

Szarvasmarhatartó telepen alkalmazott ivarzásindukáló hormonok megjelenése a hígtrágyában

^{1,2*}GUBÓ Eduárd, ¹MOLNÁR Tibor, ¹SAKÁL Pál, ^{1,2}PORDÁN-HÁBER Dóra,
^{3,4}BEDE-FAZEKAS Ákos, ^{1,5}PLUTZER Judit

¹Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, Magyarország; ²reAgro Kutató és Fejlesztő Kft. Győrújbarát, Magyarország; ³Ökológiai Kutatóközpont, Ökológiai és Botanikai Intézet, Vácrátót, Magyarország; ⁴Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Budapest, Magyarország; ⁵Nemzeti Népegészségügyi Központ, Budapest, Magyarország

(Beérkezett: 2022.01.26.; Elfogadva: 2022.05.25.)
(Online megjelent: 2022.06.16.)

Bevezetés

Az intenzív mezőgazdasági technológiák következtében az endokrinrendszert károsító vegyületek (Endocrine-Disrupting Chemicals; EDC) jelenléte a környezetünkben egyre nagyobb aggodalomra ad okot. Ezek a mikroszennyezők nagyon alacsony koncentrációban is káros hatással lehetnek az élő szervezetekre, a talajvízbe és a talajba kerülve pedig bejuthatnak a táplálékláncba, így az emberi egészségre is hatást gyakorolhatnak. A mezőgazdasági melléktermékek (istállótrágya, hígtrágya) nagy mennyiségű természetes és szintetikus hormont és különféle vegyi anyagokat (gyógyszereket, tisztító- és fertőtlenítőszerket) tartalmazhatnak, melyek gyakran ellenőrizetlenül kerülnek a mezőgazdasági területekre (LI et al., 2020). A szerves trágya mezőgazdasági területekre történő kijuttatása általánosan elfogadott gyakorlat a világban. Ennek eredményeként a szteroid ösztrogének (SE) könnyen bejuthatnak azokba a talajokba, melyek tápanyag utánpótlása szerves trágyázással vagy szennyvízzel való locsolással történik. Ezeknek a talajoknak az SE szintje így elérheti a több száz, de még a több ezer ng kg⁻¹-ot is (ZHANG et al., 2015; GUDDA et al., 2022). A gyógyszerek mobilitását, viselkedését a talajban a növények számára való elérhetőséget a talaj fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai, ill. a hatóanyagok fiziko-kémiai paraméterei határozzák meg (GWOREK et al., 2021). Ez potenciális kockázatot jelent a mezőgazdasági termelésre, ugyanis a talajba került gyógyszer-molekulák egy részét a növények felvehetik és különböző részeikben (gyökér, levél, szár, generatív termés) raktározhatják (GWOREK et al., 2021; ERDAL és DUMLUPINAR, 2011).

Akkor tekinthetünk egy vegyületet ösztrogénhatásúnak, ha akár alacsony affinitással is, de kötődni képes az ösztrogénreceptorokhoz (estrogen receptor; ER) és az ösztrogénérzékeny sejtekben, szövetekben biológiai hatást képes kiváltani. (BITTNER et al., 2014). A környezetünkben előforduló ösztrogének és ösztrogénszármazékok körülbelül 90%-a az állattenyésztésből származik (HE et al.,

*Levelező szerző: GUBÓ EDUÁRD, Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2., Magyarország
E-mail: gubo.eduard@gmail.com

2019). Az Európai Unió és az Egyesült Államok állatállományának éves ösztrogénkibocsátása 83000 kg év^{-1} , ami az emberi kibocsátás több mint kétszerese (SHRESTHA et al., 1996; LAURENSEN et al., 2014). JOHNSON et al., (2006) becslése szerint egy tejelő tehén átlagosan $384 \text{ mg } 17\beta\text{-ösztradiolt (E2)}$ juttat naponta a környezetébe csupán a vizelettel és a széklettel, míg egy vemhes koca $700\text{--}17000 \text{ mg}$ ösztrot (E1) üríthet a vizelettel napi szinten. HE et al. (2019) szerint az antibiotikumok és az ösztrogének egyidejű előfordulása a trágyában nagyobb ökológiai kockázatot jelent, mint egyedülálló szennyezőként, ugyanis az antibiotikumok fokozhatják az ösztrogének perzisztenciáját. Az élő szervezetek által természetesen termelt ösztrogének kivül (endoösztrogének) sokféle szerves és szervetlen molekula létezik, amelyek képesek felismerni az ösztrogénreceptorok ligandumkötő doménjeit (FAROOQ, 2015), ezek a fitoösztrogének, a xenoösztrogének, a szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok (Selective Estrogen Receptor Modulator SERM) és a metalloösztrogének (FUENTES és SILVEYRA, 2019). Az endoösztrogének olyan szteroid vegyületek, melyeket a férfi és női ivarmirigyek, ill. más szervek koleszterinből állítanak elő pl.: esztron, $17\beta\text{-estradiol}$, esztriol, ösztretol (FAROOQ, 2015). Ezzel szemben a fitoösztrogéneket növények termelik, főbb csoportjai az izoflavonok, kumesztánok, lignánok (BASU és MAIER, 2018). A xenoösztrogének szintetikus kémiai vegyületek, melyek ösztrogénhatással rendelkeznek, ilyenek a gyógyhatású készítmények, gyógyszerek, élelmiszer-adalékanyagok, kozmetikumok, környezetbe kikerülő peszticidek és ipari vegyszerek. Az olyan gyógyszereket, mint a dietil-stilbesztról (DES) és az etinilösztradiol (EE2) kifejezetten endoösztrogének utánzására szintetizálták és széles körben alkalmazták nők számos betegségének a kezelésére (GENNARI et al., 2007). Később derült ki, hogy ezek a vegyületek befolyásolhatják a sejtes és molekuláris folyamatokat és súlyos egészségkárosodást okozhatnak (IORGA et al., 2017). A SERM-ek funkcionális kettőséget mutatnak és képesek az ösztrogénreceptorok agonistáiként és antagonistáiként is hatni különböző szövetekben (MARTINKOVICH et al., 2014). Metalloösztrogéneknek nevezzük azokat a fémes jellegű ionokat és oxidokat, melyek ösztrogénaktivitást mutatnak, mint például alumínium (Al^{3+}), kadmium (Cd^{2+}), higany (Hg^{2+}), arzenit (AsO_3^{3-}), szelenit (SeO_3^{2-}), vanadát (VO_4^{3-}). Ezek a fémek képesek koordinálódni a nukleáris ösztrogénreceptorok ligandumkötő doménjében lévő specifikus aminosav-maradékokhoz, így nem-kompetitív módon blokkolják az ösztradiol kötődését (STOICA et al., 2000).

Számos tanulmány foglalkozott már világszerte a szteroidhormonok előfordulásával a környezetünkben. Ezek a tanulmányok elsősorban a vízi környezetben vagy a szennyvíztisztító telepeken található ösztrogénekre összpontosítanak (DU et al., 2020). A szteroidhormonok különféle kibocsátási útvonalakon juthatnak a vízi környezetbe: az emberi (városi és vidéki) és az állattenyésztésből (nagyüzemi, intenzív tartás és kisebb, extenzív tartás) származó tisztított és kezeletlen szennyvíz, istállótrágya és hígtrágya kijuttatásával (LIN et al., 2020; ZHONG et al., 2021).

Az intenzív tejelő szarvasmarhatartásban felhasznált ivarzásindukáló hormonkészítmények kimutathatósága és bomlása a hígtrágyában eddig nem vizsgált

terület, ezért kutatásunkban erre helyeztük a hangsúlyt. Egy Pest megyei szarvasmarhatelepen használt 5 különböző ivarzásindukáló gyógyszer sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a hígrágyában való megjelenéséig. A tanulmány során áttekintettük a telepen felhasznált ivarzásindukáló gyógyszereket 2017-től 2020-ig. Szintén 2017-től minden évben negyedéves ciklusokban, évszakonként vizsgáltuk meg a telepen keletkezett hígrágya hormonhatását. Külön teszteltük a telepen alkalmazott hormonkészítmények ösztrogénaktivitását is. Az eredmények statisztikai értékelésével (Pearson-féle korreláció és főkomponens-elemzés (Principal Component Analysis; PCA)) az ivarzásindukálók felhasználása, a telep szaporodásbiológiája és a hígrágya ösztrogénhatása közötti összefüggéseket tártuk fel.

Anyag és módszer

A vizsgált szarvasmarha telep leírása

A vizsgált telep Pest megyében található, az állatállomány mérete átlagosan 2500 db, melyből 1600 fejőstehén, a többi pedig szárazon álló tehén, üsző és borjú. Napi szinten 5–10 ellés történik, a szaporulat minimum 40 napig tartózkodik a telepen. Az állatok etetése napi 2 alkalommal, Faresin Telehandler 2600 típusú etetőkocsival zajlik, ahol a csoportos komplett takarmányozást (Total Mixed Ration; TMR) a takarmányozási mérnök receptúrái alapján állítják össze. A telep zömében hígrágyás kialakítású. A lagúna gyűjtő része egy előülepítő medencébe folyik, ahonnan egy nagy teljesítményű szivattyú a nagy tározó medencébe juttatja a hígrágyát. Évente 70 000 köbméter hígrágya keletkezik a telepen, melynek kilocsolása időszakosan történik, amikor rendelkezésre áll szabad földterület erre a célra.

A telepen alkalmazott szaporítási protokoll

A szarvasmarha-reprodukción közvetett és közvetlen módon sokféle hormon szabályozza. Közvetlenül hat a szaporodásra a hipotalamuszból kiválasztódó gonadotropinfelszabadító hormon (Gonadotropin-releasing hormone; GnRH), az agyalapi mirigyből kiválasztódó follikulusstimuláló hormon (Follicle-stimulating hormone; FSH) és a luteinizáló hormon (Luteinizing hormone; LH), a tüszőkből kiválasztott ösztrogének, a sárgatestből kiválasztódó progeszteron, valamint a méh belsejében lévő endometriumból felszabaduló prosztaglandin (Prostaglandin F₂ alpha; PGF₂α). Az összes felsorolt hormonnak külön szerepe van és hatással vannak a többi hormontra a tehén teljes reprodukciós ciklusa során (SAMMAD et al., 2019).

A tejhasznú szarvasmarha-állományokban egyre gyakoribb a fel nem ismert ivarzás, ezért célirányos tenyésztési programokat alkalmaznak. Az egyik ilyen módszer a PGF₂α alkalmazásán alapul. Lényege, hogy olyan eljárást alakítsanak ki, melynek segítségével meghatározott időpontban, az ivarzás észlelése nélkül, „vakon” lehessen termékenyíteni. Ezeknél az időhöz kötött termékenyítéseknél az ivari ciklusba kell hatékonyan beavatkozni, erre a tüszőfejlődés idején vagy a sárgatestfázisban van lehetőség. A ciklus szinkronizálására prosztaglandin-, progeszteron-, ösztrogén- és gonadotropin- (GnRH-) felszabadító hormonkészítmények alkalmasak. Európában az ösztrogénkezelés tiltott, a

gesztagénkészítmények (szintetikus progeszteron, implantátumok) alkalmazása kissé bonyolult és drága, ezért a tüszőnövekedés és fejlődés befolyásolására elsősorban GnRH-készítményeket használnak (GÁBOR et al., 2004; RICCI et al., 2020).

2017 és 2018 első félévében OvSynch protokollt alkalmazott a telep. Ez a program nevezhető a szaporodásbiológia alaprogramjának. 2018 második felétől a dupla OvSynch protokollt vezették be, mely két OvSynch protokollon halad keresztül hét nap különbséggel és a második protokoll után történik a termékenyítés. Ez utóbbi esetben minden meghatározott időben történik, nincs szükség szubjektív döntésre az inszeminálás során, viszont precizitást igényel (DIRANDEH et al., 2015; NOWICKI et al., 2017).

A vizsgált gyógyszerkészítmények leírása

A tehének tejtermelése ellés után indul meg, a sikeres tejtermeléshez tehát szükséges a sikeres vemhesülés is. Nagyüzemileg ezt intramuszkulárisan adott hormoninjekciók felhasználásával segítik elő és programozzák. Kutatásunkban 5 különböző gyógyszert vizsgáltunk, melyeket szaporodásbiológiai céllal használnak. Jellemző felhasználási területek az ivarzás és peteleválás (ovuláció) kiváltása és szinkronizálása, ellés megindítása, belső gyulladás (pyometra) kezelése stb.

Ovarelin: tartalmaz 0,050 mg ml⁻¹ D-Phe6-gonadorelint (diacetát-tetrahidrát formájában) és 15 mg ml⁻¹ benzil-alkoholt (E1519). Gyártó: Ceva Sante Animale, Franciaország. Célállatfajok: szarvasmarha (tehén, üsző). Adagolása 2 ml készítmény/állat. Élelmezés-egészségügyi várakozási ideje (ÉVI) hús és tej esetében 0 nap.

Gonavet: tartalmaz 0,050 mg ml⁻¹ D-Phe6-gonadorelint és 1 mg ml⁻¹ klórkrezolt. Gyártó: Veyx-Pharma GmbH, Németország. Célállatfaj: szarvasmarha, sertés, ló. Adagolása 2 ml készítmény/szarvasmarha, ÉVI: 0 nap.

PGF: tartalmaz 0,0875 mg ml⁻¹ kloprosztenolt, (megfelel 0,0092 mg ml⁻¹ kloprosztenol-nátriumnak) és 1 mg ml⁻¹ klórkrezolt. Gyártó: Veyx-Pharma GmbH, Németország. Célállatfaj: szarvasmarha, sertés. Adagolása üsző, tehén esetében 5,7 ml készítmény állatonként. ÉVI: ehető szövetek esetén 2 nap, tej esetén 0 óra.

Alfaglandin: tartalmaz 0,250 mg ml⁻¹ kloprosztenolt (kloprosztenol-nátrium formában), és 1 mg ml⁻¹ klórkrezolt. Gyártó: Alfasan Nederland BV, Hollandia. Célállatfaj: szarvasmarha. Adagolása 2 ml készítmény állatonként. ÉVI: hús és egyéb ehető szövetek esetén 1 nap, tej esetén 0 nap.

Dinolytic: tartalmaz 5 mg ml⁻¹ dinoproszt (dinoproszt-trometamin formában) és 16,5 mg ml⁻¹ benzil-alkoholt. Gyártó: Zoetis Belgium SA, Belgium. Célállatfajta: ló, sertés és szarvasmarha. Adagolása 5 ml készítmény állatonként. ÉVI: hús és ehető szövetek esetén 1 nap, tej esetén 0 nap.

Hígrágya-mintavételi időpontok és a mintavétel

2017-től 2020-ig minden negyedévben, évszakonként vettünk mintát a telepen lévő nagy hígrágya-tározó medencéből, mely a telepen keletkezett hígrágyát tartalmazta. A mintáinkat mindig egyszer használatos, steril polipropilén 50 ml-es centrifugacsövekbe vettük, melyek DNáz-, RNáz-, endotoxin- és fémmmentesek, -80 °C-ig fagyaszthatók, vegyszereknek ellenállóak. A mintavétel során nem

használtunk egyéb műanyag kellékeket. Minden mintavételnél 4 db 50 ml-es centrifugacsövet töltöttünk meg a 14000 m³-es hígrágyatározó 4 sarkából, melyeket összekevertünk, ezután a mintákat 4 °C-ra hűtőszekrénybe helyeztük, és a mintavételtől számított 1–3 napon belül feldolgoztuk.

Hígrágyaminták előkészítése az ösztrogénhatás vizsgálatához

A mintákat tartalmazó 50 ml-es centrifugacsöveket 20 percig, 4200 fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáltuk Heraus Megafuge 40R típusú centrifugával, melynek során a hígrágya folyékony és centrifugálható szilárd frakciója került szétválasztásra.

Centrifugálás után a felülúszó 30 ml híg folyadékból vontuk ki az ösztrogénhatású anyagokat szilárd fázisú extrakcióval (SPE). A szilárd fázisú extrakcióhoz OASIS HLB 6 cc 200 mg 30 µm szorbens/patront használtunk. Első lépésként az extraháló töltetet kondicionáltuk 8 ml metanolt és 8 ml víz-metanol 95:5 elegyével. Második lépésként 30 ml hígrágyát átfolyattunk a szűrőoszlopon. Harmadik lépésként pedig a vizsgálatunkat zavaró szennyezőanyagok eltávolítására egy oldószeres öblítést iktattunk be, mely 10 ml víz-metanol 1:1 és 10 ml víz-aceton 2:1 arányú elegyével történt. Egy percig száradni hagytuk a szűrőoszlopokat, majd 5 ml metanollal oldottuk le az ösztrogénhatású anyagokat. A kapott oldat készen állt az élesztőteszt elvégzésére, melyből a 96 lyukú lemez mélyedéseibe 10-10 µl-t mértünk.

A centrifugálás után a csövek alján maradt iszapból 2-2 g-ot főzőpohárba mértünk és 10-10 ml metanolt adtunk hozzá. Ezután 30 °C-on ultrahangos mosásnak vetettük alá (JEKEN PS 40A 10L) 30 percig, majd 10 percig 2000-es fordulatszámon 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszó metanolos oldatból szintén 10-10 µl-t mértünk a 96 lyukú lemez mélyedéseibe.

Gyógyszerek előkészítése az ösztrogénhatás vizsgálatához

A gyógyszerekből 3 ml-t szállítottunk fecskendőkből a laboratóriumba. Minden gyógyszert bontatlan üvegből vettük. 20 µl; 10 µl; 5 µl, 1 µl; 0,5 µl; 0,1 µl gyógyszer mennyiséget hígítás nélkül mértük a vizsgálati lemezre.

Az élesztőteszt végrehajtása

Vizsgálatainkat az ISO 19040 (2018) szabvány szerint végeztük, mely a víz, szennyvíz és üledékek ösztrogénpotenciáljának meghatározására szolgál a *Saccharomyces cerevisiae* BJ 3505 genetikailag módosított élesztőtörzzsel. A módszert adaptáltuk a gyógyszermintáink és a hígrágyaminták tesztelésére. A YES (Yeast Estrogen Screen) egy riporter gén-analízis, mely a humán ösztrogénreceptor-alfa (hERα) aktiválódásának mérésére szolgál ösztrogénhatásokat kiváltó vegyületek jelenlétében. Ha az élesztőgomba ösztrogénnel vagy azzal homológ molekulával találkozik, β-galaktozidáz enzimet kezd termelni, melynek mennyiségét sárga színű szubsztrát (chlorophenolred-β-D-galactopyranoside, CPRG) hozzáadásával, majd a keletkező piros színű termék 580 nm-en történő mérésével számszerűsítettünk fotométer segítségével (Labsystems Multiskan MS; HONG, 2012). Az első napon tenyésztésnek indítottuk 5 ml növekedési tápoldatban az élesztőgombát, melyet 22 ± 1 órán keresztül 30 ± 1 °C hőmérsékleten állandó keverés mellett inkubáltuk. A

második napon a gyógyszerek különböző hígításaiból és a hígtrágyakivonatokból a fent megjelölt mennyiségeket kimértünk a 96 lyukú vizsgálati lemezre. Minden mintát négy-négy ismétlésben vizsgáltunk. Az első nap tenyésztésnek indított gombából 40 μ l-t mértünk a lemez összes sorára, kivéve a vak sorra, ugyanis az is egyfajta kontrollként szolgál a gomba növekedésének az ellenőrzésére (ugyanolyan kezelésben részesül, mint a többi vizsgálati felület, csak nem tartalmazza a teszt organizmust, azaz az élesztőt), majd az elkészült hígítási sort 30 °C-on 24 órán keresztül inkubáltuk PLO-EKO Aparatura típusú inkubátorban. A harmadik napon pipettával felkevertük a mintákat, és 620 nm-en megmértük fotométerrel a sejtsűrűséget, hogy lássuk, mennyire egyenletesen fejlődött a gombatorzs. Ezután 30 μ l-t átmértünk a mintáinkból egy új lemezre, majd 50 μ l Lac-Z reagenst adtunk hozzá, mely CPRG-t tartalmazott, és egy órán keresztül inkubáltuk. Egy óra elteltével újból fotométer segítségével lemértük a színváltozást 580 nm-en (PURVIS et al., 1991; ROUTLEDGE and SUMPTER, 1996).

Környezetünket számos forrásból szennyezik olyan anyagok, amelyek kötődni tudnak az emberi ösztrogén receptorokhoz (ARYA et al., 2020). Ezen vegyületek kémiai sokfélesége nagyon megnehezíti a vizsgálatukat, mivel különböző analitikai módszerek szükségesek kimutatásukhoz, így egy-egy minta igen részletes vizsgálata esetén sem lehet egyértelműen kizárni, hogy valamelyik vegyület észrevétlen marad. Ezt a problémát hidalják át a hormonhatású anyagok jelenlétét hatásoldalról vizsgáló módszerek, mint például az általunk alkalmazott élesztőteszt (JOBILING et al., 2009). Az *in vitro* élesztőteszt számos előnnyel rendelkezik más kimutatási rendszerekkel szemben, mint például az endogén szteroid hormon receptorok hiánya, és ebből következően az ösztrogén receptor (ER) és más receptorok közötti komplex kölcsönhatások hiánya, mely ez esetben nem válik zavaró tényezővé a teszt során (ROUTLEDGE és SUMPTER, 1996; PURVIS et al., 1991). Egy vegyi anyag ösztrogén potenciálját a 17 β -ösztradiol (E2) referenciavegyülethez viszonyított relatív hatékonyságaként fejezik ki. Ha a 17 β -ösztradiol (E2) hatékonysága 100%, például az etinil-ösztradiol (EE2) relatív hatékonysága 88,8%, a biszfenol A (BPA) pedig 0,005% (COLDHAM et al., 1997; ISO 19040, 2018).

Az élesztőteszt eredményének kiértékelése

A 620 nm-en mért sejtsűrűség- és az 580 nm-en mért színváltozásértékek alapján kiszámoltuk Microsoft Excel és MyAssays Desktop szoftverek segítségével az élesztőgomba relatív növekedését, az átlagos korrigált abszorbanciát, az indukciós hányadost, a mennyiségi meghatározás határát (Limit of Quantitation LOQ), a kimutatási határt (Limit of Detection LOD), a legalacsonyabb hatástalan hígítást (Lowest Ineffective dilutions LID). A vak sor ugyanolyan kezelésben részesül, mint a többi ismétlési sor, de nem tartalmaz teszt organizmust, azaz élesztőt. A pozitív kontrolhoz E2-t használtunk, mely által indukált válasz megfelelően reprodukálható és lehetővé teszi a mérési módszer kalibrálását. A negatív kontrol minden esetben desztillált víz volt. A standard görbe kalibrálását 4PL regressziómodellel végeztük (FINDLAY és DILLARD, 2007). Az E2-ösztradiol-ekvivalensek (Estradiol Equivalent EEQ) meghatározásához a mintakivonatok korrigált abszorbanciáját interpoláltuk a megfelelő ösztradiol standard görbe lineáris tartományában (HONG, 2012). A kapott

EEQ-koncentráció azt mutatja, hogy a minta ösztrogénaktivitása ekvivalens egy egyenlő koncentrációjú E2-oldat ösztrogénaktivitásával.

A korrigált abszorbanciát a következőképpen számoltuk:

$$A_c(i) = \frac{(A_{580}(i) - \bar{B}_{580}(i))}{(A_{620}(i) - \bar{B}_{620}(i))}$$

ahol,

$A_c(i)$ = Korrigált abszorbancia az (i) vizsgálathoz (mintahígítások, referenciahígítások, negatív kontroll, pozitív kontroll).

$A_{580}(i)$ = az abszorbancia 580 nm-en az (i) vizsgálathoz.

$\bar{B}_{580}(i)$ = az átlagos abszorbancia 580 nm-en az (i) vizsgálat vak mintái esetén

$A_{620}(i)$ = az abszorbancia 620 nm-en az (i) vizsgálathoz.

$\bar{B}_{620}(i)$ = az átlagos abszorbancia 620 nm-en az (i) vizsgálat vak mintái esetén

Az élesztőteszt mennyiségi meghatározásának legalacsonyabb értéke 1 ng l^{-1} E2, míg a kimutatási határ 27 pg l^{-1} volt. A teszt pontosságának és precizitásának meghatározásához 6 vizsgálati lemezen teszteltünk E2 standardot 2 ng l^{-1} és 500 ng l^{-1} közötti koncentrációban. A precizitás 84% feletti volt, ami azt jelenti, hogy megfelel az Ipari Útmutató- Bioanalitikus Módszer Validálás (CDER és CVM, 2018) követelményeinek. Azonban a pontosság a két legkisebb hígítás esetében nem érte el a 80% feletti értéket (2 ng l^{-1} 48,8%; $6,2 \text{ ng l}^{-1}$ 76%; $18,6 \text{ ng l}^{-1}$ 91,3%; $55,6 \text{ ng l}^{-1}$ 91%; $166,5 \text{ ng l}^{-1}$ 97,9%; 500 ng l^{-1} 98,3%) (95% konfidenciaszinten), így csak a $18,6$ és az 500 ng l^{-1} közötti koncentrációk felelnek meg a követelményeknek.

Eredmények statisztikai elemzésének módszertana

Kapcsolatot kerestünk a két válaszváltozó (folyékony hígtrágya és iszap ösztrogénhatása negyedévekre átlagolva, $\mu\text{g l}^{-1}$) és a negyedévekre összegzett háttérváltozók következő három csoportja között:

- 1) bejuttatott hatóanyagok mennyisége (mg) hatóanyagokként (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol, dinoproszt-trometamin) és összesítve;
- 2) kezelések száma gyógyszerenként (Ovarelin, PGF, Gonavet, Dinolytic, Alfaglandin) és összesítve;
- 3) kiegészítő háttérváltozók (termékenyítések száma, ellések száma, holtellések száma, vetélések száma).

Az $n = 16$ méretű adatsor elemzése során először az összes változó közötti korrelációs kapcsolatot Pearson-féle korrelációs együtthatóval számszerűsítettük. Ezután főkomponens-elemzést (Principal Component Analysis; PCA) végeztünk. A PCA során a két, ösztrogénhatást leíró válaszváltozót használtuk az ordinációs tér kifeszítésére, és erre a térre illesztettük a hatóanyagokat leíró háttérváltozókat permutációs módszerrel, melyben 1000 ismétlést alkalmaztunk. Az elemzéseket R statisztikai szoftverrel (R CORE TEAM, 2020) és annak "vegan" csomagjával (OKSANEN et al., 2020) végeztük.

1. táblázat
A higtrágya EEQ értékei negyedéves bontásban

	2017 ($\mu\text{g l}^{-1}$)		2018 ($\mu\text{g l}^{-1}$)		2019 ($\mu\text{g l}^{-1}$)		2020 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	
	Folyé- kony (1)	Iszap (2)	Folyé- kony (1)	Iszap (2)	Folyé- kony (1)	Iszap (2)	Folyé- kony (1)	Iszap (2)
1. n.év	139,2 ± 15,0	1337,0 ± 36,5	123,9 ± 9,3	1355,0 ± 37,5	137,2 ± 12,3	2745,0 ± 240,0	248,1 ± 15,7	2730,0 ± 195
2. n.év	61,7 ± 1,6	2555,5 ± 190,5	88,9 ± 2,0	1900,0 ± 37,5	156,5 ± 13,3	1990,0 ± 19,5	196,5 ± 9,7	3490,0 ± 205
3. n.év	19,3 ± 1,1	1415,0 ± 135,5	225,8 ± 19,9	4570,0 ± 250,5	193,1 ± 9,8	3200,0 ± 42,5	288,0 ± 20,3	6300,0 ± 245
4. n.év	19,6 ± 1,4	142,0 ± 8,0	213,8 ± 17,0	3970,0 ± 255,0	271,1 ± 15,0	4990,0 ± 85,0	373,0 ± 22,3	5325,0 ± 285
Éves átlag (3)	60,0	1362,4	163,1	2948,8	189,5	3231,3	276,4	4461,3

2. táblázat
A hormonhatású készítmények EEQ értékei

	Ovarelin	SD	PGF	SD	Gonavet	SD	Dinolytic	SD	Alfaglandin	SD
EEQ 20 μl	103,5	± 1,50	1099,5	± 4,65	469,5	± 3,10	127,5	± 1,71	1225,5	± 4,47
EEQ 10 μl	100,6	± 0,48	606,0	± 3,70	456,0	± 4,32	123,0	± 0,96	603,0	± 1,50
EEQ 5 μl	87,4	± 0,36	576,8	± 3,42	446,4	± 0,83	127,9	± 0,77	603,6	± 1,99
EEQ 1 μl	<LOD		1047,0	± 0,85	783,0	± 0,46	<LOD		516,0	± 0,59
EEQ 0,5 μl	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		732,0	± 0,58
Átlag (1)	9,72		83,23		53,87		12,61		73,6	

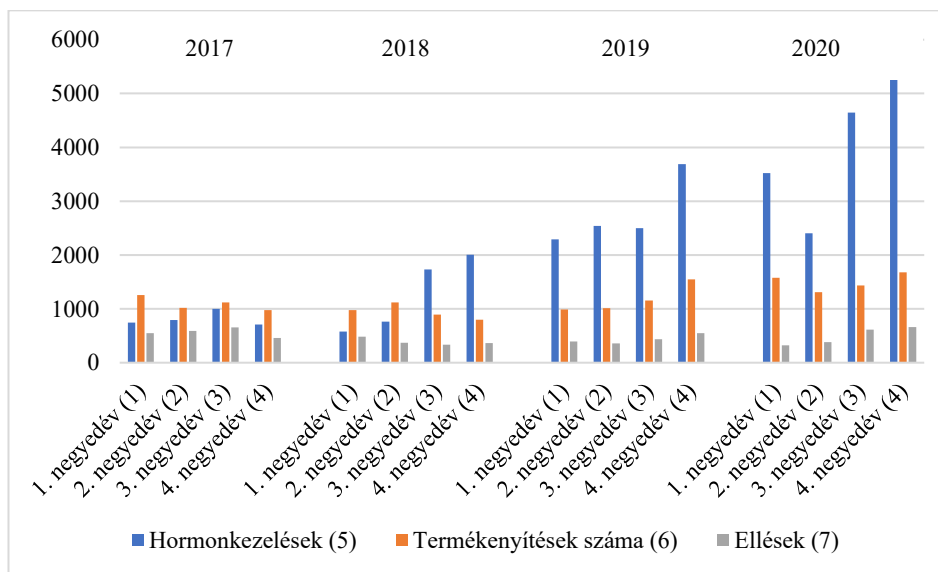
Eredmények

Hígrágya ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei

A 2017–2020 között végzett, negyedéves gyakoriságú méréseink szerint, melyet a hígrágya folyékony és iszaprézsére egyaránt elvégeztünk, jól láthatjuk, hogy 2017-től folyamatosan emelkedtek a hígrágya EEQ értékei (1. táblázat).

Gyógyszerhatóanyagok ösztrogénhatás-vizsgálatának eredményei

Kutatásunk során 5 db ivarzásindukálásra használt hormonkészítményt vizsgáltunk meg (Ovarelin, Gonavet, PGF, Alfaglandin, Dinolytic), 6 különböző térfogat bemérésével (20 µl; 10 µl; 5 µl; 1 µl; 0,5 µl; 0,1 µl). Az ösztrogénhatást a hat bemérésből kapott értékek átlaga adta. A 0,1 µl mennyiség volt az a legkisebb mennyiség, mely nem mutatott választ az élesztőteszt során. Az öt gyógyszerben három hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) található meg, ezeket a hatóanyagokat két kísérő vegyülettel (benzil-alkohol és klórkrezol) forgalmazzák. A 2. táblázatban látható, hogy bár egyik hormon sem tartozik az endoösztrogének csoportjába, mégis az élesztőteszt során mutattak ösztrogénhatást, mely arra utal, hogy kémiai szerkezetük miatt a humán ösztrogén receptorhoz (hER α) kötődni képesek.



1. ábra
Szaporodásbiológiai mutatók értékelése

Kloprosztenol hatóanyag ösztrogénhatása

A kloprosztenol hatóanyagot vizsgálva, az Alfaglandin gyógyszer 0,250 mg ml⁻¹ mennyiséget, míg a PGF gyógyszer 0,0092 mg ml⁻¹ mennyiséget tartalmazott. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a PGF (83,23 µg l⁻¹)

ösztrogénhatása magasabb volt, mint az Alfaglandiné ($73,6 \mu\text{g l}^{-1}$). Bár a $0,5 \mu\text{l}$ -es hígításban csak az Alfaglandin mutatott pozitív eredményt, azaz nagyobb hígításoknál is megmaradt az ösztrogénhatása.

D-Phe6-gonadorelin hatóanyag ösztrogénhatása

A *D-Phe6-gonadorelin* hatóanyagot vizsgálva, mely az Ovarelin és a Gonavet készítményekben található $0,050 \text{ mg ml}^{-1}$ mennyiségben, arra a következtetésre jutottunk, hogy a Gonavet ötször magasabb ösztrogénhatású ($53,87 \mu\text{g l}^{-1}$), mint az Ovarelin ($9,72 \mu\text{g l}^{-1}$). A két gyógyszer között csak a kísérőanyag típusában van különbség.

Dinoproszt-trometamin hatóanyag ösztrogénhatása

A *dinoproszt-trometamin* hatóanyag teszteléséhez egy készítmény, a Dinolytic ($12,61 \mu\text{g l}^{-1}$) gyógyszer állt rendelkezésünkre, mely 5 mg ml^{-1} mennyiségben tartalmazta azt. A kísérőanyag benzil-alkohol volt, és az eredmények értékei az Ovarelin értékeihez hasonlóak.

3. táblázat

Szaporodásbiológiai mutatók értékelése. A táblázat sorai a vizsgált paraméterek változásait tartalmazzák a vizsgálati évek (2017–2020) szerinti bontásban

Szaporodásbiológiai mutatók	2017	2018	2019	2020
átlagos laktációs napok száma ¹	194	193	162	183
átlagos szerviz periódus napok száma ²	145	127	116	120
átlagos termékenyítési index ³	2,37	2,21	2,07	2,47
első termékenyítés átlag nap ⁴	93	82	88	69
első termékenyítésre vemhes % átlag ⁵	41,22	47,29	37,97	32,08

¹a tehén tejtermelésben eltöltött napjainak a száma. ²az első termékenyítés és az eredményes vemhesülés között eltelt idő. ³hányadik termékenyítésre sikerült vemhesíteni az adott állatot. ⁴az ellés után történő első termékenyítésig eltelt napok száma átlagosan. ⁵az első sikeres termékenyítés százalékos átlaga.

A szaporodásbiológiai elemzés eredményei

A hormonkezelések, termékenyítések és az ellések számából (1. ábra) jól láthatjuk, hogy 2017-től folyamatosan emelkedett a hormonkezelések száma a telepen. 2018-ban pedig váltás történt a termékenyítési protokollban, melynek következtében megduplázódott a hormonhatású készítmények felhasználása. A legfontosabb szaporodásbiológiai mutatókat értékeltük a vizsgálati idő alatt (3. táblázat), melyek gazdasági szempontból mutatják be a telep eredményességét. Annak ellenére, hogy 2018 második felében protokollváltás (OvSynch → Dupla OvSynch) történt a telepen, nem minden mutató mozdult el pozitív irányban. Az első termékenyítés átlag nap 93-napról 69-re csökkent, viszont az első termékenyítésre vemhes állatok száma átlagosan 41,22 és 47,29 százalékról 32,08-ra csökkent. Az átlagos termékenyítési index a protokoll váltás után javuló tendenciát mutatott, de az

utolsó vizsgált évben voltak a legrosszabb eredmények. Az átlagos szerviz periódus napok száma (3. táblázat) és az átlagos laktációs napok száma csökkent, mely pozitív javulást jelent a telep számára. A szaporodásbiológiai mutatók eredményét számos tényező befolyásolhatja, például a termékenyítésre használt sperma minősége, éghajlati viszonyok, takarmányozás, az inszeminátorok munkájának a minősége.

Statisztikai elemzés eredményei

A két válaszváltozó, azaz a hígtrágya folyékony részének és az iszapnak a negyedévekre átlagolt ösztrogénhatása erősen összefügg ($r = 0,86$, $n = 16$, $p < 0,001$). A hígtrágya folyékony részének ösztrogénhatása erősebb kapcsolatot mutat a háttérváltozókkal, azaz a hatóanyagokkal, gyógyszerekkel, kiegészítő háttérváltozókkal, mint az iszapé.

A Pearson-féle korreláció alapján erős pozitív és szignifikáns ($p < 0,001$) összefüggést mutat a hígtrágya ösztrogénhatásával a dinoproszt ($r = 0,86$), a kloproszenol ($r = 0,83$) és a gonadorelin ($r = 0,75$) hatóanyag is. Az iszap ösztrogénhatásával való összefüggésük némiképp gyengébb és kevésbé is szignifikáns ($p < 0,01$), a korrelációs együtthatójuk rendre $0,81$, $0,72$ és $0,69$.

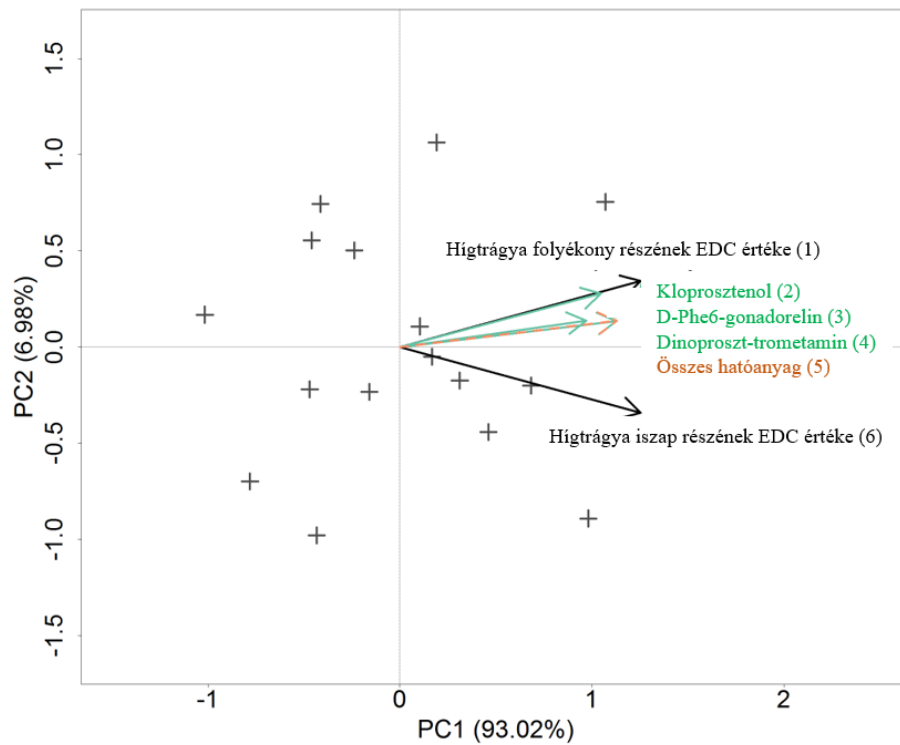
A gyógyszeres kezelések negyedéves összesített száma erős pozitív korrelációt mutat a hígtrágya ($r = 0,89$, $p < 0,001$) és az iszap ($r = 0,81$, $p < 0,001$) ösztrogénhatásával. Ennél egy fokkal gyengébb, de továbbra is erős pozitív összefüggést látunk hígtrágya ösztrogénhatása és a Dinolytic ($r = 0,86$, $p < 0,001$), Alfaglandin ($r = 0,79$, $p < 0,001$) és Gonavet ($r = 0,75$, $p < 0,001$) között, míg a PGF nem szignifikáns és semleges ($r = 0,08$, $p = 0,76$), az Ovarelin pedig negatív ($r = -0,61$, $p < 0,05$) korrelációt mutat. Az iszap ösztrogénhatásával való korrelációjuk alapján a gyógyszeres kezelések hasonló módon rendezhetők sorba, a korrelációs együtthatók rendre $0,81$ ($p < 0,001$), $0,68$ ($p < 0,01$), $0,67$ ($p < 0,01$), $0,10$ ($p = 0,70$) és $-0,55$ ($p < 0,05$).

A kiegészítő háttérváltozók közül az inszeminálás gyenge pozitív ($r = 0,64$), a holtelés ($r = -0,43$) és a vetelés ($r = -0,37$) gyenge negatív, míg az ellés semleges ($r = 0,04$) korrelációt mutatott a hígtrágya ösztrogénhatásával, melyek közül egyedül az inszeminálás korrelációja szignifikáns a $0,05$ -os szignifikanciaszinten. A kiegészítő háttérváltozók korrelációja az iszap ösztrogénhatásával hasonló képet mutat, az egyetlen marginális ($p = 0,07$) szignifikanciájú összefüggést az inszeminálással találtuk ($r = 0,47$).

A hatóanyagokra készített főkomponens-elemzés eredménye az 2. ábrán látható. Az ordináció a variancia jelentős részét, 93% -át egy főkomponensbe tudta sűríteni. E főkomponenstől csak némiképp fordul el az ordinációs teret kifesztítő, egymással erősen korreláló két válaszváltozó, vagyis a hígtrágya és az iszap ösztrogénhatása. A hatóanyagok mindegyike a hígtrágya ösztrogénhatása irányába mutat, közülük is a kloproszenol köthető leginkább a hígtrágyához az iszaphoz viszonyítva. A legkevésbé specifikusnak a dinoproszt, valamint a hatóanyagok összes mennyisége bizonyul.

2. ábra

Főkomponens elemzés (PCA): A két válaszváltozó által (hígtrágya folyékony és iszap része) létrehozott ordinációs tér és a háttérváltozók (hatóanyagok) láthatóak. A + az egyes mérési időpontokat jelöli, a nyilak iránya azt mutatja, hogy melyik főkomponenssel korrelál leginkább az adott változó, a nyíl hossza az összefüggés nagyságát látatja.



Eredmények és értékelésük

Kutatásunkban egy Pest megyei szarvasmarha telepen használt 5 különböző ivarzásindukáló gyógyszer sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a hígtrágyában való megjelenéséig. A tanulmány során áttekintettük a telepen alkalmazott ivarzásindukáló gyógyszerek felhasználását 2017-től 2020-ig és meghatároztuk az 5 gyógyszer ösztrogénhatását is. A hormonhatású anyagok toxikológiai kockázatértékelését bonyolítja egyrészt a többféle expozíciós út, másrészt a nem monoton dózis-válasz görbék, ahol a válaszok a dózistartományban nőnek és csökkennek is, vagy a keverékeken belüli vegyi anyagok közötti kölcsönhatások is megnehezítik az értékelést (JOBBLING et al., 2009).

JOBBLING et al. (2009) kimutatták, hogy a kémiai analitika és az élesztőteszt eredményei nem összehasonlíthatóak, és a minták ösztrogén aktivitása (EEQ) nem

korrelál jól az egyes szteroid ösztrogének mért analitikai koncentrációival. A korreláció hiánya a mintákban található antiösztrogén vegyületeknek tudható be, amelyek csökkentik az élesztővizsgálatban látható választ. Az élesztőteszt által kapott eredmények környezeti szempontból relevánsabbnak tekinthetők, mivel a vegyi anyagok közötti kölcsönhatások észlelhetők és ezért magasabb prediktív értékkel bírnak, amikor a lehetséges emberi egészség szempontjából fontos hatásokat mérni kell (JOBLING et al., 2009). Mi is ezért választottuk vizsgálatainkhoz az élesztőtesztet. Bár egyes hormonkészítmények ugyanazt a hatóanyagot tartalmazzák, mégis más ösztrogénaktivitást mutattak a kísérőanyagtól függően. Minél magasabb EEQ értéket kaptunk egy gyógyszerre, annál erősebb hormonhatása van az adott szernek. Fontos megemlíteni, hogy ezeket az értékeket a tényleges hatóanyag és az elvileg nem hormonhatású segédanyag együttes jelenléte esetén kaptuk. A két anyag együttes jelenléte lehetővé teszi, hogy közöttük kémiai/biókémiai interakció (szinergizmus vagy antagonizmus) valósuljon meg. Ha a gyógyszerek összetételéből és adagolásából kiszámítjuk azok egyszeri dózisát és az eredményeket összevetjük a 2. táblázat adataival, akkor a következőket kapjuk: az Alfaglandin egyszeri dózisa 2 ml, amely tartalmaz 0,500 mg kloprosztenol-nátrium hatóanyagot és 2 mg klórkrezol segédanyagot; az EEQ érték 73,6 volt. Az azonos hatóanyagú PGF dózisa 5,7 ml, mely megfelel 0,05244 mg kloprosztenol-nátriumnak és 5,7 mg klórkrezolnak, míg EEQ értéke 83,23 volt. A táblázat adataival összevetve megállapítottuk, hogy a PGF háromszoros klórkrezoltartalma és a mintegy tizedannyi kloprosztenol-nátrium hatóanyag a hormonhatását szinerg módon úgy felerősítette, hogy nagyobb EEQ értéket kaptunk, mint az Alfaglandinra. Tehát egy alacsony hormon és magas szinerg segédanyag tartalmú injekció képes kiváltani azt a fiziológiai hatást (ovuláció, sikeres inszeminálás, várhatóan magasabb tejhozam), mint a magas hormon-, de nem szinerg segédanyag (benzil-alkohol) – tartalmú injekció. Az állat szervezetébe jutva az oltás a szinergiának megfelelően kifejti magas hormonhatását, magas hormontartalmat imitálva, ugyanakkor az állat szervezetében a fő- és segédanyag külön metabolizálódik, a szinerg hatás megszűnik, és a hígtrágyában már mint alacsony koncentrációjú hormonszennyezés jelentkezik. Hipotézisünket az is igazolja, hogy az eleve magas hormontartalmú Alfaglandin még nagyobb hígításban (0,5 µl) is megtartotta ösztrogénhatását, sőt ennél a bemérésnél csak az Alfaglandin mutatott pozitív ösztrogénhatást. Hipotézisünknek megfelel az Ovarelin és a Gonavet párosa is: mindkettő azonos hatóanyagot tartalmaz, azonos koncentrációban (0,050 mg l⁻¹ gonadorelin), azonban segédanyagaik eltérőek. EEQ értékeik között 5,54 szeres különbséget kaptunk, mert a klórkrezol segédanyag itt is szinerg módon erősítette a fő hatóanyag ösztrogénhatását. Bár dinoproszt hatóanyaggal mindössze egy készítmény állt rendelkezésre (Dinolytic), mégis indirekt módon, de ez is erősíti hipotézisünket, hiszen átlagos EEQ értéke mindössze 12,61 volt, jelezvén, hogy a benzil-alkohol segédanyag a viszonylag magas koncentráció ellenére sem lép szinergiába a dinoproszt hatóanyaggal. A fentiek alapján az a stratégiai javaslat fogalmazható meg a gyakorlat számára, hogy a rendelkezésre álló készítmények közül olyat érdemes választani, amely a fő hatóanyagtól függetlenül szinerg segédanyagot (klórkrezol) tartalmaz.

A vizsgált gyógyszerek a xenoösztrogének hatásmechanizmusa szerint mutattak ösztrogénhatást, ugyanis ha megnézzük a vizsgált vegyületeink szerkezeti képletét, hasonlóságot figyelhetünk meg az ösztrogéncsoport vegyületeivel. Az alkalmazott vegyületek egyes ligandumai kötődni tudnak a receptorok azon platformjaihoz, amelyek a valódi ösztrogének adekvát csoportjait kötnék meg. Ha a tradicionális kulcs-zár elmélethez hasonlítjuk az ösztrogének kötődését a receptorokhoz, akkor egy „álkulcs-zár” szituációval állunk szemben: kémiaileg más, de a kémiai szerkezetükben hasonló vegyületek váltanak ki hasonló biológiai hatást. Amikor mi ezeknek az anyagoknak az EEQ-értékeit mérjük, valójában ennek a folyamatnak a biokémiai leképeződését látjuk.

A gyógyszerek hatására különféle hormonális változások zajlanak le a kezelt állatoknál, mely a természetes eredetű hormonok kiválasztását célozza. A gyógyszer ürülése az állati szervezetből további ösztrogénterhelést jelent a környezetre. A vizsgált gyógyszereket nagy mennyiségben használják fel a telepen, melynek mennyiségeit a 1. ábra szemlélteti. A hormonkezelések számából és a termelésben résztvevő tehének egyedszámából láthatjuk, hogy 2017-ben 0,68 kezelés jutott egy tehénre, 2018-ban 1,02, 2019-ben 1,73 és 2020-ban már 2,2. Megállapítottuk, hogy 2017-től folyamatosan emelkedett a hormonkezelések száma, és ezzel arányosan a hígtrágya ösztrogéntartalma is emelkedni kezdett. Az első (2017) és utolsó (2020) vizsgált év között majdnem négyszeres EEQ-érték-emelkedés figyelhető meg a hígtrágyában.

Megállapítottuk, hogy a hígtrágya ösztrogénhatása és az iszap ösztrogénhatása erősen összefügg. A hígtrágya mégis szinte minden vizsgált paraméterrel erősebb korrelációt mutatott, vagyis az gyorsabban/közvetlenebb módon köthető a kijuttatott gyógyszerekhez. Mindhárom vizsgált hatóanyag erős összefüggést mutatott a hígtrágya/iszap ösztrogénhatásával. Szignifikáns összefüggést a kloprosztenol hatóanyag adott, mely az Alfaglandin és a PGF készítményekben volt. A gyógyszerek tesztelése során ez a két készítmény mutatta a legmagasabb ösztrogénhatást is. Szignifikanciát tekintve ezt követte a gonadorelin hatóanyag, mely szintén két készítményben volt, a Gonavet és Ovarelinben, majd a dinoproszt-trometamin hatóanyag, mely a harmadik legerősebb ösztrogénhatású anyag, mely a Dinolyticben volt jelen. Annak ellenére, hogy a hatóanyagok erősen korreláltak a hígtrágya ösztrogénhatásával, a gyógyszerek már nem. A hígtrágya ösztrogénhatásával erős pozitív korrelációt mutatott az Alfaglandin, kissé gyengébb, de szintén pozitív korrelációt mutatott a Gonavet és a Dinolytic is. A PGF semleges, míg az Ovarelin, mely a legkisebb ösztrogénhatást mutatta az élesztőteszt során, negatív korrelációt mutatott.

A holtellés és a vetelés negatív korrelációt mutat a hígtrágya/iszap ösztrogéntartalmával, azaz minél kisebb volt a hígtrágya ösztrogéntartalma, annál több volt a holtellés és vetelés.

Az inszeminálás, bár gyenge, de pozitív korrelációt mutatott a hígtrágyával. Elemzésünk szerint a PGF és az Ovarelinnel végzett kezelések száma nem vagy negatívan hatott a hígtrágya/iszap ösztrogénhatására, mely az eredmények fényében feltehető, hogy ezen gyógyszerekkel végzett kezelések kisebb veszélyt jelentenek a környezetre, ha később a hígtrágya felhasználásra kerül. Vizsgálataink azt igazolják,

hogy a mesterséges hormonkezelések ökológiai lábnyoma azzal csökkenthető, ha nem a tényleges, hanem a látszólagos hormonhatást növeljük meg.

A hagyományos szarvasmarhatartási technológiák gazdaságilag kevésbé kifizetődőek és az emberi igényeket sem elégítik ki teljes mértékben. Ezért az intenzív technológiák működése elképzelhetetlen az irányított hormonprogramok (Ovsynch, DuplaOvsynch) nélkül. Az intenzív technológiák ára, hogy a kijuttatott trágyában magasabb koncentrációban jelennek meg olyan anyagok (hormonok, antibiotikumok, különböző vegyi anyagok), melyek negatív hatással lehetnek a környezetükre.

A híztrágya egy olyan anyagnak tekinthető, melyet a szántóföldre történő kijuttatás előtt számos egyéb ok mellett a hormontartalma és gyógyszer tartalma miatt is új kezelési módszerekkel kell ártalmatlanítani, nemcsak környezetegészségügyi szempontból, hanem a humán egészségügyi kockázatok miatt is.

A témában nemzetközi szinten is kevés anyag áll rendelkezésre, ezért fontosnak tartjuk az ezirányú kutatásokat és a nagy tételben kivitelezhető, gazdaságos kinyerési eljárások kidolgozását.

Összefoglaló

A nemzetközi irodalmat is áttekintve azt találtuk, hogy az intenzív tejelő szarvasmarhatartásban felhasznált ivarzásindukáló hormonkészítmények mennyiségét és a híztrágyában való megjelenését még nem vizsgálták. Kutatásunkban egy Pest megyei szarvasmarhatelepen használt 5 különböző ivarzásindukáló gyógyszer (Alfaglandin, PGF, Dinolytic, Gonavet, Ovarelin) és ezen belül 3 hatóanyag (D-Phe6-gonadorelin, kloprosztenol és dinoproszt-trometamin) sorsát követtük nyomon a felhasználástól egészen a híztrágyában való megjelenéséig, 2017-től 2020-ig. A tanulmány során áttekintettük a gyógyszerfogyást, valamint minden évben negyedéves ciklusokban, évszakonként vizsgáltuk meg a telepen keletkezett híztrágya hormonhatását. Külön teszteltük a telepen alkalmazott hormonkészítmények hormonhatását is. Az ösztrogénhatás vizsgálatokhoz a humán ösztrogénreceptort tartalmazó élesztőtesztet alkalmaztuk az ISO 19040 szabvány alapján. Az eredmények statisztikai értékelésével (Pearson-féle korreláció és főkomponens-elemzés) az ivarzásindukálók felhasználása, a telep szaporodás-biológiája és a híztrágya ösztrogénhatása közötti összefüggéseket tártuk fel. Megállapítottuk, hogy a híztrágya és az iszap ösztrogénhatása erősen összefügg. Mindhárom vizsgált gyógyszerhatóanyag erős korrelációt mutatott a híztrágya/iszap ösztrogénhatásával. Vizsgálataink alátámasztják, hogy a híztrágya egy olyan anyag, melyet a szántóföldre történő kijuttatás előtt számos egyéb ok mellett a hormon- és gyógyszer tartalma miatt is új kezelési módszerekkel kell ártalmatlanítani, nemcsak környezetegészségügyi szempontból, hanem az egészségügyi kockázatok miatt is, valamint hogy a megfelelő gyógyszerválasztással a híztrágya hormonhatása redukálható.

Kulcsszavak: hígtrágya, EDC, ösztrogénhatás, hormonkészítmények, ivarzásindukálás

Köszönetnyilvánítás

A publikáció az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-II-SZE-18 és ÚNKP-21-3-II-SZE-6 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- ARYA, S., DWIVEDI, A. K., ALVARADO, L., KUPESIC-PLAVSIC, S., 2020. Exposure of U.S. population to endocrine disruptive chemicals (Parabens, Benzophenone-3, Bisphenol-A and Triclosan) and their associations with female infertility. *Environmental Pollution*. **265**. 114763.
- BASU, P., & MAIER, C., 2018. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomed Pharmacother*, **107**. 1648–1666.
- BITTNER, G.D., DENISON, M.S., YANG, CH.Z., STONER, M.A., HE, G., 2014. Chemicals having estrogenic activity can be released from some bisphenol a-free, hard and clear, thermoplastic resins. *Environmental Health*. **13**. 103.
- CDER, CVM, 2018. Bioanalytical Method Validation – Guidance for Industry. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Biopharmaceutics.
- COLDHAM, N. G., DAVE, M., SIVAPATHASUNDARAM, S., MCDONNELL, D. P., CONNOR, C., & SAUER, M. J., 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental Health Perspectives*. **105**. (7) 734–742.
- DIRANDEH, E., ROODBARI, A.R., COLAZO, M.G., 2015. Double-Ovsynch, compared with presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy cows. *Theriogenology*. **83**. (3) 438–443.
- DU, B., FAN, G., YU, W., YANG, S., ZHOU, J., LUO, J., 2020. Occurrence and risk assessment of steroid estrogens in environmental water samples: A five-year worldwide perspective. *Environmental Pollution*. **267**. 115405.
- ERDAL, S., DUMLUPINAR, R., 2011. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. **33**. 1011–1017.
- FAROOQ, A., 2015. Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **15**. (12) 1372–1384.
- FINDLAY, J. W. A., and DILLARD, R.F., 2007. “Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays.” *The AAPS Journal*. **9**. E260–E267.
- FUENTES, N., & SILVEYRA, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. **116**. 135–170.

- GÁBOR, G., TÓTH, F., SZÁSZ, F., PETRÓ, T., GYÖRKÖS, I., 2004. A két ellés közötti idő csökkentésének lehetőségei tejelő szarvasmarha-állományban. 2. Ivarzásindukciós és ovulációsinkronizálási eljárások. Magyar Állatorvosok Lapja. **126.** 658–663.
- GENNARI, L., MERLOTTI, D., VALLEGGI, F., MARTINI, G., & NUTI, R., 2007. Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development. *Drugs & Aging*. **24.** (5) 361–379.
- GUDDA, F.O., ATEIA, M., WAIGI, M.G., WANG, J., GAO, Y., 2022. Ecological and human health risks of manure-borne steroid estrogens: A 20-year global synthesis study. *Journal of Environmental Management*. **301.** 113708.
- GWOREK, B., KIJENSKA, M., WRZOSEK, J., GRANIEWKA, M., 2021. Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. *Water, Air, & Soil Pollution*. **232.** 145.
- HE, Y., WANG, T., SUN, F., WANG, L., JI, R., 2019. Effects of veterinary antibiotics on the fate and persistence of 17 β -estradiol in swine manure. *Journal of Hazardous Materials*. **375.** 198–205.
- HONG, L. T. A., 2012. The YES Assay as a Tool to Analyse Endocrine Disruptors in Different Matrices in Vietnam. Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) Lehr-und Forschungsbereich Pflanzenernährung der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn.
- IORGA, A., CUNNINGHAM, C.M., MOAZENI, S., RUFFENACH, G., UMAR, S., EGHBALI, M., 2017. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of Sex Differences*. **8.** (1) 33.
- ISO 19040-1:2018 Water Quality -- Determination of the Estrogenic Potential of Water and Waste Water -- Part 1: Yeast Estrogen Screen, *Saccharomyces Cerevisiae*. 2018.
- JOBLING, S., BURN, R. W., THORPE, K., WILLIAMS, R., & TYLER, C., 2009. Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers. *Environmental Health Perspectives*. **117.** (5) 797–802.
- JOHNSON, A.C., WILLIAMS, R.J., MATTHIESSEN, P., 2006. The potential steroid hormone contribution of farms animals to freshwaters the united kingdom as a case study. *Science of Total Environment*. **362.** 166–178.
- LAURENSEN, J. P., BLOOM, R. A., PAGE, S., SADRIEH, N., 2014. Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data. *The AAPS Journal*. **16.** (2) 299–310.
- LI, C., LI, Y., LI, X., MA, X., RU, S., QIU, T., LU, A., 2020. Veterinary antibiotics and estrogen hormones in manures from concentrated animal feedlots and their potential ecological risks. *Environmental Research*. **198.** 110463.
- LIN, C.Y., GONG, J., ZHOU, Y.S., CHEN, D.Y., CHEN, Y.H., YANG, J., LI, Q., WU, C.Q., TANG, H.M., 2020. Spatiotemporal distribution, source apportionment, and ecological risk of corticosteroids in the urbanized river system of Guangzhou, China. *Science of The Total Environment*. **706.** 135693.

- MARTINKOVICH, S., SHAH, D., PLANEY, S.L., ARNOTT, J.A., 2014. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clinical Interventions in Aging*. **9**. 1437–1452.
- NOWICKI, A., BARANSKI, W., BARYCZKA, A., JANOWSKI, T., 2017. OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds – an update. *Journal of Veterinary Research*. **61**. (3) 329–336.
- OKSANEN, J., BLANCHET, F.G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.M., SZOEC, E., WAGNER, H., 2020. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- PURVIS, I.J., CHOTAI, D., DYKES, C.W., LUBAHN, D.B., FRENCH, F.S., WILSON, E.M., HOBDEN, A.N., 1991. An Androgen-Inducible Expression System for *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gene*. **106**. 35–42.
- R CORE TEAM, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RICCI, A., LI, M., FRICKE, P.M., CABRERA, V.E., 2020. Short communication: Economic impact among 7 reproductive programs for lactating dairy cows, including a sensitivity analysis of the cost of hormonal treatments. *Journal of Dairy Science*. **103**. (6) 5654–5661.
- ROUTLEDGE, E.J., and SUMPTER, J.P., 1996. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen.
- SAMMAD, A., UMER, S., SHI, R., ZHU, H., ZHAO, X., WANG, Y., 2019. Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **104**. (4) 678–986.
- SHRESTHA, S.L., CASEY, F.X., HAKK, H., SMITH, D.J., PADMANABHAN, G., 2012. Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils. *Environmental Science & Technology*. **46**. 11047–11053
- STOICA, A., KATZENELLENBOGEN, B.S., MARTIN, M.B., 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Molecular Endocrinology*. **14**. (4) 545–553.
- ZHANG, F., XIE, Y., LI, X., WANG, D., YANG, L., NIE, Z., 2015. Accumulation of steroid hormones in soil and its adjacent aquatic environment from a typical intensive vegetable cultivation of North China. *Science of The Total Environment*. **538**. 423–430.
- ZHONG, R., ZOU, H., GAO, J., WANG, T., BU, Q., WANG, Z.-L., HU, M., WANG, Z., 2021. A critical review on the distribution and ecological risk assessment of steroid hormones in the environment in China. *Science of The Total Environment*. **786**. 147452.

Appearance of on-farm bovine reproductive hormones in the resulting slurry

^{1,2*}Eduárd GUBÓ, ¹Tibor MOLNÁR, ¹Pál SZAKÁL, ^{1,2}Dóra PORDÁN-HÁBER,
^{3,4}Ákos BEDE-FAZEKAS, ^{1,5}Judit PLUTZER

¹Faculty of Agricultural and Food Sciences, Széchenyi István University, Mosonmagyaróvár, Hungary; ²reAgro Research and Development Ltd. Győrújbarát, Hungary; ³Institute of Ecology and Botany, Centre for Ecological Research, Vácrátót, Hungary; ⁴Faculty of Sciences, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary; ⁵National Public Health Center, Budapest, Hungary

Summary

A review of the international literature also found that the amount and the presence in slurry of oestrus inducer hormone preparations used in intensive dairy cattle production has not been investigated. In our study, we followed the path of 5 different sex-inducing drugs (alfaglandin, PGF, dinolytic, gonavet, ovelin) including three active pharmaceutical ingredients (D-Phe6-Gonadorelin, Kloprosteno and Dinoprost-tromethamine) used in a cattle farm in Pest County from their use until their appearance in the slurry from 2017 to 2020. The study included a review of drug consumption and a seasonal analysis of the hormonal effects of slurry produced on the farm in quarterly cycles each year. We also tested separately the hormonal effects of the hormone preparations used on the farm. For the estrogenic effect tests, the yeast test with the human estrogenic receptor was used according to ISO 19040. Statistical evaluation of the results (Pearson correlation and Principal Component Analysis) was used to identify relationships between the use of sex inducers, the reproductive biology of the colony and the estrogenic effect of the slurry. We found that the estrogenic effects of slurry and sludge are strongly correlated. All three pharmaceuticals tested showed a strong correlation with the estrogenic effect of slurry/sludge. Our investigations confirm that slurry among other reasons due to its hormone and drug content shall be considered as a material that needs to be disposed of by new treatment methods before application to the field, because of its environmental and health risks.

Keywords: slurry, EDC, estrogenic effect, hormone preparations, oestrus induction

Tables and Figures

Figure 1 Evaluation of reproductive biological indicators; (1) 1. quarter of the year, (2) 2. quarter of the year, (3) 3. quarter of the year, (4) 4. quarter of the year, (5) number of hormone treatments, (6) number of inseminations, (7) number of calving.

Figure 2 Principal Component Analysis (PCA); (1) EDC value of the liquid part of the slurry, (2) cloprostenol, (3) D-Phe6-gonadoreline, (4) dinoprost tromethamine, (5) all active ingredients, (6) EDC value of the sludge part of the slurry.

Table 1 EEQ values for slurry on a quarterly basis; (1) liquid), (2) sludge), (3) yearly average)

Table 2 EEQ values for hormonal preparations (1) average)

Table 3 Evaluation of reproductive biological indicators; ¹average number of lactation days, ²average number of service period days, ³average fertility index, ⁴first fertilization average day, ⁵average % of first pregnancy.

Open Access statement. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited, a link to the CC License is provided, and changes - if any - are indicated. (SID_1)
