості у свіжому продукті.

За режиму зберігання при – 18 °С процес зменшення естрогенного гормону проходив найінтенсивніше. Так, протягом трьох місяців зберігання вміст 17 β -естрадіолу зменшився, в середньому на 14,1 %, що в 3,9 раза ($p < 0,05$) інтенсивніша динаміка, ніж при зберіганні за 0 °С та тільки в 1,2 раза менша, ніж за – 9 °С. На дев'ятий місяць зберігання кількість 17 β -естрадіолу була менша, в середньому на 24,7 %, проти 20,5 % за – 9 °С зберігання.

Отже, з даного досліджу впливає, що за умови використання режиму зберігання масла при – 18 °С протягом 9 місяців можливо досягнути зменшення кількості 17 β -естрадіолу до 25 %, а за температури – 9 °С до 20 %. Таким чином у маслі вершковому із значним вмістом 17 β -естрадіолу під час замороженого режиму зберігання відбудеться доволі суттєве зниження естрогенного гормону. Даний процес можна використати для масла вершкового, яке отримане від корів на останніх місяцях лактації, яке містить високий рівень естрогену.

Наступною частиною досліджень даного розділу було з'ясувати, як впливає процес молочнокислого бродіння на зміни 17 β -естрадіолу. При цьому дослідження було проведено у двох варіантах: у першому визначали кількісні зміни гормону у молоці під час самоскисання. У другому варіанті досліджували зміни вмісту 17 β -естрадіолу під час технологічного процесу виготовлення йогурту, тобто за впливу чистих культур молочнокислих мікроорганізмів. У досліді використано молоко-сировину з різним початковим вмістом 17 β -естрадіолу. Результати дослідження першого варіанту досліджу наведено на рис. 3.8.



Рис. 3.8. Вплив молочнокислого процесу на зміну вмісту 17 β -естрадіолу в процесі самоскисання, $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$

З даних рис. 3.8 видно, що під час молочнокислого процесу, який відбувається під впливом власної мікрофлори молока-сировини істотних змін щодо зменшення кількості 17 β -естрадіолу у всіх варіантах дослідження не спостерігається. Кількість естрогенного гормону у кислому молоці через 48 год скисання, в середньому зменшувалася на 2-7 пг/мл, що не вірогідно проти початкового вмісту 17 β -естрадіолу. Це вказує на те, що стероїдний гормон 17 β -естрадіол не руйнується під дією молочної кислоти, яка накопичується в результаті молочнокислого бродіння. При цьому через 12 год скисання титрована кислотність становила 48 ± 4 °Т, через 24 год – 78 ± 5 °Т, а через 48 – 124 ± 7 °Т. Результати досліджень зміни титрованої кислотності у процесі самоскисання молока наведено на рис. 3.9.



Рис. 3.9. Зміна величини титрованої кислотності за процесу самоскисання молока у пробах з різним вмістом вмістом 17β-естрадіолу, $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$

З рис. 3.9 спостерігаємо закономірний процес, який відбувається під час молочнокислого бродіння, зокрема біохімічні зміни з накопичення молочної кислоти. Це вказує на те, що титрована кислотність молока наростала, а зміна вмісту естрогенного гормону не була суттєвою.

На рис. 3.10 наведено результати дослідження щодо зміни 17β-естрадіолу під час технології виробництва йогурту. При цьому для заквашування використовували закваску чистих культур мікроорганізмів, яка складається із термофільного стрептокока – *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* та болгарської палички – *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Тривалість сквашування відбувалася протягом 6 год до величини титрованої кислотності в межах 80-85 ° Т. Потім продукт охолоджувався та проходив процес дозрівання протягом 2 годин за низьких температур 6-8 °С та охолоджувався до + 2 °С.

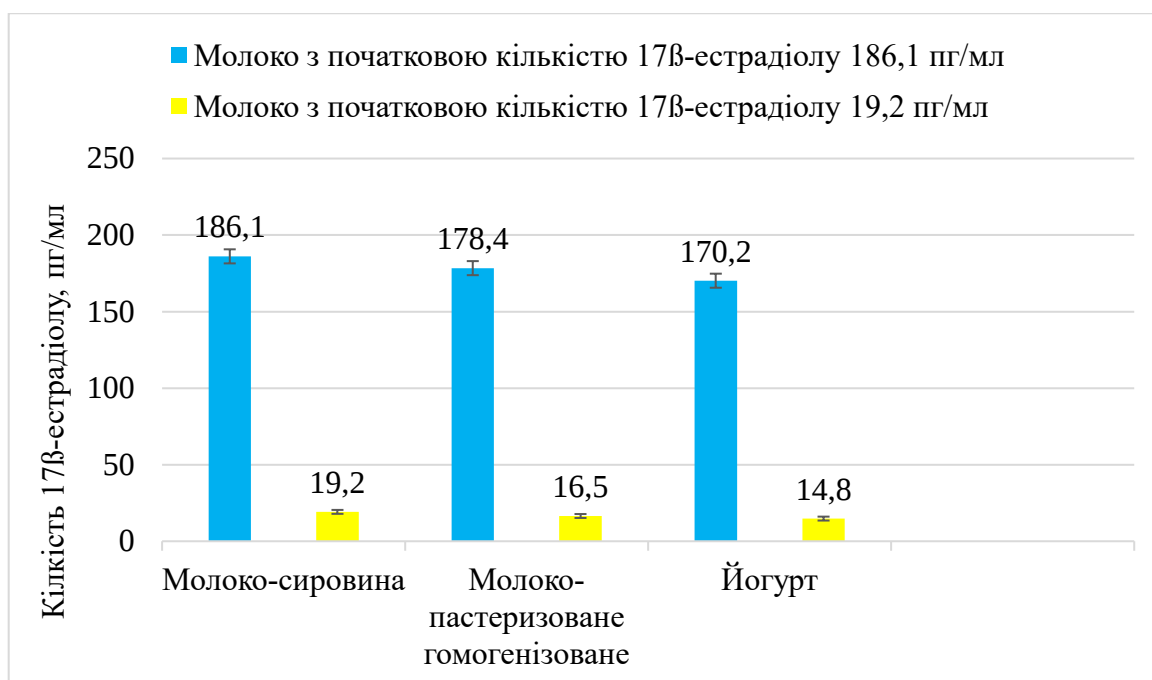


Рис. 3.10. Зміни вмісту 17β-естрадіолу за технології виробництва йогурту, $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$

З рис. 10 видно, що після процесу пастеризації та гомогенізації молока кількість 17β-естрадіолу зменшився, в середньому на 2,7 пг/мл у пробах з незначним вмістом та на 7,7 пг/мл з високим гормоном. Під час сквашування молока кількість гормону в йогурті в обох варіантах зменшилася незначно на 1,7 та 8,2 пг/мл, відповідно. В загальному під час всієї технології виробництва йогурту його вміст зменшився у варіанті з незначною початковою кількістю на 4,4 пг/мл та у варіанті із значною кількістю 17β-естрадіолу на 15,9 пг/мл. Даний процес в основному пов'язаний із такою технологічною операцією, як гомогенізація.

Загалом за результатами даного досліджу бачимо, що під час молочнокислого процесу бродіння, як за участі мікрофлори сирого молока, так і з використанням чистих культур молочнокислих бактерій суттєвих змін щодо зменшення кількості 17β-естрадіолу у готових продуктах не спостерігається.

Отже, підсумовуючи результати досліджень щодо впливу різних технологічних режимів на динаміку зменшення 17β-естрадіолу у молоці та молочних продуктах можна відзначити наступне. Такі технологічні операції з обробки молока сировини, як низько та високо температурні режими пастеризації

та стерилізації, практично не впливають на зміну 17β -естрадіолу у готовому продукті. Також встановлено, що найбільша кількість естрогенного гормону реєструється у маслі вершковому з найбільшою масовою часткою молочного жиру. До того ж зберігання масла у замороженому стані за температури мінус 9 °C та мінус 18 °C протягом 6-9 міс дозволяє зменшити кількість 17β -естрадіолу, приблизно на 20-25 % від його початкової кількості. Тому можна пропонувати виробництву застосування режиму зберігання масла у замороженому стані для зменшення його вмісту, особливо у партіях, які отримані від корів в кінці лактаційного періоду.

Результати даних досліджень наведені в наступних публікаціях:

Kochetova, H. S., Kukhtyn, M. D., Salata, V. Z., Horiuk, Y. V., Kladnytska, L. V., & Matviishyn, T. S. (2023). Dynamics of 17β -estradiol under influence of technological operations during production of dairy products. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(1), 48-54 [140].

Кочетова Г. С., Салата В. С., & Кухтин, М. Д. (2023). Зміна 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів. Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.), *ЛНУВМБ*, 29-30 [20].

3.6. Розроблення методології визначення гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку

Під час визначення безпечної концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині ми виходили з таких концептуальних, положень, які базуються на аналізі літературних джерел [156, 128, 170, 190] та отриманих нами даних експериментальних досліджень [150, 194]. Зокрема:

1. 17β -естрадіол – це естрогенний стерідний гормон, який може мати природне та синтетичне походження. Природний гормон утворюється в організмі корів і циркулює в плазмі крові та переходить у молоко під час його синтезу, тому

наявність у молоці-сировині певної концентрації гормону природного походження процес невідворотний і беззаперечний.

2. Наявність у молоці-сировині 17β -естрадіолу синтетичного походження можливе під час його використання для підвищення молочної продуктивності тварин та зниження собівартості і підвищення рентабельності отриманого молока. Крім того наявність синтетичного гормону у молоці можливе за використання його для профілактики і лікування різних захворювань репродуктивної системи корів.

3. Використання синтетичного 17β -естрадіолу у тваринництві для підвищення продуктивності тварин нормативно-правовими актами Європейського Союзу та Комісії Codex Alimentarius [79, 96, 97] суворо заборонено. Тому при визначенні гранично допустимої безпечної концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині необхідно орієнтуватися тільки на ту кількість природного гормону, яку синтезують корови, за умови виключення надходження зовнішнього 17β -естрадіолу.

4. Комісія Codex Alimentarius рекомендує, щоб максимально допустима добова концентрація зовнішнього 17β -естрадіолу, що надходить в організм споживачів з усіма харчовими продуктами не перевищувала 50 нг/кг (50000 пг/кг).

4. Високі концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині викликають занепокоєння через їхній хронічний вплив і підвищений ризик спричинення онкологічних захворювань репродуктивної системи у жінок (рак молочної залози, яєчників, матки) і чоловіків (сім'яників, простати). Крім того впливає на порушення розвитку статеві і центральної нервової системи у дітей препубертатного віку. Водночас з молоком питним та молочними продуктами надходить в організм споживачів 60-80 % 17β -естрадіолу, від усіх спожитих харчових продуктів.

5. Концентрація природного 17β -естрадіолу у молоці-сировині здорових корів залежить від багатьох чинників, які пов'язані з фізіологічним станом організму (період тільності, тічки), від складу кормів раціону, породи, віку тварин, тощо. Тому при розробці гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу в

молоці-сировині необхідно враховувати усі чинники, які можуть вплинути на збільшення природного естрогенного гормону.

На основі результатів наших попередніх досліджень (табл. 3.1) було встановлено, що середній кількісний вміст 17β -естрадіолу у молоці сирому збірному отриманого протягом доби на одній фермі не залежить від часу отримання молока і коливався від $439,8 \pm 41,8$ до $641,3 \pm 62,8$ пг/мл. Водночас вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання (табл. 3.2). Зокрема, найбільшу кількість 17β -естрадіолу виявляли у пробах молока відібраних на фермах у січні та лютому – $836,9 \pm 79,2$ пг/мл та найменшу у квітні-травні $404,4 \pm 40,6$ пг/мл. Під час дослідження збірного молока на переробному підприємстві від різних ферм не встановлено суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівнюючи із молоком отриманого на конкретній фермі в даному регіоні. Зокрема, у змішаному молоці на молокопереробному заводі кількість 17β -естрадіолу у жовтні, в середньому становила $459,6 \pm 42,3$ пг/мл, а у листопаді – $552,3 \pm 47,4$ пг/мл.

Отже, з отриманих даних випливає, що середнє значення 17β -естрадіолу у молоці-сировині збірному при дослідженні на переробному підприємстві становить в межах 400-600 пг/мл. Це та кількість 17β -естрадіолу, яка наявна у молоці сирому за умови виключення застосування коровам зовнішнього синтетичного гормону. Тобто середнє нормативне значення 17β -естрадіолу у молоці-сировині можна вважати на рівні 500 пг/мл.

Результати наших досліджень також встановили (табл. 3.5), що на концентрацію 17β -естрадіолу в молоці-сировині значний вплив має стадія лактації, тобто період тільності корів та доба естрального циклу (табл. 3.6). Зокрема, найменшу кількість 17β -естрадіолу виявляли на початку тільності (протягом перших трьох місяців) – від $42,7 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл, а найбільшу на завершення лактації перед запуском на сьомому – восьмому місяць – від $1105,3 \pm 78,5$ до $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл. Таким чином, на молочних фермах за наявності основного дійного стада корів на останніх місяцях тільності у збірному молоці-сировині будемо мати значно вищий вміст 17β -естрадіолу, порівнюючи з молоком корів молочних ферм

на різних стадіях тільності. Враховуючи таку закономірність даний факт необхідно враховувати при визначенні максимально граничної кількості естрогенного гормону – 17β -естрадіолу у молоці-сировині. Тому максимально можливу гранично допустиму концентрацію 17β -естрадіолу у молоці-сировині загального надою можна вважати на рівні 1000 пг/мл. Така концентрація можлива лише у випадку одночасного наявності на молочній фермі всього молочного стада корів на останніх місяцях лактації.

Також встановлено, що на збільшення 17β -естрадіолу у молоці-сировині впливає стадія естрального циклу (табл. 3.6). Найбільшу кількість естрогенного гормону виявляли у молоці сирому починаючи з 15 доби естрального циклу від 365,5 до 407,3 пг/мл, що практично в 7,1 раза ($p < 0,05$) більше, ніж у молоці на третю-четверту добу циклу. Виходячи з отриманих результатів даний чинник також необхідно враховувати при обґрунтуванні загальної нормативної кількості 17β -естрадіолу в молоці сирому збірному.

Інші чинники, такі як концентрація молочного жиру у молоці-сировині загального надою мала незначний вплив на вміст 17β -естрадіолу через те, що в середньому у стаді вміст жиру не суттєво відрізняється на відміну від молока питного у якому прослідковується чітка закономірність щодо збільшення гормону у молоці з більшою масовою часткою жиру, порівнюючи з обезжиреним молоком (табл. 3.7-3.10)

Таким чином під час визначення безпечної нормативної концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині під час його приймання на молокопереробному підприємстві необхідно враховувати всі вище наведені чинники.

Відповідно до рекомендацій Європейського Союзу (European Community, 2007) та Комісії Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission (2015)) [79, 96, 97] щодо максимального добового надходження в організм споживачів з усіма харчовими продуктами 17β -естрадіолу (50000 пг/кг живої маси в добу) нами проведено розрахунок кількості 17β -естрадіолу, яка буде надходити за щоденного споживання молока у кількості 250 мл для дітей і 200 мл для дорослої людини. При цьому допустили, що молоко містить максимально допустиму концентрацію 17β -

естрадіолу, яку продукують корови у третьому триместрі тільності (найбільше виявлено 1200 пг/мл). Розрахунок проводили за наступними формулами, які пропонують ФАО та ВООЗ [170].

$$ПДС = КС_м \times КГ_м / МТ_с \quad (3.1)$$

де,

$ПДС$ – приблизне добове споживання 17β -естрадіолу, пг/кг живої маси в добу;

$КС_м$ – кількість спожитого молока протягом доби, мл;

$КГ_м$ – кількість 17β -естрадіолу в молоці, пг/мл;

$МТ_с$ – маса тіла споживачів, кг (для розрахунків взято масу тіла дітей 25 кг, а дорослого 70 кг).

Провівши розрахунок згідно формулами 1 нами отримано наступні результати:

$$ПДС_{\text{для дітей}} = 250 \text{ мл} \times 1200 \text{ пг/мл} / 25 \text{ кг} = 12000 \text{ пг/кг живої маси в добу.}$$

$$ПДС_{\text{для дорослих}} = 200 \text{ мл} \times 1200 \text{ пг/мл} / 70 \text{ кг} = 3428,5 \text{ пг/кг живої маси в добу.}$$

Індекс коефіцієнта небезпеки ($ІКН$) був розрахований за наступною формулою (2):

$$ІКН = ПДС / МДД_{се} \quad (3.2)$$

де,

$ПДС$ – приблизне добове споживання 17β -естрадіолу, пг/кг живої маси в добу;

$МДД_{се}$ – максимальне допустиме добове споживання 17β -естрадіолу, (50000 пг/кг маси тіла).

Якщо значення індексу коефіцієнта небезпеки ($ІКН$) менше 1, то ризику від даної речовини через споживання немає.

$$ІКН_{\text{для дітей}} = 12000 \text{ пг/кг} / 50000 \text{ пг/кг} = 0,24$$

$$ІКН_{\text{для дорослих}} = 3428,5 \text{ пг/кг} / 50000 \text{ пг/кг} = 0,06$$

З отриманих розрахунків згідно формул 3.1 та 3.2 видно, що добове надходження 17β -естрадіолу в організм дітей з молоком навіть за максимального його вмісту в молоці-сировині може становити 12000 пг/кг живої маси, а для дорослих 3428,5 пг/кг. Дана кількість гормону в 4,1 та 14,5 разів менша ($p < 0,05$), ніж максимально дозволена Комісією Codex Alimentarius. Аналогічно індекс коефіцієнта небезпеки щодо вмісту такої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині становив 0,24 для дітей та 0,06 для дорослих, що вказує на відсутність помітного токсичного впливу на здоров'я людини у короткостроковій перспективі. Проте, оцінити довгостроковий ефект впливу даної кількості 17β -естрадіолу досить важко, оскільки онкологічні захворювання розвиваються упродовж тривалого періоду часу та мають багатофакторну етіологію, а естрогени, що надходять в організм мають кумулятивний ефект. Все це дає підставу до того, що проби молока-сировини повинні регулярно перевірятися на вміст 17β -естрадіолу. Крім того необхідно відзначити, що інші продукти харчування можуть містити 17β -естрадіол і доповнювати добове навантаження.

Тому на підставі літературних даних [128, 156, 157, 170, 190], результатів наших експериментальних досліджень (розділ 3.1-3.5) та проведених розрахунків нами було розроблено методологію визначення гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині на переробному підприємстві та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень даного гормону. Результати досліджень наведено в табл. 3.15.

Таблиця 3.15

Критерії визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині при поступленні на молокопереробне підприємство

Категорія харчових продуктів (сировини)	Хімічна речовина	План відбору зразків		Допустимі межі		Стадія, де застосовується показник	Дії у випадку незадовільних результатів
		п ¹	с ²	m ³	M ⁴		

Молоко-сировина	17 β -естрадіол	3	2	500 пг/см ³	1000 пг/см ³	На молокопере робному підприємстві	Рекомендації щодо використання молока-сировини
-----------------	-----------------------	---	---	---------------------------	----------------------------	---	---

Примітка.

¹n – кількість проб, що відбиралося від одного виробника.

²c – кількість проб, параметричні значення яких знаходяться між *m* і *M*.

³m – нормативне значення вмісту 17 β -естрадіолу в 1 см³ молока-сировини.

⁴M – гранично допустима кількість 17 β -естрадіолу в 1 см³ молока-сировини.

3.6.1 Інтерпретація отриманих моніторингових результатів досліджень молока-сировини за вмістом 17 β -естрадіолу на молокопереробному підприємстві

Визначення безпечного рівня 17 β -естрадіолу у молоці-сировині на молокопереробному підприємстві пропонується один раз в місяць, а інтерпретацію отриманих даних на основі результатів досліджень протягом трьох місяців.

Якщо за результатами трьох місячного дослідження трьох проб молока-сировини встановлено, що у всіх пробах кількість 17 β -естрадіолу менше *m*, то концентрація гормону вважається прийнятною і молоко пропонується використовувати на будь-які види молочної продукції. У такому молоці не має зовнішнього синтетичного 17 β -естрадіолу. У господарстві не застосовують синтетичні естрогенні препарати для підвищення продуктивності чи для лікування органів репродуктивної системи.

Якщо за результатами трьох місячного дослідження трьох проб молока-сировини встановлено, що одна або дві проби молока-сировини мають вміст 17 β -естрадіолу у межах між *m* і *M*, то така кількість гормону також вважається прийнятною і молоко пропонується використовувати на будь-які види молочної продукції.

Якщо за результатами трьох місячного дослідження трьох проб молока-сировини встановлено, що всі проби молока-сировини мають вміст 17β -естрадіолу більше m або M , то така кількість гормону викликає занепокоєння, молоко пропонується до переробки на молочні продукти, тільки за умови змішування з молоком від інших молочних ферм з нижчою концентрацією естрогенного гормону. Для того щоб вміст вкладався у гранично допустимі рівні. У подальшому вживаються заходи щодо з'ясування причин наявності високої кількості 17β -естрадіолу у даному господарстві з метою попередження і запобігання можливого використання синтетичних препаратів, які стимулюють збільшення естрогенів у молоці.

Розроблена нами методична модель оцінки молока-сировини за вмістом 17β -естрадіолу дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів кількість естрогенного гормону і у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників. Визначені й запропоновані нами максимально допустимі кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині не будуть негативно впливати в короткостроковій перспективі на ендокринну та інші системи споживачів.

Отже, обґрунтовано та розроблено методологію визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень: $n = 3$, $s=2$, $m = 500$, $M = 1000$. Це дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів кількість естрогенного гормону та у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

Результати даних досліджень опубліковані в наступній статті:

Кочетова, Г. С., Салата, В. З., Кухтин, М. Д., Горюк, Ю. В., & Рогальський, І. О. (2023). Оцінка молока-сировини за вмістом 17β -естрадіолу. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка*, (38), 216-222. [18].

Салата В.З., Кочетова Г.С., Кухтин М.Д. Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу: *методичні рекомендації*. Львів, ЛНУВМБ. 2023. 25 с. [47].

3.7. Удосконалення визначення 17β -естрадіолу у молоці сирому з різною пробопідготовкою

У зв'язку з тим, що стандартна методика визначення 17β -естрадіолу за допомогою імуноферментного методу, яка запропонована виробником тест-системи, передбачає два етапи розведення молока: на першому етапі проби розводять в 100% метанолі, на другому етапі - супернатант розводять буфером розчином що входить в склад тест-системи. Нами було здійснено оцінку даного гормону у молоці-сировині з різним вмістом жиру та за різної пробопідготовки. Оскільки необхідно було з'ясувати чи низькі концентрації гормону у пробі будуть давати вірогідні результати. Для цього порівнювали отримані результати з даними отриманими за допомогою імуноферментної тест-системи та хроматографічним методом. Результати досліджень різних методів наведено в табл. 3.16.

Таблиця 3.16

Порівняльна оцінка визначення 17β -естрадіолу в молоці імуноферментним методом з різною пробопідготовкою, пг/мл, (n=6)

№ проби молока	Вміст жиру, %	Визначення імуноферментним методом		Визначення хроматографі- чним методом
		Розведення молока згідно інструкції	Не розведене молоко (прямий метод)	
Молоко сире				
1	4,5	537,2	873,5	917,2
2	4,0	478,4	778,6	807,3
3	3,5	364,3	593,6	571,1
Молоко питне				

1	3,2	364,8	572,8	565,3
2	2,5	–	251,2	251,6
3	1,0	–	33,4	33,1
Контроль ний зразок	молоко 1,0% збагачене на рівні 1000 пг/мг	624,8	978,3	1014,5
	молоко 1,0% збагачене на рівні 500 пг/мг	317,3	500,3	508,9

З даних табл. 3.16 спостерігаємо, що під час визначення кількості 17β -естрадіолу у молоці сирому та питному згідно інструкції підготовки проб що рекомендується виробником тест-системи, отримували невірогідні результати, оскільки чутливість методу становила 62%. Водночас здійснення визначення 17β -естрадіолу у даних пробах молока, але в не розведеному молоці (прямий метод) отримували кількісні значення вмісту гормону, які статистично не відрізнялися від величин, які були отримані арбітражним – хроматографічним методом, а чутливість методу становила 97%. При цьому похибка вмісту 17β -естрадіолу між значеннями отриманими імуноферментним методом та хроматографічним становила не більше 5 %, що вважається цілком достатнім для використання у практиці. Також встановлено тенденцію, яка описана у попередніх розділах, що молоко із вищою масовою часткою жиру містить більшу кількість 17β -естрадіолу.

Отже, визначення 17β -естрадіолу у молоці за допомогою тест-системи RIDASCREEN® 17β - ö stradiol доцільно проводити без попереднього розведення. Отримані результати цілком вірогідні із даними арбітражного (хроматографічного) методу. Ймовірно виробник тест-системи запропонував проводити розведення молока перед дослідження через можливу його велику концентрацію у молоці.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вважається, що основним джерелом надходження естрогенів стероїдного походження в організм споживачів є молоко і молочні продукти, з ними споживається від 60 до 80 % даних гормонів [157, 190]. Наявність надмірної кількості естрогенів, зокрема 17β -естрадіолу в сироватці крові пов'язують з виникненням раку жіночих і чоловічих статевих органів [112, 124, 206, 216]. Тому значення молока і молочних продуктів у розвитку даних патологій на сьогоднішній день вважається двояким. Одні автори підтверджують зв'язок між споживанням молочних продуктів та виникненню онкології [109, 111, 151], а інші вказують на неоднозначність даного питання і кореляційний зв'язок не вірогідний [91, 105, 121]. Тому наше дослідження було направлене на визначення кількості 17β -естрадіолу в молоці отриманому на різних фермах України та при переробці його на молочному заводі. Адже досліджень з визначення даного гормону в Україні не проводилося, а наявні закордонні данні вказують, що кількість 17β -естрадіолу в молоці величина дуже варіабельна і залежить від ряду чинників.

При визначенні 17β -естрадіолу на трьох фермах нами встановлено, що кількість гормону коливався від $439,8 \pm 41,8$ до $585,5 \pm 61,2$ пг/мл у ранковому молоці, від $497,6 \pm 46,5$ до $605,7 \pm 71,0$ пг/мл в молоці обіднього доїння та від $543,3 \pm 53,2$ до $641,3 \pm 62,8$ пг/мл в молоці вечірнього доїння. При цьому встановлено значні коливання вмісту 17β -естрадіолу у молоці сирому отриманому протягом доїння, як в один, так і в різні періоди доби. Зокрема різниця між мінімальною і максимальною кількістю гормону становила від 3,0 до 4,5 рази ($p < 0,01$). Таким чином отримані нами дані узгоджуються з результатами досліджень іранських вчених про коливання вмісту 17β -естрадіолу від 75,5 до 922,3 пг/мл молока [170]. Проте відрізняються від даних інших дослідників, які виявляли у молоці коров'ячому незбираному значно менші кількості 17β -естрадіолу – від 5 до 51 пг/мл [133, 156, 157, 190]. Також нами виявлено, що найбільшу кількість 17β -естрадіолу у пробах молока відібраних на фермах у січні та лютому – $836,9 \pm 79,2$

пг/мл. Кількість 17β -естрадіолу в даний період була в 2,0 раза більша ($p<0,05$), порівнюючи з вмістом у молоці відібраного в квітні травні та в 1,6 – 1,5 раза ($p<0,05$) більша, ніж у липні-серпні та вересні-жовтні, відповідно. Сезонне збільшення кількості 17β -естрадіолу в молоці сирому ми пояснюємо наявністю на фермі в даний період значної кількості корів, які перебувають на другому та третьому триместрі тільності, які за даними вчених [159, 169] у цей період тільності виробляють молоко з кількістю 17β -естрадіолу у 26-33 раза більшу, ніж не тільні корови [100, 169, 175].

При дослідженні молока сирого на молокопереробному підприємстві виявлено, що змішування молока від різних ферм не призводило до суттєвої відмінності щодо вмісту 17β -естрадіолу, порівнюючи із молоком отриманого на конкретній фермі в даному регіоні. У середньому кількість 17β -естрадіолу у жовтні місяці становила від $423,4 \pm 40,3$ до $518,7 \pm 52,5$ пг/мл, тобто коливання в межах 100 пг/мл. У листопаді вміст 17β -естрадіолу збільшився до середніх значень $578,7 \pm 52,8$ пг/мл. Це дає підставу вважати, що вміст 17β -естрадіолу в молоці незбираному від одного стада зазнає значних змін під час отримання протягом року.

Під час дослідження вмісту 17β -естрадіолу залежно від масової частки жиру в молоці сирому встановлено, що вірогідної різниці між вмістом гормону в молоці з масовою часткою жиру від 2,8 до 3,5 % не відмічається. Зміни виявляли у молоці з вмістом жиру від 3,6 до 4,0 %, зокрема кількість 17β -естрадіолу була в середньому на 20 % більша, ніж у молоці з масовою часткою жиру 2,8-3,0 %. У молоці з вмістом жиру 4,1-4,5 % кількість 17β -естрадіолу була на 27,8 % ($P<0,05$) більша, порівнюючи з молоком з жирністю до 3,0 %. Зокрема, $704,8 \pm 58,6$ пг/мл у молоці з жирністю 4,1-4,5 %, проти $551,4 \pm 51,7$ пг/мл в молоці з часткою жиру 2,8-3,0 %. Отримані результати підтверджують дані дослідників [190], про ліпофільність 17β -естрадіолу, як наслідок молоко з більшою масовою часткою жиру містило вищий вміст даного гормону. Повідомляється [178], що у молоці пастеризованому з масовою часткою жиру 1,0 та 2,0 % кількість 17β -естрадіолу була в 1,8 та 1,3 раза ($P<0,05$) менша, ніж у молоці коров'ячому незбираному.

Про ліпофільну природу і перерозподіл 17β -естрадіолу за технології сепарування вказують наші результати. Так встановлено, що процес сепарування молока впливає на розподіл 17β -естрадіолу між вершками та знежиреним молоком. Зокрема, кількість 17β -естрадіолу у вершках була у 2,8-3,3 раза ($P<0,01$) більша, ніж у молоці незбираному і становила . Водночас у знежиреному молоці виявлено у 1,7-2,1 раза меншу кількість 17β -естрадіолу, ніж у молоці незбираному. У дослідженнях [178] у вершках вміст гормону був в 3,2 раза ($P<0,01$) більший, порівнюючи з незбираним молоком та в 15 разів, ніж у знежиреному молоці. Тому ми вважаємо, що харчові продукти, які збагачені молочним жиром є також значним джерелом 17β -естрадіолу для організму споживачів.

Отже, підсумовуючи дослідження можна відзначити наступне. В основному виявлені значні коливання вмісту 17β -естрадіолу у молоці корів можуть бути пов'язані з наявністю у стаді корів на різному періоді тільності, продукування молока з різною масовою часткою жиру, або впливу раціону, так як у літку фітоестрогени зелених кормів можуть збільшувати кількість стероїдних гормонів в крові [61]. Усі ці чинники необхідно досліджувати на конкретно взятому досліді. Також, ймовірно, що значні розбіжності щодо вмісту 17β -естрадіолу у молоці можуть бути пов'язані з використанням різних методів його визначення (імуноферментні, радіоімунні, хроматографічні). Крім того, враховуючи те, що 17β -естрадіол відноситься до ліпофільного гормону, розчинність якого краща у жирах то доцільно при порівнянні вмісту його у молочних продуктах обов'язково вказувати масову частку молочного жиру. Це дозволить більш об'єктивно оцінити рівень 17β -естрадіолу у молоці та провести обрахунок можливого добового споживання. До того ж є очевидним, що раціон з низьким вмістом молочного жиру буде набагато меншим джерелом 17β -естрадіолу для споживачів.

Водночас нині молочним продуктам відводиться значне місце в забезпеченні споживачів необхідними поживними речовинами. Однак, багато останніх публікацій ставлять під сумнів їх безпечність через наявність у них різного роду забруднювачів [17, 24, 25, 131] та високого рівня природних і штучних гормонів естрогеної групи [201, 210]. Тому важливою частиною наших досліджень було

встановити вміст 17β -естрадіолу в молоці сирому протягом лактаційного періоду та протягом естрального циклу. Адже з високим вмістом 17β -естрадіолу в молоці та молочних продуктах пов'язують ризик виникнення різного роду онкологічних захворювань у споживачів та порушення розвитку статеві і центральної нервової системи у дітей препубертатного віку [112, 124, 206, 216, 225]. Нами встановлено, що протягом лактації вміст 17β -естрадіолу у молоці, істотно залежить від місяця тільності корів. Найменша кількість 17β -естрадіолу виявлялася на початку тільності (протягом перших трьох місяців) в межах від $42,4 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл. Водночас, найбільшу кількість даного стероїдного гормону виявляли на завершення лактації перед запуском $1105,3 \pm 78,5$ та $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл – початок сьомого та восьмого місяця. Отримані нами дані узгоджуються з дослідженнями [207], які повідомляють, що кількість 17β -естрадіолу у молоці сирому залежить від терміну вагітності корів. Зокрема, дослідники [157, 175] виявляли в 27 раз більший вміст даного гормону на третьому триместрі тільності, порівняно з першим триместром. У іншому дослідженні японські вчені повідомляють [100], що кількість 17β -естрадіолу була, в середньому в 33 рази більша на останніх місяцях тільності, ніж на перших. Незважаючи на те, що на переробку надходить молоко з ферм збірне від корів на різних термінах тільності і найвища концентрація гормону у збірній пробі малоймовірна. Проте за нашими даними більшість запусків у корів припадає на зимові місяці, тому у цей період можлива значно більша кількість 17β -естрадіолу у молоці загального надою від ферми, що ймовірно необхідно враховувати при виробництві молочних продуктів, особливо високо жирних, так як естрогені гормони вважаються ліпофільними, тобто концентруються у жировій фазі [178].

При дослідженні вмісту 17β -естрадіолу у сирому молоці протягом естрального циклу у корів встановлено, що найменша кількість гормону була протягом перших сім діб дослідження від 57,1 до 65,6 пг/мл. Починаючи з 10 доби естрального циклу кількість 17β -естрадіолу в молоці вірогідно збільшувалася, порівнюючи з вмістом в перші сім діб. З 15 по 19 добу естрального циклу кількість 17β -естрадіолу знаходилася в межах від 365,5 до 391,3 пг/мл. Однак, найбільшу кількість 17β -

естрадіолу реєстрували у молоці у двох групах корів на 19 добу естрального циклу $407,3 \pm 39,5$ пг/мл, що практично в 7,1 рази ($p < 0,05$) більше, ніж у молоці на третю-четверту добу. Отримані нами дані узгоджуються з результатами [169], які вказують, що протягом естрального циклу кількість 17β -естрадіолу поступово зростає. За їхніми даними середня кількість 17β -естрадіолу зростає з 200 пг/мл до 360 пг/мл. Ми також вважаємо, що молоко на закінчення естрального циклу є також більшим джерелом естрогенних гормонів, які з молочними продуктами будуть надходити в організм споживачів.

Отже, як узагальнення цієї частини наших досліджень можна відзначити, що під час лактаційного періоду у корів відбувається значна зміна рівня естрогенного гормону – 17β -естрадіолу у молоці. Зокрема, в кінці лактаційного періоду (третій триместр тільності) їх кількість суттєво зростає та також збільшується під час естрального циклу. Встановлена дана динаміка накопичення 17β -естрадіолу у молоці дає можливість виявляти і прогнозувати виробництво молочних продуктів з мінімальним вмістом естрогенів природного походження. Крім того, враховуючи те, що естрогені гормони синтетичного походження можуть надходити з іншими продуктами тваринного походження за умови їх застосування для стимулювання приростів, молочні продукти у виявлені фізіологічні терміни можуть бути додатковим значним джерелом надходження 17β -естрадіолу в організм споживачів.

Багато наукових даних вказують, що майже всі харчові продукти тваринного походження містять 17β -естрадіол та його метаболіти, хоча рівень гормону залежить від виду продукту, статі тварин, віку та фізіологічного стану [105, 169, 175, 187]. Дослідження повідомляють, що близько 60-80 % естрогенів надходять в організм з молоком та молочними продуктами за традиційної європейської дієти [189]. Тому, 17β -естрадіол є невідворотними гормонами в харчуванні людини. Однак, багато досліджень повідомляють про зв'язок між вмістом даного гормону у продуктах харчування і виникненням онкологічних хвороб [125, 216, 232]. Тому одним із важливих завдань роботи було визначити кількість 17β -естрадіолу у молоці питному і молочних продуктах залежно від вмісту масової частки жиру в

них. При цьому нами було побудовано дослідження так, що охопити зразки різних видів молочних продуктів, як за вмістом жиру, так і технології виробництва.

Результати досліджень встановили закономірність зростання вмісту 17β -естрадіолу у молоці питному із збільшенням у ньому масової частки жиру. Зокрема у пробах молока питного з вмістом жиру 3,2 та 3,8 % виявили кількість 17β -естрадіолу $395,9 \pm 34,1$ та $547,8 \pm 49,8$ пг/мл, що практично в 10 разів більший вміст порівнюючи з молоком жирністю 1,0 % та в 1,8 та 2,5 раза відповідно, ніж у молоці з 2,5 % жиру. Отримані дані досліджень підтверджують результати інших вчених [190], які виявляли статистично вищий вміст 17β -естрадіолу у молоці з високим вмістом жиру, ніж у молоці з низьким вмістом жиру. Таким чином ми погоджуємося з дослідниками [156, 190], які вказують на ліпофільність 17β -естрадіолу тому можна очікувати вищий вміст естрогенного гормону в молочних продуктах з більшою кількістю жиру.

При дослідженні вмісту 17β -естрадіолу у кисломолочних продуктах (йогурт, кефір), які виготовлені з використанням заквасочних мікроорганізмів, встановлено, що кількісний вміст 17β -естрадіолу також залежала від масової частки жиру в них. Зокрема в йогурті та кефірі з жирністю 1,0 % кількість 17β -естрадіолу становила від $25,5 \pm 3,0$ до $36,1 \pm 3,6$ пг/мл, що в середньому 4,7 раза менший вміст, ніж у продуктах з масовою часткою жиру 2,0 та 2,5 %. Крім того встановлено, що молочнокисле бродіння під час технології виробництва кисломолочних продуктів не впливало на величину 17β -естрадіолу в готовому продукті. У дослідження [124] вказується, що в йогуртах виявляли кількість 17β -естрадіолу в межах 20 – 25 пг/мл, проте дослідники не вказують, якої жирності були йогурти.

Зважаючи на ліпофільну природу 17β -естрадіолу актуальним було визначити вміст гормону у високожирних продуктах, таких як сметана та масло. Виявлено, що найвищий вміст 17β -естрадіолу було виявлено у сметані з масовою часткою молочного жиру 30 %, так в середньому кількість гормону становила $1558,5 \pm 123,4$ пг/мл. Дана кількість 17β -естрадіолу переважала в 1,3 раза ($p < 0,05$) вміст у сметані з масовою часткою жиру 15 %, що є безпосереднім свідченням ліпофільності естрогенного гормону 17β -естрадіолу. Тому проведені дослідження встановили

вірогідні зміни вмісту 17β -естрадіолу у пробах сметани та масла, залежно від кількісного вмісту масової частки жиру у них. Виявлено, що вміст 17β -естрадіолу в сметані та маслі був в декілька разів (5-10) більший, ніж у молоці питному та кисломолочних продуктах, не залежно від їх жирності. Так, у маслі вершковому селянському виявляли середній вміст 17β -естрадіолу – $3594,8 \pm 247,1$, що в 1,3 раза менша кількість, порівнюючи з пробами масла екстра. Тобто збільшення вмісту молочного жиру у маслі екстра на 20 і 10 %, порівнюючи з маслом бутербродним і селянським спричиняє зростання кількості 17β -естрадіолу 2,2 та 1,3 раза відповідно.

Дослідники [190] також повідомляють, що масло вершкове мало більший вміст естрогенного гормону, ніж інші види продуктів. Тому ми вважаємо, що споживання високожирних продуктів є більш суттєвим джерелом 17β -естрадіолу, порівнюючи з молоком і кисломолочними продуктами.

Загалом з отриманих даних щодо моніторингу вмісту стероїдного гормону 17β -естрадіолу в молочних продуктах можна підсумувати наступне. Кількісний вміст 17β -естрадіолу у молочних продуктах перш за все залежить від його вмісту в молоці сировині, яка використовується для виробництва та масової частки жиру в готовому молочному продукті. Прослідковується чітко виражена тенденція, що чим більш високожирніший молочний продукт, тим більша кількість у ньому естрогенного гормону – 17β -естрадіолу. Очевидно, для зменшення надходження в організм споживачів 17β -естрадіолу необхідно дотримуватися вживання низькокалорійних за вмістом молочного жиру продуктів.

Зацікавленість з нашого боку становили дослідження з визначення токсико-біологічної оцінки молока-сировини з різним вмістом 17β -естрадіолу на культурі вільчастої інфузорії *Tetrachylena pyriformis*. Дані організми дуже часто використовуються, як лабораторна модель, яка швидко розмножується і дуже чутлива до різних токсигенних речовин, як природного у значних кількостях, так антропогенного походження. Адже дані літератури засвідчують [156], що протягом останніх десятиліть споживання молока та молочних продуктів у розвинених країнах значно збільшилося. Однак, не зважаючи на користь і біологічну цінність

молочних продуктів [31, 145], вони також можуть бути джерелом небезпечних речовин природного і штучного походження [146]. До таких речовин можна віднести естрогенний гормон 17β -естрадіол, надмірна кількість якого спричиняє онкологічні хвороби [216, 232, 112, 193]. Наші дослідження виявили, що за наявності в молоці-сировині 17β -естрадіолу в кількості від 20,0 до 2500,0 пг/мл змін рухової активності, форми тіла та пригніченості розмноження не спостерігається, як протягом 24-ох, так 96 год культивування. За вмісту 17β -естрадіолу у молоці в межах 5000,0-5500,0 пг/мл спостерігали сповільнення рухової активності інфузорій без зміни характеру руху. Проте, появлялися інфузорії з подовженими і коротшими клітинами, порівняно з інфузоріями у контрольному середовищі. Таке середовище було оцінене, як помірно-токсичне щодо культури *Tetrachymena pyriformis*, оскільки відмічається незначний хронічний токсичний вплив на інфузорій. Відповідно до досліджень [150], середня кількість 17β -естрадіолу в молоці сирому збірному отриманому на молочній фермі протягом року становила в межах 523 ± 86 пг/мл. Тобто отримані дані вказують, що молоко практично з 10 раз більшим вмістом 17β -естрадіолу не спричиняє токсичного впливу на життєдіяльність інфузорій. Дослідники [175] припускають, що не очікується шкідливого впливу на здоров'я, якщо щоденне споживання естрогену – 17β -естрадіолу становить приблизно 540 000 пг/день. Тому молоко з вмістом природного гормону не може становити небезпеки для споживачів, проте необхідно враховувати, що 17β -естрадіол може надходити в організм із іншими продуктами, особливо за неофіційного застосування його тваринам з метою стимулювання приростів [29, 128, 148, 201]. З іншого боку дослідити помітний довгостроковий токсичний вплив даного гормону, який знаходиться з харчовими продуктами на здоров'я споживачів є досить складно, водночас нині дослідники вважають, що онкологічні хвороби мають багатофакторну етіологію [56, 211]. Тому ми пропонуємо в Україні регулярно перевіряти молоко корів від молочних стад на кількість 17β -естрадіолу для виявлення можливої високої кількості та прийняття необхідних превентивних заходів у таких випадках

При визначенні відносної біологічної цінності молока з різним вмістом 17β -естрадіолу на культурах тетрахімен, встановлено, що тільки за вмісту естрогенного гормону більше 5000,0 пг/мл і культивування інфузорій 96 годи відмічається зниження його біологічної цінності приблизно на 10 %, порівнюючи з контрольним середовищем. Зокрема, відносна біологічна цінність молока-сировини з вмістом 17β -естрадіолу до 2500,0 пг/мл становила від 98,6 до 97,7 %, а у пробах молока-сировини з максимальною кількістю гормону (5000,0-5500,0 пг/мл) зменшилася в середньому на 10 % до 89,22 % ($p < 0,05$). Це може вказувати, що високі кількості 17β -естрадіолу, які за нормальної фізіології тварин не відмічаються у молоці, за штучного введення коровам можуть чинити хронічний вплив на організм споживачів.

Адже чисельні дані повідомляють [62, 135, 184, 202, 233] на канцерогенну дію естрогенів, а саме 17β -естрадіолу, оскільки постійне і регулярне споживання їжі багатой на даний гормон здатне викликати рак молочної залози, яєчників, сім'яників та простати [99, 177], а також впливати на аномальні вторинні статеві ознаки та передчасне статеве дозрівання [92, 138, 163]. Насамперед науковці [50, 88, 156] наголошують на безпечності молочної сировини, оскільки молоко і молочні продукти є основними продуктами дитячої дієти.

Таким чином, отримані результати дають підставу вважати, що кількість 17β -естрадіолу у молоці сирому навіть за найбільшого природного вмісту (до 1000 пг/мл у третьому триместрі тільності) не може спричиняти токсичного впливу та знижувати його відносну біологічну цінність відносно клітин *Tetrachymena pyriformis*.

Оскільки, молоко й молочні продукти відіграють важливу роль у здоровому повноцінному харчуванні упродовж усього життя [61, 227, 228]. Водночас, останні наукові дослідження поставили під сумнів безпечність молока через можливу наявність високих кількостей стероїдних гормонів, таких як 17β -естрадіол, з яким пов'язують розвиток деяких онкологічних захворювань [112, 182, 206, 216, 232, 223]. Тому враховуючи даний факт, пошук технологічних способів максимального

зниження кількості 17β -естрадіолу під час переробки молока вважається особливо актуальним.

У нашому дослідженні виявлено, що термічна обробка за низької температури пастеризації ($77,0 \pm 1$ °C протягом 1 хв) вірогідно не змінювала кількість гормону в обробленому молоці. За впливу високо температурного режиму пастеризації молока ($85,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв) та кип'ятіння протягом 5 хв зниження 17β -естрадіолу в обробленому молоці становило максимум 5 %. Зокрема, за умови мінімальної кількості гормону в молоці-сирому $17,3 \pm 1,5$ пг/мл, його вміст у пастеризованому молоці зменшився до $16,0 \pm 1,2$ пг/мл, тобто тільки на 1,3 пг/мл. У другому варіанті досліді з початковим вмістом гормону $57,6 \pm 3,9$ пг/мл, зменшення його у пастеризованому молоці також було не суттєвим, всього на 2,8 пг/мл. У третьому варіанті досліді з найбільшим початковим вмістом 17β -естрадіолу в молоці-сировині, після пастеризації його кількість була менша на 17,8 пг/мл і становила $391,7 \pm 31,4$ пг/мл. Це пов'язано з тим, що 17β -естрадіол відноситься до термостабільного гормону [170, 182, 232], отже, він не зазнає істотного руйнування за різних температурних режимів, які використовуються у молочній галузі для пастеризації і стерилізації молока-сировини. Тому можна стверджувати, що у молочних продуктах, які піддавалися пастеризації чи стерилізації концентрація 17β -естрадіолу суттєво не буде відрізнятися від початкової кількості у молоці-сировині. Наявність високих і низьких кількостей естрогенів, в тому числі 17β -естрадіолу, в пастеризованому молоці питному описують інші дослідники [151, 156, 157, 170, 190], проте вони не вказують про вміст гормонів у сирому необробленому молоці. На думку дослідників [150, 157, 201] кількість 17β -естрадіолу та інших естрогенних гормонів у молоці питному й молочних продуктах, в основному залежить від масової частки жиру та фізіологічного стану тварин [100, 194, 207], ніж від впливу температурної обробки. У дослідженнях [204] при вивченні впливу варіння м'яса яловичини (1 год) на кількість синтетичного гормону зеранолу також не встановлено значного його зниження, оскільки кількість його зменшилася у обробленому м'ясі тільки на $6,1 \pm 0,2$ %. Подібні результати були отримані [71, 72, 220], які визначали динаміку зміни

стероїдних естрогенів під час термічної обробки м'яса. Таким чином такі види теплової обробки, як варіння, низько і високотемпературна пастеризація не мають значної руйнівної дії на кількість естрогену 17β -естрадіолу та зеранолу.

Нами також було визначено розподіл 17β -естрадіолу за технології виробництва масла вершкового, оскільки раніше було встановлено [111], що концентрації естрогенів корелюють з вмістом молочного жиру. Отримані результати виявили істотне зростання 17β -естрадіолу у маслі ($3896,1 \pm 67,5$ пг/г), порівнюючи з вмістом у молоці сирому ($189,4 \pm 12,5$ пг/мл) та незначна їх кількість у масляниці ($29,3 \pm 1,8$ пг/мл). Тому вважаємо, що для зменшення стероїдних естрогенів у раціоні, необхідно зменшити вміст молочного жиру в ньому, а високожирні види масла вершкового є вагомим джерелом добового надходження в організм споживачів 17β -естрадіолу. На нашу думку технологія виробництва масла не може бути використана для зменшення частки 17β -естрадіолу у випадку його високого вмісту у молоці-сировині чи вершках. Для цього необхідно пошук інших можливих технологій переробки чи режимів зберігання для зменшення вмісту 17β -естрадіолу у молоці-сировині, особливо отриманого в третій триметстер тільності корів.

З досліджень Кухтин та групи [46, 148] відомо, що застосування режимів холодильного зберігання м'яса яловичини дозволило зменшити кількість такого естрогенного синтетичного гормону, як зеранол, приблизно на 30 % протягом 3 міс зберігання. Зокрема вони встановили однакову динаміку зниження зеранолу у пробах яловичини, які містили його як велику, так і малу кількість. Найінтенсивніше процес руйнування зеранолу відбувався протягом першого місяця зберігання. За цей період часу кількість зеранолу знизилася, в середньому на 20 % у всіх пробах, незалежно від початкового вмісту. Упродовж двох місячного терміну зберігання замороженої яловичини вміст зеранолу знизився на $28,2 \pm 0,17$ %, порівняно з початковою кількістю у свіжому м'ясі. Наступне зберігання яловичини упродовж трьох місяців не спричиняло суттєвого зниження вмісту зеранолу і на кінець шостого місяця їх кількість зменшилася на $33,2 \pm 0,58$ %. Водночас при використанні температури заморожування м'яса -25

та $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, динаміка зниження гормонів була аналогічна, як за температури мінус $18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

У нашому дослідженні виявлено, що доволі ефективним і безпечним процесом, який дозволяє знизити на 25 % вміст 17β -естрадіолу є зберігання масла за температури $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 9 місяців, як це вимагає стандарт [12]. Адже згідно наших даних за зберігання масла при $t = -9\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом трьох місяців, кількість гормону зменшилася, в середньому на 12,2 %, що практично в 3,4 рази ($p < 0,05$) інтенсивніша динаміка, ніж за температури $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Наступне зберігання масла протягом трьох місяців (6 міс від початку) також зумовило зменшення вмісту 17β -естрадіолу, в середньому в 1,5 рази ($p < 0,05$) до 18,0 %. При цьому кількість гормону у маслі в даний період була у 3,8 рази ($p < 0,05$) меншою, ніж за зберігання при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Проте, подальше зберігання до 9 місяців значною мірою не вплинуло на зменшення кількості 17β -естрадіолу в маслі, так як його вміст зменшився на 20,5 % від початкової кількості у свіжому продукті. За режиму зберігання $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ процес зменшення естрогенного гормону проходив найінтенсивніше. Так, протягом трьох місяців зберігання вміст 17β -естрадіолу зменшився, в середньому на 14,1 %, що в 3,9 рази ($p < 0,05$) інтенсивніша динаміка, ніж при зберіганні за $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тільки в 1,2 рази менша, ніж за $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$. На дев'ятий місяць зберігання кількість 17β -естрадіолу була менша, в середньому на 24,7 %, проти 20,5 % за $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ зберігання.

Отже, даний режим зберігання можна використати для зниження естрогенних гормонів у маслі, яке виготовлене з молока на пізніх стадіях лактації з високою концентрацією 17β -естрадіолу [100, 207].

Також досліджено зміни кількості 17β -естрадіолу в молоці сирому під час спонтанного скисання та за технології виробництва йогурту, так як в літературі недостатньо інформації про вплив молочнокислого бродіння на вміст естрогенів. Наводяться дані [157, 201], що кількість естрогенних гормонів у кислому молоці не відрізняється від кількості в молоці питному. Нами у досліді взято проби молока з різною кількістю гормону, оскільки високі кількості повинні забезпечувати помітні зміни, якщо вони будуть відбуватися. Встановлено, що кількість 17β -естрадіолу в кислому молоці через 48 год спонтанної ферментації вірогідно не відрізнялася від

початкового вмісту ($409,5 \pm 13,7$ пг/мл проти $402,4 \pm 10,9$ пг/мл). При цьому через 12 год скисання титрована кислотність становила 48 ± 4 °Т, через 24 год – 78 ± 5 °Т, а через 48 – 124 ± 7 °Т. Тобто кислотність молока наростала, а зміна вмісту гормону не було.

За технології виробництва йогурту під впливом заквасочних бактерій кількість гормону через 6 год ферментації становила $170,2 \pm 7,3$ пг/мл проти $178,4 \pm 8,1$ пг/мл у молоці пастеризованому. Це вказує на те, що стероїдний гормон 17β -естрадіол не руйнується під дією молочної кислоти, яка накопичується в результаті молочнокислого бродіння, як за участі змішаної мікрофлори молока сирого, так за участі чистих молочнокислих бактерій закваски для йогурту. Водночас, ми підтримуємо думку і твердженнями деяких дослідницьких груп з оцінки стану здоров'я та харчування дорослих і дітей, що споживанням цільного коров'ячого молока, але не кисломолочних продуктів сприяє більш ранньому статевому дозріванню у дітей (молодших 10 років) [173, 188, 221], а також підвищує сприйнятливість до канцерогенезу молочної залози на 30 % в дорослому віці [119, 159]. Таким чином, ми пропонуємо споживати більше кисломолочних продуктів з невисоким вмістом молочного жиру, в яких кількість естрогенів вважається невисокою.

Також, виявлено що під час одночасного процесу пастеризації та гомогенізації молока кількість 17β -естрадіолу зменшилася, в середньому на 2,7 пг/мл у пробах з незначним вмістом та на 7,7 пг/мл з високим вмістом гормону. Тобто механічна обробка (гомогенізація) не впливає на кількість даного гормону. Тому ми погоджуємося з дослідниками [71, 72, 190, 220], що естрогенни, в тому числі й 17β -естрадіолу, як стероїдний гормон досить стійкий до дії різних технологічних операцій за виробництва молочних продуктів.

Отже, підсумовуючи дослідження щодо впливу різних технологічних режимів на динаміку зменшення 17β -естрадіолу у молоці й молочних продуктах можна відзначити наступне. Такі технологічні операції з обробки молока сировини, як низько та високо температурна пастеризація та стерилізація, практично не впливають на зміну 17β -естрадіолу у готовому продукті. Також встановлено, що

найбільша кількість естрогенного гормону реєструється у маслі вершковому з найбільшою масовою часткою молочного жиру, при цьому зберігання масла у замороженому стані за температури мінус 9 °С, мінус 18 °С протягом 6-9 міс дозволяє зменшити кількість 17β -естрадіолу, приблизно на 20-25 % від його початкової кількості. Тому можна пропонувати виробництву застосування режиму зберігання масла у замороженому стані для зменшення його вмісту, особливо у партіях, які отримані від корів в кінці лактаційного періоду.

Враховуючи низку нормативно-правових документів українського законодавства [10, 11, 15, 33, 38, 39, 40, 43], які визначають правове «поле», щодо контролю та забезпечення безпечності молока-сировини й молочних продуктів, нажалі оцінка даних категорій продуктів за вмістом 17β -естрадіолу не проводиться. Хоч низка вище наведених правових документів повідомляють, що сировина, напівфабрикати й готові вироби не повинні містити різні забруднювачі антропогенного і природного походження, в тому числі й залишки естрогенних гормональних препаратів. До того ж у стандарті від 2018 року [11] на молоко-сировину, яким керуються, як виробники молока, так і переробники відсутня вимога оцінки його на залишки гормональних препаратів, в тому числі найактивнішого 17β -естрадіолу. Хоча, як показує практика і наводяться дані літератури [148, 157], зустрічаються недобросовісні виробники сировини, які користуються прогалинами в нормативно-правовій базі та застосовують синтетичні препарати для збільшення приросту і ефективності виробництва. При цьому на сьогоднішній день розроблені швидкі імуноферментні методи, які дозволяють в короткий час виявити молоко із високими концентраціями даного гормону.

Отже, враховуючи ситуацію, яка склалася, нами проведено системні дослідження щодо кількості 17β -естрадіолу в молоці й молочних продуктах та інтерпретація отриманих даних із результатами закордонних вчених. Ми пропонуємо проводити контроль молока-сировини за даним естрогенним гормоном (17β -естрадіол). При цьому нами пропонується використовувати методологію, яка застосовується у харчовому законодавстві ЄС (Директива 2073/2005) [44], із визначеними нами критеріями щодо кількості 17β -естрадіолу в

молоці-сировині та інтерпретації отриманих результатів за певний період контролювання. Запропонована методична модель оцінки молока-сировини за вмістом 17β -естрадіолу дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів кількість естрогенного гормону і у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

Загалом підсумовуючи результати досліджень отримані за темою виконаної дисертаційної роботи вважаємо, що сформована нами мета та заплановані завдання щодо дослідження вмісту 17β -естрадіолу в молоці корів за різного фізіологічного стану та розроблення методології визначення і критеріїв оцінки гранично допустимої кількості даного гормону в молоці-сировині при прийманні на переробку, як показника його безпечності, виконана у повному обсязі.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та експериментально визначено необхідність дослідження молока-сировини при надходженні на переробку на кількісний вміст 17β -естрадіолу. Розроблено методологію визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині на переробному підприємстві та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень даного гормону. Удосконалено методику визначення 17β -естрадіолу у молоці-сировині за допомогою імуноферментного методу дослідження.

1. Встановлено, що середня кількість 17β -естрадіолу у молоці-сировині отриманого протягом доби на одній фермі не залежить від часу отримання молока і коливався від $439,8 \pm 41,8$ до $641,3 \pm 62,8$ пг/см³. Водночас вміст 17β -естрадіолу в молоці від одного стада зазнає суттєвих змін протягом року його отримання. Зокрема, найбільшу кількість 17β -естрадіолу виявляли у пробах молока відібраних на фермах у січні та лютому – $836,9 \pm 79,2$ пг/см³ та найменшу у квітні-травні $404,4 \pm 40,6$ пг/см³.

2. Середнє значення 17β -естрадіолу у молоці-сировині збірному при дослідженні на переробному підприємстві становило у жовтні $459,6 \pm 42,3$ пг/см³, а у листопаді – $552,3 \pm 47,4$ пг/см³. Це та кількість 17β -естрадіолу, яка наявна у молоці сирому за умови виключення застосування коровам зовнішнього синтетичного гормону.

3. Протягом лактації вміст 17β -естрадіолу у молоці, істотно залежить від місяця тільності корів. Найменшу кількість 17β -естрадіолу виявляли на початку тільності (протягом перших трьох місяців) від $42,4 \pm 7,7$ до $68,3 \pm 7,8$ пг/мл, а найбільшу на завершення лактації перед запуском – $1105,3 \pm 78,5$ та $1209,8 \pm 82,4$ пг/мл.

4. Вміст 17β -естрадіолу у молоці корів протягом естрального циклу вірогідно збільшується, порівнюючи з першими днями циклу. Найбільшу його кількість виявляли починаючи з 15 доби циклу від $365,5$ до $407,3$ пг/мл, що практично в 7,1 раза ($p < 0,05$) більше, ніж у молоці на третю-четверту добу. Отже, молоко отримане

в кінці лактації та на закінчення естрального циклу є значним джерелом 17β -естрадіолу для споживачів.

5. Виявлено закономірність зростання вмісту 17β -естрадіолу в молоці питному із збільшенням у ньому масової частки жиру. При цьому найменшу кількість 17β -естрадіолу – $38,1 \pm 4,8$ пг/мл виявляли у молоці з найнижчим вмістом молочного жиру – 1,0 %, а найбільшу – $547,8 \pm 49,8$ пг/мл – у молоці жирністю 3,8 %. В йогурті та кефірі жирністю 1,0 % кількість 17β -естрадіолу становила від $25,5 \pm 3,0$ до $36,1 \pm 3,6$ пг/мл, що, в середньому, в 4,7 раза менше, ніж у кисломолочних продуктах з масовою часткою жиру 2,0 та 2,5 %.

6. Найвищий вміст 17β -естрадіолу було виявлено у сметані з масовою часткою молочного жиру 30 % – $1558,5 \pm 123,4$ пг/мл. Дана кількість 17β -естрадіолу переважала в 1,3 раза вміст у сметані з масовою часткою жиру 15 %. У маслі вершковому селянському (72,5 %) середній вміст 17β -естрадіолу становив $3594,8 \pm 247,1$ пг/см³, що в 1,3 раза менше, порівнюючи з пробами масла екстра (82,0 %).

7. За умови вмісту у молоці-сировині 17β -естрадіолу в кількості від 20,0 до 2500 пг/см³ змін рухової активності, форми тіла та пригніченості розмноження інфузорій не відмічається. За вмісту 17β -естрадіолу в молоці в межах 5000,0 -5500,0 пг/см³ проявляється більш виражений токсичний вплив на культури інфузорії *Tetrachylena pyriformis* за культивування протягом 96 годин, проти 24 години інкубації. Отже, за кількості 17β -естрадіолу у молоці більше 5000,0 пг/см³ проявляється хронічний токсичний вплив на інфузорії *Tetrachylena pyriformis*.

8. Процес сепарування молока впливає на розподіл 17β -естрадіолу між вершками та знежиреним молоком. Кількість 17β -естрадіолу в знежиреному молоці була практично в 5-7 разів менша, ніж у вершках. Для зменшення добового надходження 17β -естрадіолу разом із молочними продуктами необхідно знизити масову частку жиру в них.

9. За режиму пастеризації $85,0 \pm 1,0$ °C протягом 1 хв та під час кип'ятіння протягом 5 хв кількість 17β -естрадіолу у молоці зменшується, в середньому на 5 %. Під час зберігання масла за – 18 °C протягом 9 місяців відбувається зменшення

кількості 17β -естрадіолу до 25 %, а за температури – 9 °C до 20 %. Під час молочнокислого процесу бродіння суттєвих змін щодо зменшення кількості 17β -естрадіолу у готових продуктах не спостерігається.

10. Обґрунтовано та розроблено методологію визначення гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень: $n = 3$, $c = 2$, $m = 500$, $M = 1000$. Це дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів концентрацію естрогенного гормону та у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

З метою підвищення безпечності молока-сировини під час приймання на переробному підприємстві запропоновано:

- Критерії визначення та оцінки гранично допустимої кількості 17β -естрадіолу в молоці-сировині: $n = 3$, $c = 2$, $m = 500$, $M = 1000$, які дозволяють постійно контролювати безпечну для споживачів концентрацію гормону та у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати відповідні коригувальні дії.

- Удосконалено методику визначення 17β -естрадіолу у молоці-сировині за допомогою імуноферментного методу дослідження.

- Методичні рекомендації: «Методика визначення та методологія оцінки молока-сировини за кількістю 17β -естрадіолу».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Башинський В.В., Остапюк М.П., Семенчук О.С. Вимоги європейського законодавства щодо харчових продуктів: збірник інформаційних матеріалів. Київ: ТОВ «Ветінформ», 2009. Т.1. 327 с
2. Бескупська О.В. Сертифікація та стандартизація підприємств харчової промисловості України як фактор підвищення її конкурентоспроможності. *Наук.вісник Херсонського держ. ун-ту*. 2015. Ч.1. №11. С. 76–79.
3. Бергілевич О.М., Косянчук В.В., Салата З.В. Мікробіологія молока і молочних продуктів з основами ветеринарно-санітарної експертизи: навч. посіб. Суми: Університетська книга, 2010. 320 с.
4. Бізікін С.В., М'ячиков О.В., М'ячикова С.О., Ожеред С.В. Базове керівництво з впровадження системи НАССР (методи гарантії безпечності та якості харчових продуктів): навч. посіб. Харків: Вид-во Іванченка І.С., 2013. 39 с.
5. Богатко Н.М., Власенко В.В., Богатко Л.М., Салата В.З., Семанюк В.І. Особливості впровадження системи НАССР на молокопереробних підприємствах України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*. 2011. Т.13. № 4(4). С. 171–176.
6. Богатко Н.М., Богатко Л.М., Салата В.З., Фреюк Д.В., Савчук Г.В. Забезпечення безпечності молока та молочних продуктів на переробних підприємствах України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З Гжицького*. 2018. Т 20. №83. С. 83–87.
7. Величко А.Є., Кухарук Р.М., Маслова І.В., Пухлякова М.В. Стан та перспективи розвитку ринку молока та молочних продуктів України. *Агросвіт*. 2021. № 16. С. 62–68.
8. Віткін Л.М. Світовий досвід та стратегія розвитку систем технічного регулювання. *Стандартизація, сертифікація, якість*. 2013. №4. С. 5–11
9. Вознюк О.І. Умови одержання молочних продуктів високої якості. *Аграрна наука та харчові технології*. 2015. №1. С. 141–152.

10. ДСТУ 2661:2010. Молоко коров'яче питне. Загальні технічні умови. [Чинний від 01-10-2011]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2010. 14с.
11. ДСТУ 3662:2018. Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови. [Чинний від 01-01-2019]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2018. 11с.
12. ДСТУ 4399:2005. Масло вершкове. Технічні умови. [Чинний від 01-07-2006]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2006. 15 с.
13. ДСТУ 4418:2005. Сметана. Технічні умови. [Чинний від 01-10-2006]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2006. 14 с.
14. ДСТУ 7057:2009. Молоко коров'яче сире. Визначення густини, масової частки жиру, білка, сухої речовини та лактози ультразвуковим методом. [Чинний від 01-01-2010]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2010. 17 с.
15. ДСТУ ISO 22000:2019. Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-якої організації в харчовому ланцюзі (ISO 22000:2018, IDT). [Чинний від 01-12-2019]. Вид. офіс. Київ: Держспоживстандарт України, 2019. 27 с.
16. Єгоров Б.В., Макаринська А.В. Сучасні альтернативи кормовим антибіотикам. *Зернові продукти і комбікорми*. 2010. №3. С. 27–34.
17. Касянчук В., Бергілевич О., Крижанівський Я., Кухтин М. Організація ветеринарно-санітарного контролю виробництва молока коров'ячого на фермі відповідно до вимог СОТ. *Ветеринарна медицина України*. 2006. № 7. С. 38–40.
18. Кочетова, Г. С., Салата, В. З., Кухтин, М. Д., Горюк, Ю. В., & Рогальський, І. О. (2023). Оцінка молока-сировини за вмістом 17β -естрадіолу. *Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка*, (38), 216-222.
19. Кочетова Г.С., Салата В.З., Кухтин М.Д. Оцінка молока коров'ячого незбираного за вмістом 17β -естрадіолу. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: тези доп. щоріч. наук.- практ. конф. мол. вч. (м. Київ, 21 липня 2022 р.)*. Київ, 2022. С.7.
20. Кочетова Г.С., Салата В.С., Кухтин, М.Д. Зміна 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів.

Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я»: тези доп. наук.-практ. онлайн конф. (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.). Львів, 2023. С.29-30.

21. Кочетова Г.С., Салата В.З., Кухтин М.Д. Дослідження 17β -естрадіолу у молоці. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти*: тези доп. II Міжнар. наук.-техн. конф. (м. Тернопіль, 24–25 травня 2023 р.). Тернопіль, 2023. С.39.

22. Кочетова Г.С., Салата В.З. Гормональні препарати в харчових продуктах та їх вплив на здоров'я населення. *«Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині»*: тези доп. II конф. присвя. 140-річчю відкриття навч. закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові» (м. Львів, 18–19 листопада 2021 р.) Львів, 2021. С. 82.

23. Коцюмбас І.Я., Гунчак В.М., Стецько Т.І. Проблеми використання антимікробних препаратів для стимулювання росту продуктивних тварин та альтернативи їх застосуванню. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2013. Т.14. № 3-4. С. 381–389.

24. Кухтин М.Д. Динаміка мікробіологічного та біохімічного процесу в молоці сирому при зберіганні за різних температур. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*. 2008. Т. 10. № 3 (38). С. 229–237.

25. Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б., Семанюк В.І., Мурська С.Д. Сучасні погляди на санітарну обробку технологічного устаткування у харчовій промисловості. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*. 2012. Т.14 №3 (53). С. 302–307.

26. Кухтин М., Салата В., Кочетова Г., Болтик Н., Перкій Ю., Малімон З. Оцінка молока і молочних продуктів за вмістом 17β -естрадіолу. *Вісник аграрної науки*. 2022. Т.100. № 6. С. 30–37.

27. Лабораторний практикум з хімії і фізики молока і молочних продуктів / укладач : В.Г.Юкало. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. 182 с.
28. Ляховська О.В. Виробництво молока та молочних продуктів в Україні: регіональні аспекти. *Агросвіт*. 2020. № 9. С. 93–97.
29. Малімон З.В., Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б. Токсико-біологічна оцінка м'яса замороженої риби за наявності залишків антибактеріальних препаратів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2018. Т. 20. № 92. С. 125–129.
30. Моїсєєва Л.О., Романчук І.О., Рудакова, Т.В. Підвищення біологічної цінності кисломолочних продуктів для харчування дітей. *Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету. Серія: Технічні науки*. 2015. Т. 1. № 2. С. 94–98.
31. Мусійчук О. Перспективи використання продуктів переробки молочної сироватки. *Товари і ринки*. 2008. № 1. С. 78–83.
32. Наказ Міністерство Аграрної Політики України Державний Департамент Ветеринарної Медицини від 20.04.2004. N 49 «Про затвердження Правил ветеринарно-санітарної експертизи молока і молочних продуктів та вимог щодо їх реалізації». *Офіційний вісник України*. 2004. № 19.
33. Наказ Міністерства Охорони Здоров'я України від 13.05.2013. № 368 Про затвердження Державних гігієнічних правил і норм «Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах». *Офіційний вісник України*. 2013. № 42.
34. Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України від 12 березня 2019 року № 118 «Про затвердження Вимог до безпечності та якості молока і молочних продуктів». *Офіційний вісник України*. 2019. № 52. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0593-19#Text>
35. Остап'юк С.Д. Вдосконалення методології впровадження системи НАССР, як системи управління якістю, на молокопереробних підприємствах : дис.

канд. техн. наук : 05.01.02 / Національний університет «Львівська політехніка». Львів, 2018. 152 с.

36. Писків С.І., Кухтин М.Д. Моніторинг вмісту нітратів у молоці. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З Гжицького. Серія: Харчові технології*. 2018. Т. 20. № 85. С. 41–45.

37. Польова О.Л. Оцінка споживання продуктів тваринного походження в Україні. *Міжнародний науковий журнал Науковий огляд*. 2014. Т. 4. № 3. С. 21–25.

38. Про ветеринарну медицину: Закон України від 04.02.2021 р. № 1206- IX. *Відомості Верховної Ради України*. 2022. № 1.

39. Про молоко та молочні продукти: Закону України від 24.06.2004 р. № 1870-IV. *Відомості Верховної Ради України*. 2004. № 47.

40. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23.12.1997 р. № 771/97. *Відомості Верховної Ради України*. 1998. № 19.

41. Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин: Закон України від 08.05 2017 р. № 2042-VIII. *Відомості Верховної Ради України*. 2017. № 31.

42. Про внесення змін до Загальнодержавної цільової економічної програми проведення моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у живих тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також у харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, на 2010–2015 роки: Закон України від 15.11.2011 № 4029-VI. *Відомості Верховної Ради України*. 2012. № 25.

43. Регламент Європейського парламенту і ради (ЄС) 2017/625 Про офіційний контроль та іншу офіційну діяльність, що провадиться для забезпечення застосування положень харчового та кормового права, правил щодо здоров'я і благополуччя тварин, здоров'я рослин та засобів захисту рослин. від 15 березня

2017 року. Режим доступу:URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/984_026-17#Text

44. Регламент Комісії (ЄС) № 2073/2005 Про мікробіологічні критерії, що застосовуються до харчових продуктів від 15 листопада 2005 р. Режим доступу: <https://regulation.gov.ua/documents/id100464/tasks>

45. Салата В.З. Оцінка м'яса яловичини на наявність зеранолу – стимулятора росту жуйних та вплив технології зберігання на його вміст. *Науковий вісник ветеринарної медицини: Зб. наук. праць*. 2018. Т. 1. № 140. С.156–162.

46. Салата В.З. Кухтин М.Д. Актуальність контролю залишкових кількостей гормональних препаратів, зокрема зеранолу у м'ясі ВРХ. «*Аграрна наука в умовах Євроінтеграції*»: зб. тез доп. міжнар. наук. -практ. конф. м. Кам'янець-Подільський, 2018 р. Кам'янець-Подільський. 2018. С. 82–84.

47. Салата В.З., Кочетова Г.С., Кухтин М.Д. Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17 β -естрадіолу: *методичні рекомендації*. Львів, ЛНУВМБ. 2023. 25 с.

48. Смілик М. Удосконалення технології м'якого кисломолочного сиру підвищенням біологічної цінності. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З Гжицького. Серія: Харчові технології*. 2017. Т. 19. № 80. С 33–37.

49. Скібіна Ю.В., Науменко С.В. Аналіз ефективності застосування гормонального препарату «Фоллімаг» для стимуляції відтворної здатності кролиць. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2019. № 3. С. 11–15.

50. Сківка Л.М. Імунологія репродукції: навч.посіб. Київ. 2009. 152 с.

51. Скоромна О., Огороднічук Г., Голубенко Т., Шуляк О. Підвищення якості молока – нові перспективи для розвитку харчової галузі Вінниччини. *Продовольчі ресурси*. 2016. Т. 4. № 7. С. 100–106.

52. Соломон А. М. Обґрунтування напрямів розвитку функціональних молочних продуктів. *Техніка, енергетика, транспорт АПК*. 2017. № 2. С. 85–88.

53. Ткаченко Н.А., Чагаровський О.П., Дец Н.О, Ланженко Л.О., Кручек О.А. Ветеринарно-санітарна та технологічна експертиза молока: навч. посіб. Рівне: «Овід», 2018. 235 с.
54. Фурдичко О.І., Свалявчук Л.І., Шевцова О.Л. Еколого-економічні дослідження використання побічних продуктів тваринного походження. *Збалансоване природокористування*. 2019. № 2. С.5–12.
55. Ульянченко О.В., Коломієць О.П. Сучасний стан та перспективи розвитку органічного виробництва та переробки молока в Україні. *Бізнес-навігатор*. 2017. № 4-1. С. 108–112.
56. Черниченко І.О., Баленко Н.В., Литвиченко О.М., Бабій В.Ф., Главачек Д.О., Кондратенко О.Є. Захворюваність на рак молочної залози і роль стійких хлорорганічних забруднювачів навколишнього середовища (аналіз даних літератури). *Довкілля та здоров'я*. 2019. Т. 2. № 91. С. 53–59.
57. Чечет О., Бергілевич О., Касянчук В. Безпечність м'яса птиці відповідно до вимог ЄС в Україні: державний моніторинг гормонів. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*. 2021. Т. 23. № 103. С. 78–87.
58. Шакула О.О. Застосування стимуляторів росту як енергоресурсозберігаючого чинника при відгодівлі молодняку великої рогатої худоби. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. 2012. Т. 24. № 1. С. 128–131.
59. Юкало В.Г. Біологічна активність протеїнів і пептидів молока: монографія, Тернопіль: Вид-во ТНТУ імені Івана Пулюя, 2021. 372 с.
60. Alexander C., Andersson H., Andersson L., Ansell R.J, Kirsch N, Nicholls I., O'Mahony J., Whitcombe M. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.* 2006. Vol. 19. P.106–180.
61. Antignac J.P., Cariou R., Le Bizec B., Cravedi J.P., Andre F. Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003. Vol. 17, № 12.

P. 1256–1264.

62. Ashley B. Petrone, James W. Simpkins, Taura L. Barr. 17 β -Estradiol and Inflammation: Implications for Ischemic Stroke. *Aging and disease*. 2014. Vol. 5, № 5. P. 340–345.

63. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015. № 72. P. 4–15.

64. Aune D, Navarro Rosenblatt DA, Chan DSM, Vieira AR, Vieira R, Greenwood DC, Vatten LJ, Norat T. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2015. Vol. 101, № 1. P. 87–117.

65. Babio N, Becerra-Tomás N, Nishi SK, López-González L, Paz-Graniel I, García-Gavilán J. Total dairy consumption in relation to overweight and obesity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2022. Vol. 23, № 1. P. 1–17.

66. Bayer E.V., Novozhitskaya Y.N., Shevchenko L.V., Mykhalska, V.M. Monitoring of residues of veterinary preparations in food products. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017. Vol. 7, № 3. P. 251–257.

67. Barbara S.R., María A.R., Javier H.B. and Miguel R.D. Analysis of estrogenic compounds in dairy products by hollow-fiber liquid-phase micro extraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Food Chemistry*. 2014. №. 149. P. 319–325.

68. Berhilevych O.M., Kasianchuk V.V., Deriabin O.M., Kukhtyn M.D. Isolation of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* from beef and swine carcasses and the characterization of their genes. *Regul. Mech. Biosyst*. 2018. Vol. 9, № 2. P. 275–280.

69. Blasco C., Van Poucke C., and Van Peteghem C. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1154, № 1-2. P. 230–239.

70. Boland M.J., Rae J.M. Future supply of animal protein for human consumption. *Trends in Food Science & Technology* 2013. Vol. 29, № 1. P. 62–73.

71. Borazan G.Ö., Karagül H., Çelik S., Ünal N., Pekcan M., Tevhide Sel E. L. Determination of zeranol residues and the serum testosterone oestrogene and progesterone levels in lambs around Ankara region. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2007. Vol. 54, № 1. P. 7–10.
72. Braekevelt E., Lau B. P., Tague B., Popovic S., & Tittlemier S. A. Effect of cooking on concentrations of β -estradiol and metabolites in model matrices and beef. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011. Vol. 59, № 3. P. 915–920.
73. Cerhan J.R, Sellers T.A, Janney C.A, Pankratz V.S, Brandt K.R, Vachon C.M. Prenatal and perinatal correlates of adult mammographic breast density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005. Vol. 14, № 6. P. 1502–1508.
74. Chen F, Yan L, Lin L, et al. Independent and joint effects of tea and milk consumption on oral cancer among non-smokers and non-drinkers: a case-control study in China. *He B.Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 30. P. 50091–50097.
75. Chen L, Li M, Li H. Milk and yogurt intake and breast cancer risk: a meta-analysis. *Medicine*. 2019. Vol. 98, № 12. P. 1–3.
76. Chen C., Mi X, Yuan Y. A preliminary risk assessment of potential exposure to naturally occurring estrogens from Beijing (China) market milk products. *Food and Chemical Toxicology*. 2014. Vol. 71. P. 74–80.
77. Cho E., Spiegelman D., Hunter D.J., Chen W.Y., Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J. Natl Cancer Inst*. 2003. Vol. 95, № 14. P. 1079–1085.
78. Claeys W.L., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., et al. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*. 2013. Vol. 31. P. 251–262.
79. Codex Alimentarius Commission (2015) Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods: CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 37th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2014)

80. CRL Guidance Paper (7 December 2007) - CRLs' View on State of the Art Analytical Methods for National Residue Control Plans. Режим доступа: URL: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>
81. Cristina R. T., Hanganu F., Lazăr et al R. Prevalence of steroid hormone residues by GC-MS/MS screening in animal matrices in Romania. *Romanian Biotechnological Letters*. 2017. Vol. 22, № 1. P. 12155–12162.
82. Croubels S., Daeseleire E., De Saeger S., Van Eenoo P., and Vanhaecke L. Hormone and veterinary drug residue analysis in food, feed, biological and environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. Vol. 407, № 15. P. 4339–4342.
83. Dashkovskyy O., Salata V. Hazard analysis and critical control points (HACCP), the production of meat sausages on pc «Stryjsky meats delicious». *Scientific Messenger LNUVMBT named after SZ Gzhytskyj*. 2016. Vol. 18, № 3. 70 p.
84. Dashti F., Soltani S., Benisi-Kohansal S., Azadbakht L., Esmailzadeh A. Consumption of dairy products and odds of breast cancer: an Iranian case-control study. *Breast Cancer*. 2022. Vol. 29, № 2. P. 352–360.
85. Davoodi H., Esmaeili S. & Mortazavian A.M. Effects of milk and milk products consumption on cancer: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013. Vol. 12. P. 249–264.
86. Delbes G., Levacher C. & Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. 2006. Vol. 132. P. 527–538.
87. Delgado C. Rising demand for meat and milk in developing countries: implications for grass lands-based livestock production. In *Grassland: a Global Resource*, D. A. McGilloway, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. 2005. P. 28–39.
88. De Brabander H. F., Le Bizec B., Pinel G. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007. Vol. 42, № 8. P. 983–998.
89. De la Rica R., Stevens M.M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat Nanotechnol*. 2012. Vol. 7. № 12. P. 821–824.

90. Dikeman M.E. Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality. *Meat Science*. 2007. Vol. 77, № 1. P.121–135.
91. Dong J.Y., Zhang L., He K., Qin L.Q. Dairy consumption and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011. Vol. 127. P. 23–31.
92. Dostalova P., Zatecka E., Dvorakova-Hortova K. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *Int. J. Mol. Sc*. 2017. Vol. 18. P. 1–23.
93. Downer M.K., Batista J.L., Mucci L.A., Stampfer M.J., Epstein M.M., Håkansson N., Wolk A., Johansson J.E., Andrén O. & Fall K. et al. Dairy intake in relation to prostate cancer survival. *International Journal of Cancer*. 2017. Vol. 140. P. 2060–2069.
94. Du B., Wen F., Guo X., Zheng N., Zhang Y., Li S., Wang J. Evaluation of an ELISA-based visualization microarray chip technique for the detection of veterinary antibiotics in milk. *Food Control*. 2019. Vol. 106. P. 219–227.
95. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*. 2015. Vol. 13. 95 p.
96. European Community. 2007. CRL guidance paper (7 December 2007). CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Accessed Sep. 6. 2017. Режим доступа: URL: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>.
97. EU 2003. Hormones in meat—food safety. Режим доступа: URL: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/meat_hormones_en
98. European Environment Agency. Per capita EU-27 consumption of meat, fish and dairy (by weight), 2018. Режим доступа: URL: https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/daviz/per-capita-eu-27-consumption-1#tab-chart_1
99. Farlow D.W., Xu X., Veenstra T.D. Comparison of estrone and 17 β -estradiol levels in commercial goat and cow milk. *Journal of Dairy Science*. 2012. Vol. 95. P. 1699–1708.

100. Farlow D.W., Xu X., Veenstra T.D. Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 2009. Vol. 877, № 13. P. 1327–1334.
101. Forman M.R., Cantwell M.M., Ronckers C., Zhang Y. Through the looking glass at early-life exposures and breast cancer risk. *Cancer Invest.* 2005. Vol. 23, № 7. P. 609–624.
102. FAO. Food system, urbanization and dietary changes, in *The State of Food and Agriculture Leveraging Food Systems for Inclusive Rural Transformation*, FAO. Rome, Italy. 2017.
103. Fraser G.E., Jaceldo-Siegl K., Orlich M., Mashchak A., Sirirat R., Knutsen S. Dairy, soy, and risk of breast cancer: those confounded milks. *Int J Epidemiol.* 2020. Vol. 49, № 5. P. 1526–1537.
104. Fuh M.-R., Huang S.-Y., Lin T.-Y. Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta.* 2004. Vol. 64, № 2. P. 408–414.
105. Furnari C., Maroun D., Gyawali S., Snyder B.W. & Davis A.M. Lack of biologically active estrogens in commercial cow milk. *Journal of Dairy Science.* 2012. Vol. 95. P. 9–14.
106. Gadzała-Kopciuch R., Ricanyova J., and Buszewski B. Isolation and detection of steroids from human urine by molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2009. Vol. 877, № 11-12. P. 1177–1184.
107. Galbraith H. Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues. *Nutrition Research Reviews.* 2002. Vol. 15, № 2. 243–314.
108. Galván-Salazar H.R., Arreola-Cruz A., Madrigal-Pérez D., Soriano-Hernández A.D., Guzman-Esquivel J., Montes-Galindo D.A., et al. Association of milk and meat consumption with the development of breast cancer in a Western Mexican population. *Breast Care.* 2015. Vol. 10, № 6. P. 393–396.

109. Ganmaa D., Li X.M., Wang J., Qin L.Q., Wang P.Y., Sato A. Incidence and mortality of testicular and prostatic cancers in relation to world dietary practices. *Int J Cancer*. 2002. Vol. 98, № 2. P. 262–267.
110. Ganmaa D., Qin L.Q., Wang P.Y., Tezuka H., Teramoto S. & Sato A. A two-generation reproduction study to assess the effects of cows' milk on reproductive development in male and female rats. *Fertility and Sterility*. 2004. Vol. 82. P. 1106–1114.
111. Ganmaa D., Li X.M., Qin L.Q., Wang P.Y., Takeda M., Sato A. The experience of Japan as a clue to the etiology of testicular and prostatic cancers. *Med Hypotheses*. 2003. Vol. 60, № 5. P. 724–730.
112. Ganmaa D., Cui X., Feskanich D., Hankinson S.E., Willett W.C. Milk, dairy intake and risk of endometrial cancer: A 26-year follow-up. *Int J Cancer*. 2012. Vol. 130, № 11. P. 2664–2671.
113. Ganmaa D., Sato A. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. *Med Hypotheses*. 2005. Vol. 65, № 6. P. 1028–1037.
114. Ganmaa D., Tezuka H., Enkhmaa D., Hoshi K. & Sato A. Commercial cows' milk has uterotrophic activity on the uteri of young ovariectomized rats and immature rats. *International Journal of Cancer*. 2005. Vol. 118. P. 2363–2365.
115. Gaard, G. Recombinant bovine growth hormone criticism grows. *Alternatives Journal*. 1995. Vol. 21, № 3. 6 p.
116. Garner M.J., Birkett N.J., Johnson K.C., Shatenstein B., Ghadirian P. & Krewski D. Dietary risk factors for testicular carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2003. Vol. 106. P. 934–941.
117. Genkinger J.M., Hunter D.J., Spiegelman D., Anderson K.E., Arslan A., Beeson W.L., Smith-Warner S.A. Dairy products and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006. Vol. 15, № 2. P. 364–372.
118. Gholamalizadeh M., Jarrahi A.M., Akbari M.E., Bourbour F., Mokhtari Z., Salahshornezhad S. Association between FTO gene polymorphisms and breast cancer: the role of estrogen. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2020. Vol. 15, № 2. P. 115–121.

119. Goldberg M., D'Aloisio A.A., O'Brien K.M., Zhao S., Sandler D.P. Pubertal timing and breast cancer risk in the Sister Study cohort. *Breast Cancer Res*, 2020. Vol. 22, № 1. P.1–11.
120. Goyon A., Cai C.Z., Kraehenbuehel K., Hartmann C., Shao B. & Moltier P. Determination of steroid hormones in bovine milk by LC-MS/MS and their levels in Swiss Holstein cow milk. *Food Additives and Contaminants: Part A, Chemistry, Analyses, Control, Exposure, Risk Assessment*. 2017. Vol. 33. P. 804–816.
121. Grgurević N., Koraić J., Majdić G. & Snoj T. Effect of dietary estrogens from bovine milk on blood hormone levels and reproductive organs in mice. *Journal of Dairy Science*. 2016. Vol. 99. P. 6005–6013.
122. Gustafsson J-A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2003. Vol. 24, № 9. 479–485.
123. Hall J.M., Couse J.F., Korach K.S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J Biol Chem*. 2001. Vol. 276, № 40. P. 36869–36872.
124. Hartmann S., Lacorn M., Steinhart H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food chemistry*. 1998. Vol. 62, № 1. P. 7–20.
125. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J-A. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007. Vol. 87, № 3. P. 905–931.
126. Hemmat M. I., Reham A. A., Omaina M. D. & Asmaa E. H. Survey on some hormonal residues in chicken meat, liver and kidneys. *Benha veterinary medical journal*. 2018. Vol. 34, № 2. P. 23–30.
127. He Y., Tao Q., Zhou F., Si Y., Fu R., Xu B., Xu J., Li X., Chen B. The relationship between dairy products intake and breast cancer incidence: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer*. 2021. Vol. 21, № 1. P.1–22.
128. Hirpessa B.B., Ulusoy, B.H., Hecer C. Hormones and hormonal anabolics: residues in animal source food, potential public health impacts, and methods of analysis. *Journal of Food Quality*. 2020. P. 1–12

129. Hjartaker A., Thoresen M., Engeset D. Dairy consumption and calcium intake and risk of breast cancer in a prospective cohort: The Norwegian Women and Cancer study. *Cancer Causes Control*. 2010. Vol. 21. P. 1875–1885.
130. Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Vergeles K.M., Kovalenko V.L., Verkholiuk M.M., Peleno R.A., Horiuk, V.V. Characteristics of enterococci isolated from raw milk and hand-made cottage cheese in Ukraine. *Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*. 2018. Vol. 9, № 2. P. 1128–1133.
131. Horyuk Y.V., Kukhtyn M.D., Perkiy Y.B., Horyuk V.V., Semenyuk V.I. Identification of Enterococcus isolated from raw milk and cottage cheese “home” production and study of their sensitivity to antibiotics. *Scientific Messenger LNUVMBT named after SZ Gzhytskyj*. 2016. Vol. 18, № 3. P. 70.
132. Huang D., Wu Q., Xu X., Ji C., Xia Y., Zhao Z. Maternal consumption of milk or dairy products during pregnancy and birth outcomes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Front Nutr*. 2022. Vol. 9. P. 1–14.
133. Janowski T., Zdunczyk S., Malecki-Tepicht J., Baranski W., Ras A. Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest Anim Endocrinol*. 2002. Vol. 23, № 1-2. P. 125–137
134. Jiang T., Zhao L., Chu B., Feng Q., Yan W., Lin J.-M. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2009. Vol. 78, № 2. P. 442–447.
135. Jouan P.N., Pouliot Y., Gauthier S.F., Laforest J.P. Hormones in bovine milk and milk products: A survey. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, № 11. P. 1408–1414.
136. Kaluza J., Komatsu S., Lauriola M., Harris H.R., Bergkvist L., Michaëlsson K. Long-term consumption of non-fermented and fermented dairy products and risk of breast cancer by estrogen receptor status – population-based prospective cohort study. *Clin Nutr*. 2021. Vol. 40, № 4. P. 1966–1973.
137. Karpiesiuk W., Lehner A.F., Hughes C.G., Tobin T. Preparation and chromatographic characterization of tetrahydrogestrinone, a new Designer anabolic steroid. *Chromatographia*. 2004. Vol. 60, № 5-6. P. 359–370.

138. Khan I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., Jaspal M.H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in health and disease*. 2019. Vol. 18, № 1. P. 1–13.
139. Khaniki G.J. Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. *International Journal of Dairy Science*. 2007. Vol. 2, P. 104–115.
140. Kochetova H.S., Kukhtyn M.D., Salata V.Z., Horiuk Y.V., Kladnytska L.V., Matviishyn T.S. Dynamics of 17 β -estradiol under influence of technological operations during production of dairy products. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2023. Vol. 14, № 1. P. 48–54.
141. Kochetova H., Salata V., Kukhtyn M., Zghozinska O., Melnyk V. Toxicological characteristics of raw milk with different contents of 17 β -estradiol. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*. 2023. Vol. 25, № 109. P. 19–25.
142. Konstantinou G.N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1592. P. 79–94.
143. Kozhyn V.A., Kukhtyn M.D., Horiuk Y.V., Horiuk V.V. Perkiy Y.B., Gufrij D.F. Study of the disinfectant's «Enzides» toxic effects on infusoria cells. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2021. Vol. 9, № 4. P. 191–194.
144. Kukhtyn M.D., Horyuk Y.V., Horyuk V.V., Yaroshenko T.Y., Vichko O.I., Pokotylo O.S. Biotype characterization of Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, № 3. P. 384–388
145. Kukhtyn M., Vichko O., Berhilevych O., Horyuk Y., Horyuk V. Main microbiological and biological proerties of microbial associations of "Lactomyces tibeticus". *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016. Vol. 7, № 6. P. 1266–1272.
146. Kukhtyn M.D., Horyuk Y.V., Horyuk V.V., Perkiy Y.B., Kovalenko V.L., Yaroshenko T.Y. The main regularities of raw milk contamination with Staphylococcus aureus. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*. 2017. P. 30–33.

147. Kukhtyn M., Vichko O., Kravets O., Karpyk H., Shved O., Novikov V. Biochemical and microbiological changes during fermentation and storage of a fermented milk product prepared with Tibetan Kefir Starter. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 2018. Vol. 68, № 4. P. 1-5
148. Kukhtyn M., Salata V., Pelenyo R., Selskyi V., Horiuk Y., Boltyk N., Ulko L., Dobrovolsky V. Investigation of zeranol in beef of Ukrainian production and its reduction with various technological processing. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2020. Vol. 14. P. 95–100.
149. Kukhtyn M., Salata V., Horiuk Y., Kovalenko V., Ulko L., Prosyanyi S., Shuplyk V., Kornienko L. The influence of the denitrifying strain of *Staphylococcus carnosus* No. 5304 on the content of nitrates in the technology of yogurt production. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2021. Vol. 15, P. 66–73.
150. Kukhtyn M., Salata V., Kochetova H., Malimon Z., Miahka K., Horiuk Y., Pokotylo O. Content of 17β -Estradiol in Raw Milk in Ukraine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2022. Vol. 28, № 6. P. 673–679.
151. Larsson S. C., Bergkvist L. Wolk A. Milk and lactose intakes and ovarian cancer risk in the Swedish Mammography Cohort. *The American journal of clinical nutrition*. 2004. Vol. 80, № 5. P. 1353–1357.
152. Larsson S.C., Orsini N., Wolk A. Milk, milk products and lactose intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. 2006. Vol. 118. P. 431–441.
153. Li X.M., Ganmaa D., Qin L.Q., Sato A. Testing potential effects of environmental endocrine disruptors in cow milk on reproductive index in female rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2005. Vol. 18. P. 307–313.
154. Lykholat O.A., Grigoryuk I.P., Lykholat T.Y. Metabolic effects of alimentary estrogen in different age animals. *Annals of Agrarian Science*. 2016. Vol. 14. P. 335–339.
155. Macrina A.L., Ott T.L., Roberts R.F. & Kensinger R.S. Estrone and estrone sulfate concentrations in milk and milk fractions. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2012. Vol. 112. P.1088–1093.

156. Malekinejad H., Rezabakhsh A. Hormones in dairy foods and their impact on public health-a narrative review article. *Iranian journal of public health*, 2015. Vol. 44, № 6. P. 742–758.
157. Malekinejad H., Scherpenisse P., Bergwerff A. A. Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006. Vol. 54, № 26, P. 9785–9791.
158. Mantey D., Behl C. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience*. 2006. Vol. 138, № 3. P. 845–850.
159. Maruyama, K., Oshima, T., Ohya, K. Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant cows. *Pediatrics International*. 2010. Vol. 52, № 1. P. 33–38.
160. Massart F., Harrell J. C., Federico G., Saggese G. Human breast milk and xenoestrogen exposure: a possible impact on human health. *Journal of Perinatology*. 2005. Vol. 25, № 4. P. 282–288.
161. McCann S.E., Hays J., Baumgart C.W., Weiss E.H., Yao S., Ambrosone C.B. Usual consumption of specific dairy foods is associated with breast cancer in the Roswell Park Cancer Institute Data Bank and BioRepository. *Curr Dev Nutr*. 2017. Vol. 1, № 3. P.1–6.
162. McGlynn K.A., Cook M.B. Etiologic factors in testicular germ cell tumors. *Future Oncology*. 2009. Vol. 5. P. 1389–1402.
163. Melnik B.C., John S.M., Carrera-Bastos P. The Role of Cow's Milk Consumption in Breast Cancer Initiation and Progression. *Curr Nutr Rep*. 2023. Vol. 12. P. 122–140.
164. Melnik B.C. Milk: an epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for Western diseases. *J Transl Med*. 2015. Vol. 13. P. 1–22.
165. Metodychni vkazivky shchodo toksyko-biologichnoi otsinky miasa, miasnykh produktiv ta moloka z vykorystanniam infuzorii Tetrakhimeny peryformis (ekspres-metod). Vitebsk: 1997. 13 p.
166. Michels K.B., Willett W.C. Breast cancer—early life matters. *N Engl J. Med*. 2004. Vol. 351, № 16. P. 1679–1681.

167. Mi J., Li S., Xu H., Liang W., Sun T. Rapid analysis of three β -agonist residues in food of animal origin by automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2014. Vol.37, № 17. P. 2431–2438.
168. Mo Z., Pang Y., Yu L., Shen X. Membrane-protected covalent organic framework fiber for direct immersion solid-phase microextraction of 17 β -estradiol in milk. *Food Chemistry*. 2021. Vol. 359. 129816.
169. Narendran R., Hacker R.R., Smith V G., Lun A. Estrogen and progesterone concentrations in bovine milk during the estrous cycle. *Theriogenology*. 1979. Vol. 12, № 1. P. 19–25.
170. Nili-Ahmadabadi A., Rezaei F., Heshmati A., Ranjbar A., Larki-Harchegani A. Steroid Hormone Exposure as a Potential Hazard in Milk Consumers: A Significant Health Challenge in Iran. *Journal of Food Quality*. 2021. P. 1–6
171. Nilsson L.M., Winkvist A., Esberg A., Jansson J.H., Wennberg P. Dairy products and cancer risk in a Northern Sweden population. *Nutr Cancer*. 2020. Vol. 72, № 3. P. 409–420.
172. Nielsen T.S., Khan G., Davis J., Michels K.B., Hilakivi-Clarke L. Prepubertal exposure to cow's milk reduces susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *International Journal of Cancer*. 2011. Vol. 128. P. 12–20.
173. Novotny R., Daida Y., Morimoto Y., Shepherd J., Maskarinec G. Puberty, body fat, and breast density in girls of several ethnic groups. *Am J Hum Biol*. 2011. Vol. 23, № 3. P. 359–365.
174. Nyangwile E., Heyse W., Méjean C., Dallongeville J. Analyses of food transitions in the world between 1961 and 20. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2022. Vol. 57. P. 251–259.
175. Palacios O. M., Cortes H. N., Jenks B. H., Maki K. C. Naturally occurring hormones in foods and potential health effects. *Toxicology Research and Application*. 2020. Vol. 4, P. 1–4.

176. Park Y., Leitzmann M.F., Subar A.F., Hollenbeck A., Schatzkin A. Dairy food, calcium, and risk of cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Archives of Internal Medicine*. 2009. Vol. 169. P. 391–401.
177. Pape-Zambito D.A., Magliaro A.L., Kensinger R.S. 17 β -estradiol and estrone concentrations in plasma and milk during bovine pregnancy. *J Dairy Sci*. 2008. Vol. 91, № 1. P.127–135.
178. Pape-Zambito D.A., Roberts R.F., Kensinger R.S. Estrone and 17 β -estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products. *J. Dairy Sci*. 2010. Vol. 93. P. 2533–2540.
179. Passantino A. Steroid Hormones in Food Producing Animals: Regulatory Situation in Europe. *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. 2012. P. 33–50.
180. Pichon V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1152, № 1-2. P. 41–53.
181. Porphyre V., Rakotoharinome M., Randriamparany T., Pognon D., Prévost S., Le Bizec B. Residues of medroxyprogesterone acetate detected in sows at a slaughterhouse, Madagascar. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2013. Vol. 30, № 12. P. 2108–2113.
182. Pu H., Huang Z., Sun D.-W., Fu H. Recent advances in the detection of 17 β -estradiol in food matrices: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59, № 13. P. 2144–2157.
183. Qaid, M.M., Abdoun, K.A. Safety and concerns of hormonal application in farm animal production: A review. *Journal of Applied Animal Research*. 2022. Vol. 50, № 1. P. 426–439.
184. Qu X., Su C., Zheng N., Li S., Meng L., Wang J. A survey of naturally-occurring steroid hormones in raw milk and the associated health risks in Tangshan City, Hebei Province, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. Vol. 15. 38 p.
185. Qin L-Q., Xu J-Y., Wang P-Y., Kaneko T., Hoshi K., Sato A. Milk consumption is a risk factor for prostate cancer: meta-analysis of case-control studies. *Nutr Cancer*. 2004. Vol. 48, № 1. P. 22–27.

186. Quist M.A., LeBlanc S.J., Hand K.J., Lazenby D., Miglior F., Kelton D.F. Milking-to-milking variability for milk yield, fat and protein percentage and somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 2008. Vol. 91. P. 3412–3423.
187. Radko L., Posyniak A. In Vivo Study of The Oestrogenic Activity of Milk. *Journal of veterinary research.* 2021. Vol. 65, № 3. P. 335–340.
188. Ramezani Tehrani F., Moslehi N., Asghari G., Gholami R., Mirmiran P., Azizi F. Intake of dairy products, calcium, magnesium, and phosphorus in childhood and age at menarche in the Tehran Lipid and Glucose Study. *PloS One.* 2013. Vol. 8, № 2. P. 1–6.
189. Remesar X., Tang V., Ferrer E., Torregrosa C., Virgili J., Masanes R., Alemany M. Estrone in food: a factor influencing the development of obesity? *European journal of nutrition.* 1999. Vol. 38, № 5. P. 247–253.
190. Riahi-Zanjani B., Heidarzadegan M., Badibostan H., Karimi, G. Determination of 17 β -estradiol in commercial pasteurized and sterilized milk samples in Mashhad, Iran. *Journal of food science and technology.* 2019. Vol. 56, № 11. P. 4795–4798.
191. Ridgway K., Lalljie S. P. D., Smith R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A.* 2007. Vol. 1153, № 1-2. P. 36–53.
192. Ronco A.L., De Stéfani E., Dátoli R. Dairy foods and risk of breast cancer: a case-control study in Montevideo, Uruguay. *Eur J Cancer Prev.* 2002. Vol. 11, № 5. P. 457–463.
193. Rouge M., Drouault M., Hanoux V., Delalande C., Bouraïma-Lelong, H. Ex vivo effects of 17 β -estradiol on the prepubertal rat testis. *Reproductive Toxicology.* 2023. Vol. 118. 108363.
194. Salata V., Kochetova H. The Study of the 17 β -estradiol content in raw milk during the lactation period. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences.* 2022. Vol. 24, № 105. P. 44–49.

195. Samoli E., Lagiou A., Zourna P., Barbouni A., Georgila C., Tsikkinis A. Expression of estrogen receptors in non-malignant mammary tissue modifies the association between insulin-like growth factor 1 and breast cancer risk. *Ann Oncol.* 2015. Vol. 26, № 4. P. 793–797.
196. Scarth J., Akre C., Van Ginkel L., Le Bizec B., De Brabander H., Korth W., Kay J. Presence and metabolism of endogenous androgenic–anabolic steroid hormones in meat-producing animals: a review. *Food Additives and Contaminants.* 2009. Vol. 26, № 5. P. 640–671.
197. Schug T.T., Janesick A., Blumberg B., Heindel J.J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2011. Vol. 127. P. 204–215.
198. Shao B., Zhao R., Meng J. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 2005. Vol. 548, № 1-2. P. 41–50.
199. Shi Y., Peng D.-D., Shi C.-H., Zhang X., Xie Y.-T, Lu B. Selective determination of trace 17 β -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC. *Food Chemistry.* 2011. Vol. 126, № 4. P. 1916–1925.
200. Singhal S., Baker R.D., Baker S.S. A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2017. Vol. 64, № 5. P. 799–805.
201. Snoj T., Zuzek M. C., Cebulj-Kadunc N., Majdic G. Heat treatment and souring do not affect milk estrone and 17 β -estradiol concentrations. *Journal of dairy science.* 2018. Vol. 101, № 1. P. 61–65.
202. Snoj T. Majdic G. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Estrogens in consumer milk: is there a risk to human reproductive health? *European Journal of Endocrinology.* 2018. Vol. 179, № 6. P. 275–286.
203. Socas-Rodríguez B., Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M. Á. Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples. *Journal of Chromatography A.* 2013. Vol. 1313. P. 175–184.

204. Strydom P.E., Frylinck L., Montgomery J.L., Smith M.F. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Science*. 2009. Vol. 81, № 3. P. 557–564.
205. Tamayo F. G., Turiel E., Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1152, № 1-2. P. 32–40.
206. Tat D., Kenfield S.A., Cowan J.E., Broering J.M., Carroll P.R., Van Blarigan E.L., Chan J.M. Milk and other dairy foods in relation to prostate cancer recurrence: Data from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor (CaPSURE™). *The Prostate*. 2018. Vol. 78, № 1. P. 32–39.
207. Tong J.J., Thompson I.M., Zhao X., Lacasse P. Effect of 17 β -estradiol on milk production, hormone secretion, and mammary gland gene expression in dairy cows. *Journal of dairy science*. 2018. Vol. 101, № 3. P. 2588–2601.
208. Torfadottir J. E., Steingrimsdottir L., Mucci L., Aspelund T., Kasperzyk J. L., Olafsson O., Valdimarsdottir U. A. Milk intake in early life and risk of advanced prostate cancer. *American journal of epidemiology*. 2012. Vol. 175, № 2. P. 144–153.
209. Tremblay L.A., Gadd J.B., Northcott G.L. Steroid estrogens and estrogenic activity are ubiquitous in dairy farm watersheds regardless of effluent management practices. *Agric Ecosyst Environ*. 2018. Vol. 253. P. 48–54.
210. Tripathy V., Sharma K.K., Yadav R., Devi S., Tayade A., Sharma K., Shakil N. A. Development, validation of QuEChERS-based method for simultaneous determination of multiclass pesticide residue in milk, and evaluation of the matrix effect. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2019. Vol. 54, № 5. P. 394–406.
211. Uluer E.T., Pekmezci M.Y., Ensarioğlu H.K., Özbilgin M.K. Вплив куркуміну та кверцетину на патогенез раку молочної залози шляхом зниження регуляції miR-632 та miR-137. *Practical oncology*. 2023. Vol. 6, № 1. P. 7–12.
212. US–FDA. Tolerances for residue of new animal drugs in food, in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Implantation or Injectable Dosage form New Animal Drugs, Code of Federal Regulation (CITE: 21CFR 522), 2017. Vol. 6. FDA, Silver Spring, MD, USA.

213. US–FDA. Implantation or injectable dosage form new animal drugs, zeranol, in Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Code of Federal Regulation (CITE 21CFR 556.760), 2017. Vol. 6, FDA, Silver Spring, MD, USA.

214. US DHHS-FDA (Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration). Guidance for industry. General principles for evaluating the human food safety of new animal drugs used in food-producing animals. 2018. Режим доступа:

URL:<https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052180.pdf>.

215. Wajszczyk B., Charzewska J., Godlewski D., Zemła B., Nowakowska E., Kozaczka M. Consumption of dairy products and the risk of developing breast cancer in Polish women. *Nutrients* 2021. Vol. 13, № 12. P. 1–18.

216. Wang J., Cheng C., Yang Y. Determination of estrogens in milk samples by magnetic-solid-phase extraction technique coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*. 2015. Vol. 80, № 12. P. 2655–2661.

217. Wang F., Yu L., Wang F., Liu L., Guo M., Gao D. Risk factors for breast cancer in women residing in urban and rural areas of eastern China. *J Int Med Res*. 2015. Vol. 43, № 6. P. 774–789.

218. Wang S. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products : a review. *Food Addit Contam.* 2007. Vol. 24, № 6. P. 573–582.

219. Wang W.-J., Ling Y., Xu T., Gao H.-B., Sheng W., Li J. Development of an indirect competitive ELISA based on polyclonal antibody for the detection of diethylstilbestrol in water samples. *Chinese Journal of Chemistry*. 2007. Vol 25, № 8. P. 1145–1150.

220. Wang Y., Li L., Wang C.C., Leung L.K. Effect of zeranol on expression of apoptotic and cell cycle proteins in murine placentae. *Toxicology*, 2013. Vol. 314, № 1. P. 148–154.

221. Wiley A.S. Milk intake and total dairy consumption: associations with early menarche in NHANES 1999–2004. *PloS One*. 2011. Vol. 6, № 2. P. 1–9.

222. Wozniak B., Matraszek–Zuchowska I., Kłopot A., Posyniak A. Fast analysis of 19 anabolic steroids in bovine tissues by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2019. Vol. 42, № 21. P. 3319–3329.
223. Varriale A., Pennacchio A., Pinto G., Oliviero G., D’Errico S., Majoli A., Scala A., Capo A., Pennacchio A., Di Giovanni S., Staiano M., D’Auria S. A fluorescence polarization assay to detect steroid hormone traces in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015. Vol. 63, № 41. P. 9159–916.
224. Vicini J., Etherton T., Kris-Etherton P., Ballam J., Denham S., Staub R., Goldstein D., Cady R., McGrath M., Lucy M. Survey of retail milk composition as affected by label claims regarding farm-management practices. *J. Am. Diet. Assoc.* 2008. Vol. 108. P. 1198–1203.
225. Xiao L., Zhang Z., Wu C., Han L., Zhang H. Molecularly imprinted polymer grafted paper-based method for the detection of 17 β -estradiol. *Food chemistry*. 2017. Vol. 221. P. 82–86.
226. Yang Y., Chen J., Shi Y.-P. Recent developments in modifying polypropylene hollow fibers for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015. P. 109–117.
227. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. Vol. 2. P. 37–44.
228. Yukalo V., Datsyshyn K., Storozh L. Comparison of products of whey proteins concentrate proteolysis, obtained by different proteolytic preparations. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. Vol. 5. P. 40–47.
229. Zang J., Shen M., Du S., Chen T., Zou S. The association between dairy intake and breast cancer in Western and Asian populations: a systematic review and meta-analysis. *J Breast Cancer*. 2015. Vol. 18, № 4. P. 313–322.
230. Zaidi S.A. Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles. *Drug Deliv.* 2016. Vol. 23. P. 2262–2271.

231. Zeng Z., Liu R., Zhang J., Yu J., He L. Shen X. Determination of seven free anabolic steroid residues in eggs by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 2013. Vol. 51, № 3. P. 229–236.

232. Zhang J., Wang L., Han Y. Preparation of 17 β -estradiol surface molecularly imprinted polymers and their application to the analysis of biological samples. *Journal of separation science*. 2013. Vol. 36, № 21-22. P. 3486–3492.

233. Zhou H., Qin L.Q., Ma D.F., Wang Y., Wang P.Y. Uterotrophic effects of cow milk in immature ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2010. Vol. 15. P. 162–168.

ДОДАТКИ

Акт впровадження з лабораторії Держпродслужби Тернопіль**Акт****впровадження результатів завершених наукових досліджень**

1. **Назва впровадження:** Науково-практичні рекомендації «Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу».

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Методичні рекомендації «Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу» розроблені відповідно до науково-дослідної тематики № держреєстрації 0119U101683 Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького «Оцінка концентрації гормонів у молочних продуктах, як фактору, що стимулює порушення метаболізму та розвиток онкозахворювань у споживачів», запланованої на 2019-2023 рр.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарно-санітарного інспектування Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

4. **Коротка характеристика впровадження:** У методичних рекомендаціях «Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу», розроблено та запропоновано методологію визначення гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень: $n = 3$, $c = 2$, $m = 500$, $M = 1000$.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Тернопільська регіональна державна лабораторія державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2023р, 5 екземплярів.

7. **Результати впровадження:** Соціальний характер розробки полягає у постійному контролюванні безпечної для споживачів концентрації естрогенного гормону та у разі виявлення перевищення встановлених

показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

8. Відповідальні за впровадження:

від розробника

Галина КОЧЕТОВА, аспірант кафедри
ветеринарно-санітарного інспектування
Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького



від лабораторії

Марія СТЕПАНЮК, в.о. директора
Тернопільської регіональної державної
лабораторії державної служби України з
питань безпеки харчових продуктів та
захисту споживачів



« 09 » серпня 2023 р.

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ
С.З.ГЖИЦЬКОГО**

**Методичні рекомендації
Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за
вмістом 17β -естрадіолу**

Львів – 2023

УДК 637.074

Науково-практичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Вченою радою Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького (протокол № 5 від 29 червня 2023 р.).

У методичних рекомендаціях «Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу», розроблено та запропоновано методологію визначення гранично допустимої концентрації 17β -естрадіолу у молоці-сировині при прийманні на переробку та запропоновано інтерпретацію отриманих кількісних значень: $n = 3$, $c = 2$, $m = 500$, $M = 1000$. Це дозволяє постійно контролювати безпечну для споживачів концентрацію естрогенного гормону та у разі виявлення перевищення встановлених показників застосувати превентивні заходи, як щодо вже отриманого молока, так і до виробників.

Розробники:

В.З. Салата, Г.С. Кочетова, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького

М.Д. Кухтин, Тернопільський національний технічний університет ім. І. Пулюя

Рецензенти:

Гутий Б.В. – доктор ветеринарних наук, професор, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького

Горюк Ю.В. – кандидат ветеринарних наук, доцент, Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Степанюк М.В. – в.о. директора Тернопільської регіональної державної лабораторії державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів.

Салата В.З., Кочетова Г.С., Кухтин М.Д. Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу: методичні рекомендації. Львів, ЛНУВМБ. 2023. 25 с.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів науково-дослідних установ, господарств-виробників молока-сировини, молокопереробних підприємств, фахівців державної служби ветеринарної медицини, що здійснюють контроль молока-сировини, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

© ЛНУВМБ, 2023

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті у закордонних виданнях, які проіндексовані у базі даних****Web of Science Core Collection та/ або Scopus:**

1. Kukhtyn, M., Salata, V., Kochetova, H., Malimon, Z., Miahka, K., Horiuk, Y., Pokotylo, O. (2022). Content of 17 β -Estradiol in Raw Milk in Ukraine. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 28 (6), 673–679.
2. Kochetova, H. S., Kukhtyn, M. D., Salata, V. Z., Horiuk, Y. V., Kladnytska, L. V., & Matviishyn, T. S. (2023). Dynamics of 17 β -estradiol under influence of technological operations during production of dairy products. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 14(1), 48–54.

Статті у фахових наукових виданнях України:

3. Salata, V., & Kochetova, H. (2022). The Study of the 17 β -estradiol content in raw milk during the lactation period. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 24(105), 44–49.
4. Кухтин, М., Салата, В., Кочетова, Г., Болтик, Н., Перкій, Ю., & Малімон, З. (2022). Оцінка молока і молочних продуктів за вмістом 17 β -естрадіолу. *Вісник аграрної науки*, 100(6), 30–37.
5. Kochetova, H., Salata, V., Kukhtyn, M., Zghozinska, O., & Melnyk, V. (2023). Toxicological characteristics of raw milk with different contents of 17 β -estradiol. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 25(109), 19–25.
6. Кочетова, Г. С., Салата, В. З., Кухтин, М. Д., Горюк, Ю. В., & Рогальський, І. О. (2023). Оцінка молока-сировини за вмістом 17 β -естрадіолу. *Подільський вісник: ветеринарна медицина, сільське господарство, техніка, економіка*, (38), 216–222.

Методичні рекомендації:

7. Салата В.З., Кочетова Г.С., Кухтин М.Д. Оцінка безпечності молока-сировини при прийманні на переробку за вмістом 17β -естрадіолу: *методичні рекомендації*. Львів, ЛНУВМБ. 2023. 25 с.

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

8. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З. (2021). Гормональні препарати в харчових продуктах та їх вплив на здоров'я населення. Матеріали II конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові». (м. Львів, 18–19 листопада 2021 р.), *Львів: СПОЛОМ*, 82.

9. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2022). Оцінка молока коров'ячого незбираного за вмістом 17β -естрадіолу. Матеріали щорічної науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин.». (м. Київ, 21 липня 2022 р.). *Київ: Компринт*, 8.

10. **Кочетова Г. С.,** Салата В. С., Кухтин, М. Д. (2023). Зміна 17β -естрадіолу за впливу різних технологічних операцій виробництва молочних продуктів. Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.), *ЛНУВМБ*, 29–30.

11. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2023). Дослідження 17β -естрадіолу у молоці. Матеріали II Міжнародної науково-технічної конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (м. Тернопіль, 24–25 травня 2023 р.), *ТНТУ*, 50.

12. **Кочетова Г. С.,** Салата В. З., Кухтин М. Д. (2023). Дослідження 17β -естрадіолу у молочних продуктах. Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції

«Стан та перспективи харчової науки та промисловості» (м. Тернопіль, 28–29 вересня 2023 р.), *ТНТУ*, 115.