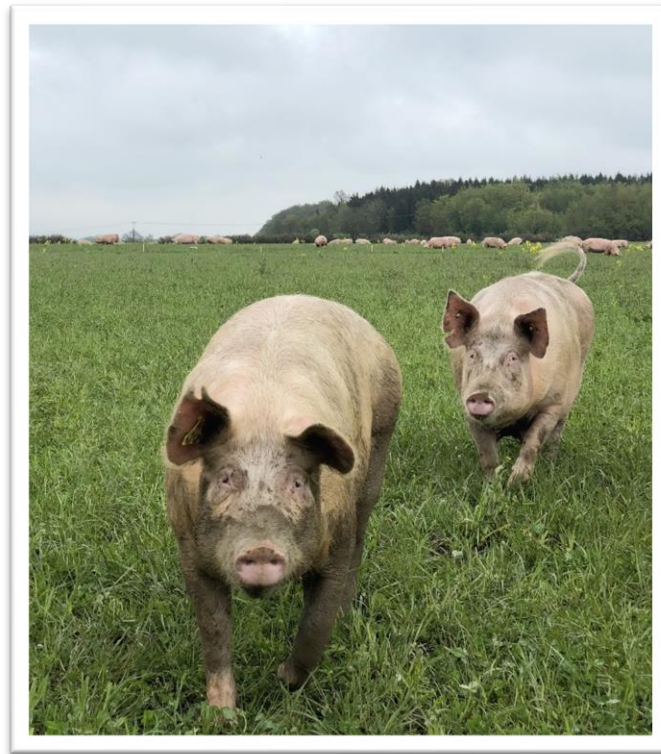




Fytoöstrogener i rödklöver och dess effekter hos grisar och idisslare

Phytoestrogens in red clover and its impact on pigs and ruminants



Desirée Kristiansson & Linda Larsson

Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institution för biosystem och teknologi
Lantmästare – kandidatprogram
Alnarp 2022

Fytoöstrogener i rödklöver och dess effekter hos grisar och idisslare
Phytoestrogens in red clover and its impact on pigs and ruminants

Desirée Kristiansson & Linda Larsson

Handledare: Magdalena Åkerfeldt, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Bitr. handledare: Emy Vu, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Torbjörn Lundh, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i Lantbruksvetenskap, G2E
Lantmästare - kandidatprogram

Kurskod: EX0885

Program/utbildning: Lantmästare - kandidatprogram

Kursansvarig inst.: Institution för biosystem och teknologi

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsår: 2022

Omslagsbild: Desirée Kristiansson

Nyckelord: Rödklöver, fitoöstrogener, reproduktion, idisslare, suggor

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Att ge grovfoder till grisar är positivt då det bidrar till sysselsättning och därmed minskad stress. Den grövre strukturen med fiber är bra för fodersmältningen och minskar därför även risken för magsår. Rödklöver är en bra komponent i vallen då den är kvävefixerande och har ett högt proteininnehåll, vilket gör den till ett bra inhemskt alternativ till den importerade sojan och därmed både ekonomiskt och miljömässigt hållbar.

I rödklöver finns fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A och genistein. Formononetin demetyleras i djurets fodersmältningssystem till daidzein som i sin tur metaboliseras till equol. Denna liknar djurens egna hormon östradiol och kan därför binda till östradiolreceptorerna och påverka reproduktionen. Det finns gedigen forskning som visar på att reproduktionen hos idisslare som kor och får påverkas negativt av rödklöver i stora mängder. Det finns pågående forskningsprojekt som undersöker hur enkelmagade djur som grisar påverkas av rödklöver då detta ännu inte finns så väl beskrivet.

Arbetet genomfördes delvis som en litteraturstudie som visade på att rödklöver kan ha både positiva och negativa effekter hos idisslare. Hos lamm ökar foderkonsumtion, proteinintag och tillväxt vid utfodring av rödklöver. Mjölkkor har visat sig ha större foderkonsumtion, högre mjölkavkastning och en mer önskvärd mjölksammansättning. Gemensamt för kor och får är att reproduktionen kan påverkas negativt vid stora intag av rödklöver. Detta visar sig som infertilitet, livmoderframfall, sämre dräktighet, fler abortioner, oregelbundna brunstcykler och ofullständig utveckling av livmoderhals som leder till svårigheter vid födsel.

Arbetet innebar utöver litteraturstudien att sammanställa data från en pågående forskningsstudie som undersöker hur mycket av fytoöstrogenerna som återfinns i träck och urin hos suggor som utfodrats med rödklöverensilage. Försöket pågick under fyra veckor för vardera grupp och provtagning skedde en gång i veckan. Proverna analyserades med kromatografisk teknik i en UHPLC-maskin som identifierade, kvantifierade och separerade östrogenerna i provet. Analysresultaten sammanställdes och jämfördes vecka för vecka på vardera ämne. Slutsatsen av sammanställningen var att fytoöstrogen och equol förekommer i högre halt hos försöksgruppen som utfodrats med rödklöverensilage jämfört med kontrollgruppen. Detta visar på att grisar har förmågan att producera equol, men hur detta i sin tur påverkar reproduktionen behövs det mer forskning på.

Nyckelord: Rödklöver, fytoöstrogen, reproduktion, idisslare, suggor

Abstract

Giving roughage to pigs is positive as it contributes to activation and thus reduces stress. The rough structure with fiber is good for feed digestion and therefore also reduces the risk of stomach ulcers. Red clover is a good component in the silage as it is nitrogen-fixing and has a high protein content and is therefore a good domestic alternative to the imported soy, thus both economically and environmentally sustainable.

Red clover contains the phytoestrogens formononetin, daidzein, biochanin A and genistein. Formononetin is demethylated in the animals' feed digestion system to daidzein, which in turn is metabolized to equol. This is similar to the animals' own hormone estradiol and can therefore bind to the estradiol receptors and affect reproduction. There is solid research that shows that the reproduction of ruminants such as cows and sheep is negatively affected by red clover in large quantities. There are ongoing research projects that investigate how monogastric animals such as pigs are affected by red clover as this is not yet so well described.

The work was carried out partly as a literature study which showed that red clover can have both positive and negative effects in ruminants. In lambs, feed consumption, protein intake and growth increase when feeding red clover. Dairy cows have been shown to have greater feed consumption, higher milk yield and a more desirable milk composition. Common for cows and sheep is that reproduction can be negatively affected by large intakes of red clover. This manifests as infertility, uterine prolapse, poorer pregnancy, more abortions, irregular heat cycles and incomplete development of the cervix leading to birth difficulties.

In addition to the literature study, the study involved compiling data from an ongoing research study that examines how much of the phytoestrogens are found in the feces and urine of sows fed red clover silage. The experiment lasted for four weeks for each group and sampling took place once a week. The samples were analyzed by chromatographic technique in a UHPLC machine that identifies, quantificate and separates the estrogens in the sample. The analysis results have been compiled and compared week by week on each hormone. The conclusion of the compilation is that phytoestrogens and equol occur in higher levels in the experimental group fed with red clover silage compared to the control group. This shows that pigs have the ability to produce equol, but how this in turn affects reproduction needs more research

Keywords: Red clover, phytoestrogens, reproduction, ruminants, sows

Förord

Lantmästare- kandidatprogram är en treårig universitetsutbildning vilken omfattar 180 högskolepoäng (hp). För att kunna bli antagen till utbildningen krävs dokumenterad arbetslivserfarenhet inom lantbruk. Studietiden avslutas genom att skriva ett självständigt arbete som presenteras genom en skriftlig rapport och en redovisning. Arbetsinsatsen ska motsvara minst 10 veckors heltidsstudier (15 hp) och kan utformas som en kvantitativ eller kvalitativ studie.

Vi som har gjort detta arbete har båda jobbat inom ekologisk grisproduktion där grovfoder är en del av foderstaten till samtliga grisar. Genom en gästföreläsning som handlade om pågående försök om grovfoder till gris blev vi intresserade och fick kontakt med Emy och Magdalena. Vi har fått ta del av data från deras projekt som utförts på SLU Lövsta forskningscentrum. Data från den studien har vi sammanställt och dessutom gjort en litteraturstudie över befintlig forskning på ämnet. Vi har även fått möjligheten att åka upp till Ultuna och Lövsta där vi fick vara med vid insamling och analysering av proverna.

Ett varmt tack riktas till vår handledare Magdalena Åkerfeldt och biträdande handledare Emy Vu som väglett oss genom arbetet. Vi vill tacka för att vi fick möjlighet att ta del av er stora kunskap och era forskningsresultat. Vi vill även tacka Jan-Eric Englund som hjälpt oss med sammanställning av statistiken.

Torbjörn Lundh har varit vår examinator.

Alnarp maj 2022

Desirée Kristiansson & Linda Larsson

Innehållsförteckning

1. Inledning	1
1.1 Relevans och mål	1
1.2 Syfte och frågeställning	1
2. Bakgrund	2
2.1 Idisslare	2
2.1.1 Näringsfysiologi och fodersmältning	2
2.2 Grisar	2
2.2.1 Övergripande om grisproduktion	2
2.2.2 Näringsfysiologi och fodersmältning	3
2.2.3 Sexual- och fortplantningsfunktioner	4
2.2.4 Hormoner som påverkar reproduktion	4
2.3 Rödklöver och fytoöstrogener	5
2.3.1 Fytoöstrogener i rödklöver	5
2.3.2 Omvandling av fytoöstrogener	6
3. Material och metod	7
3.1 Litteraturstudien	7
3.2 Försöket	7
3.2.1 Försöksdesign	7
3.2.2 Provhantering och kemiska analyser	8
3.2.3 Sammanställning och statistisk bearbetning av data	8
4. Resultat	9
4.1 Litteraturstudien	9
4.1.1 Effekter av fytoöstrogener hos idisslare	9
4.1.2 Effekter av fytoöstrogener hos grisar	10
4.2 Försöket	12
4.2.1 Innehåll i rödklöver	12
4.2.2 Innehåll i träck	12
4.2.3 Innehåll i urin	12
4.2.4 Innehåll av equol i träck och urin	13
5. Diskussion	13
6. Slutsats	15
Referenser	16
Bilagor	19
Bilaga 1. Fytoöstrogener i träck	19
Bilaga 2. Fytoöstrogener i urin	20

1. Inledning

1.1 Relevans och mål

Att ge grovfoder till grisar är positivt då det ger sysselsättning som minskar oönskade beteenden. Vid ekologisk grisproduktion är det krav på att alla grisar ska utfodras med någon sort av grovfoder vilket kan vara färskt gräs, torkat hö eller ensilage (Jordbruksverket 2021). Rödklöver är en av de vanligast förekommande baljväxterna i vallodling i Sverige. Det är en baljväxt med högt proteininnehåll som har förmågan att fixera luftens kväve med hjälp av bakterieknölar på rötterna, vilket betyder att den inte behöver gödslas med kväve. Detta är särskilt positivt vid ekologisk odling då handelsgödsel inte är tillåtet och vall därför är en viktig del av växtföljden (Jordbruksverket 2022b). På grund av rödklövers goda egenskaper och höga proteininnehåll är den intressant som ett inhemskt alternativ till proteinfodermedel i jämförelse till den importerade sojan.

I rödklöver finns fytoöstrogener som har en kemisk struktur som liknar djurens egna könshormoner. I djurets fodermältningsystem kan dessa fytoöstrogener omvandlas till metaboliten equol som liknar djurens egna hormon östradiol vilket kan påverka djuret genom att equol binder till östradiolreceptorerna. Hos idisslare som får och kor kan detta leda till reproduktionsstörningar (Hashem & Soltan 2016) men hur det ser ut hos gris finns det inte mycket forskning på. Målet med arbetet var därför att få en klarare bild över hur fytoöstrogenerna i rödklöver kan metaboliseras hos suggor. Målet var också att se hur det i sin tur kan påverka reproduktionen samt hur detta skiljer sig från idisslare.

1.2 Syfte och frågeställning

Detta arbete omfattar en litteraturgenomgång som genomfördes för att finna information om fytoöstrogener samt hur östrogena substanser påverkar fertiliteten hos grisar och idisslare. Arbetet innebar även att sammanställa resultat från en pågående forskningsstudie om rödklöverensilage i foder till suggor, med fokus på hur olika östrogena substanser kan påvisas i träck och urin.

Syftet var att se hur östrogena substanser påverkar fertiliteten hos grisar, samt att se om det föreligger några likheter eller skillnader mellan grisar och idisslare. Det var även att undersöka hur olika östrogena substanser kan påvisas i träck och urin hos suggor som utfodrats med rödklöver, samt om det är någon förändring mellan individer och över tid. Följande frågeställningar ingick i arbetet:

- Hur påverkas fertilitet och reproduktion av fytoöstrogener hos gris och idisslare?
- Hur metaboliseras fytoöstrogener och kan de påvisas i träck och urin hos suggor som äter rödklöverensilage?

2. Bakgrund

2.1 Idisslare

2.1.1 Näringsfysiologi och fodersmältning

Idisslare har tre förmagar (våmmen, nätmagen och bladmagen) och en magsäck (löpmagen). När idisslare äter tuggas maten slarvigt första gången och åker direkt ner i våmmen och nätmagen för att blandas med foder från tidigare foderintag. Fodret blandas där genom muskelsammandragningar och de grövsta partiklarna stöts upp för att tuggas om. De allra grövsta partiklarna kan komma att tuggas om flera gånger och det kan ta upp till fyra dygn innan fodret från ett foderintag har förts vidare från våmmen. I våmmen och nätmagen sker också den mikrobiella nedbrytningen av födoämnen med hjälp av våmfloran, som består av mängder av mikroorganismer som bakterier, svampar och protozoer. Dessa spjälkar protein och kväveföreningar och omvandlar dem till ammoniak. Kväve i form av ammoniak används av mikroorganismerna för att syntetisera mikrobiellt protein som kan utnyttjas av värdjuret. Värdjuret är helt beroende av mikroorganismerna och näringsämnena som de bildar, men även de bryts så småningom också ner. Det är tack vare mikroorganismerna som idisslare har möjligheten att leva på fiberrik föda som gräs och växtdelar. Mer fiberrikt foder leder till att det tar längre tid för idisslingen (Lärn-Nilsson et al. 1997).

Till den tredje förmagen, bladmagen, förs födan när den är tillräckligt finfördelad. Vattnet suggs upp genom väggarnas djupa veck och vidare förs sedan de torra foderresterna till löpmagen. Detta är den egentliga magsäcken och fungerar likt grisarnas. Foderresterna bearbetas där av saltsyra och enzymet pepsin, vilket är samma enzym som finns i magsaften hos grisar. Mikroorganismerna dödas av saltsyran i löpmagen. De spjälkas sedan i tunntarmen till aminosyror som tas upp i blodet, så kallat aminosyror absorberade i tunntarmen (AAT). Foderprotein som är hårdsmält och inte påverkas av våmfloran spjälkas även det till AAT i tarmen med hjälp av enzymer. Detta protein kallas våmstabil protein. De sista foderresterna bearbetas sedan i blind- och tjocktarm av bakteriefloran och en stor del av mikrobproteinet följer med träcken ut. (Lärn-Nilsson et al. 1997)

2.2 Grisar

2.2.1 Övergripande om grisproduktion

Grisar är flockdjur med strikt rangordning som synkroniseras av varandra och därför är det vanligaste sättet att bedriva grisproduktion genom så kallad omgångsuppfödning. Detta innebär att suggorna delas in i grupper och produktionen planeras så att de som ingår i samma grupp blir brunstiga, insemineras, grisar och avvänjer samtidigt (Lärn-Nilsson & Danielsson 2006).

Suggor är dräktiga i 115 dagar och då inhyses de i en sinavdelning, antingen i en stor ströbäddsbox eller mindre boxar med ströad liggyta. När suggorna ska grisa

flyttas hela gruppen in i ett grisningsstall, där de får varsin grisningsbox med åtskild liggplats åt smågrisarna (Rantzer et al. 2019). Smågrisarna får avvänjas vid 28 dagars ålder, men i vissa fall ges tillstånd att avvänja upp till 7 dagar tidigare om besättningen uppfyller en rad villkor (Jordbruksverket 2022a). Vid avvänjning flyttas suggorna ut i en betäckningsavdelning. De stimulerar varandra till brunst och blir seminerade 4 – 7 dagar efter avvänjning. Därefter flyttas de till sinavdelningen där de inhyses tills de ska grisa igen (Rantzer et al. 2019).

Enligt lag ska alla grisar ha tillgång till någon form av strömmaterial, som halm eller jämförbart material för att utföra sitt naturliga beteende att böka (Jordbruksverket 2022a). Vid ekologisk grisproduktion ska grisarna utöver den dagliga givan av strömmaterial och foder även få grovfoder som är antingen färskt, torkat eller ensilerat (Jordbruksverket 2021). Ett huvudproblem i modern hållning av dräktiga suggor är att det råder brist på sysselsättning. Detta kan leda till stress, som i sin tur kan ge negativa effekter på reproduktionen som infertilitet eller abortering. Grovfoder är en bra sysselsättning som förhindrar stress och stereotypiska beteenden och är därför bra att använda även i konventionella besättningar (Rantzer et al. 2019). Utöver detta bidrar grovfoder även till minskad risk för magsår, då den grövre strukturen med fiber är positiv för fodersmältningen (Gård och djurhälsan u.å.).

2.2.2 Näringsfysiologi och fodersmältning

Grisen är ett enkelmagat djur som kan tillgodogöra sig såväl animalisk som vegetabilisk föda. Fodret behöver brytas ned i mindre beståndsdelar för att näringsämnen ska bli tillgängliga för grisen, och detta görs både kemiskt och mekaniskt i fodersmältningssystemet. Fodersmältningsorganen kan betraktas som en kanal genom kroppen där substanser tillförs, nödvändiga ämnen tas upp genom väggen och det som inte kan tillgodogöras åker ut som träck. I munnen blöts födan upp och sönderdelas för att sedan föras vidare till magsäcken, där proteinet bryts ned med hjälp av enzymet pepsin. Födan förs därefter vidare till tunntarmen, där den huvudsakliga nedbrytningen sker med hjälp av matsmältning enzym från tarmslemhinnan och enzymer och bukspotts saft som utsöndras från bukspottkörteln. I tarmslemhinnan sker den sista nedbrytningen av kolhydrater och proteiner samt den huvudsakliga upptaget av näringsämnen. Tunntarmen är den längsta delen av mag- och tarmsystemet och för att underlätta upptaget ytterligare är den veckad på insidan och har rörliga utskott, så kallade villi och mikrovilli. Grovtarmen består av tre delar; tjocktarm, blindtarm och ändtarm. I grovtarmen sker en bakteriell aktivitet på föda som ännu inte brutits ned med hjälp av mikroorganismer som bildar flyktiga fettsyror. Dessa fettsyror kan grisen resorbera och utnyttja som energi och hos sinstuggor kan detta utgöra ca 20 – 30% av energiintaget (Rantzer et al. 2019). Osmält foder, mikroorganismer och avstötta celler från mag- och tarmkanalens insida samlas i ändtarmen och avges som träck. (Rantzer et al. 2019).

Hos grisar sker alltså den mikrobiella nedbrytningen inte förrän i grovtarmen. Det skiljer sig från idisslarna där den mikrobiella nedbrytningen av födoämnen sker redan i våmmen. Födan förs sedan vidare till resterande magar och inte förrän i tunntarmen tas det upp i blodet (Sjaastad et al. 2016). Endast en mycket liten andel av fytoöstrogenerna absorberas direkt från våmmen till blodomloppet. Majoriteten

konjugeras först ytterligare i resterande magar och endast en liten del konjugeras i levern vilket gör denna till ett mindre viktigt organ i processen för avgiftning av fytoöstrogener hos idisslare (Grgic et al. 2021). Detta resulterar i att mikrobiellt nedbrytbara födoämnen, inklusive fytoöstrogener, tas upp i större omfattning hos idisslare än hos grisar (Sjaastad et al. 2016).

2.2.3 Sexual- och fortplantningsfunktioner

Tiden då suggan tillåter parning kallas brunstperiod och suggan genomgår flera brunstcykler varje år. Under *förbrunsten* vätskefylls äggblåsorna, även kallade folliklarna, som byggs upp till mognad. I folliklarna produceras och utsöndras östrogen som styr förändringar och tillväxt i könsorganen. Livmodern förbereder sig för kommande tillväxt genom att öka blodförsörjningen. I slutet av perioden börjar körtlarna i livmoderväggen växa. Under *högrunsten* visar suggan att hon är parningsvillig genom ståreflex och ökad aktivitet. Förändringarna fortsätter med ökad intensitet och folliklarna brister så småningom. Tack vare de hormonella förändringarna så kommer ägglossningen, ovulationen igång. Under *efterbrunsten* utvecklas gulkroppen vid de brutna folliklarna. Hormonproduktionen går nu över från östrogen till progesteron, vilket förhindrar en ny brunst. Under *gulkroppssperioden* blir gulkroppen fullt utvuxen och producerar progesteron. Livmoderns körtlar börjar producera en vätska som försörjer embryot tills det implanteras i livmoderväggen. Om suggan inte skulle bli dräktig bryts gulkroppen ner och resorberas och brunstcykeln börjar om. (Rantzer et al. 2019)

2.2.4 Hormoner som påverkar reproduktion

Östrogen, follikelstimulerande hormon och luteiniserande hormon

Östrogen är en grupp hormoner som bildas i äggstocken, moderkakan, binjurebarken och i sertoliceller i testiklarna. En av östrogenets viktigaste uppgifter är att starta brunsten hos suggan, vilket krävs för att befruktning och sedan dräktighet ska ske. Det finns flera typer av östrogen i kroppen men det viktigaste är östradiol. Detta reglerar frisättande av gonadotropiner, vilka är hormoner som stimulerar könskörtelfunktioner. Exempel på gonadotropiner är follikelstimulerande hormon (FSH) och luteiniserande hormon (LH) (Sjaastad et al. 2016). FSH stimulerar tillväxten av folliklarna som innehåller äggcellen. Innan ägglossning ökar östrogenhalten (Figur 1) vilket även ökar halten av LH. Detta bidrar till ägglossning och bevarande av gulkroppen som är det som blir kvar av follikeln när ägget släppts. Vid låga halter av östrogen minskar LH, vilket leder till tillbakabildande av gulkroppen (Jönsson 2013). I samband med ägglossning är det LH som stimulerar gulkroppen att bilda progesteron (Sjaastad et al. 2016).

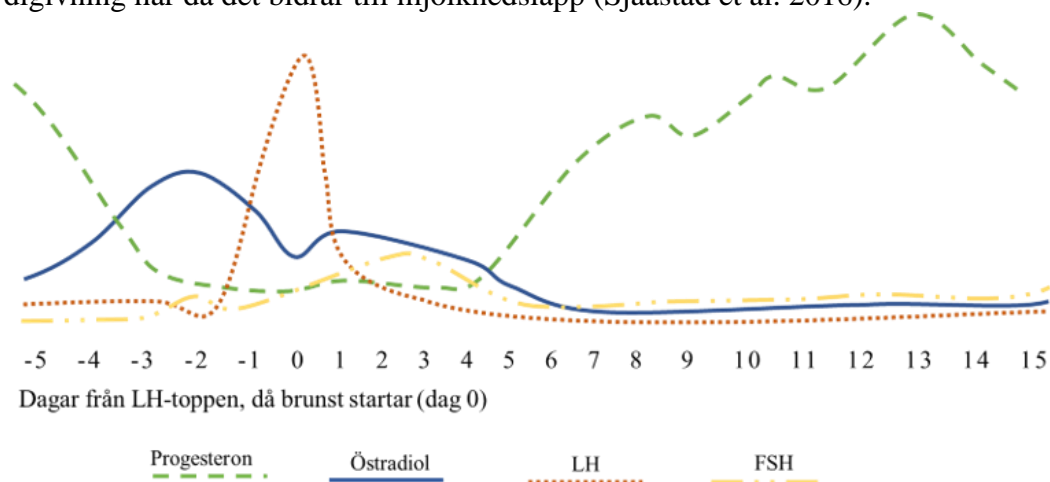
Progesteron

Progesteron bildas bland annat i gulkroppen i äggstockarna. Gulkroppen bildas av det som är kvar av follikeln efter ägglossningen, då äggcellen vandrat vidare till livmodern blir gulkroppen kvar i äggstocken. Om ägget inte blir befruktat kommer gulkroppen att brytas ned och progesteronhalten sjunka (Figur 1). Progesteronet har som huvuduppgift att bilda gynnsamma förhållanden för att fostret ska kunna utvecklas och kallas därför det dräktighetsbevarande hormonet. Progesteronhalten i blodet är hög under hela dräktigheten och det är detta som bidrar till att fostret

hålls kvar i kroppen och även förhindrar ny ägglossning. Vid slutet av dräktigheten minskar mängden progesteron, vilket bidrar till att kroppen ställer in sig på förlossning och i samband med detta höjs östrogenhalten (Sjaastad et al. 2016).

Oxytocin och prostaglandin

Oxytocin är ett hormon som hämmar progesteronet och gör att prostaglandin utsöndras om ett obefruktat ägg når livmodern. Prostaglandin gör att ägget stöts ut ur livmodern, detta händer då ägget är obefruktat. Det kan även ske vid rubbningar av hormonutsöndringen, som vid stress, vilket leder till abortering. Oxytocin har en viktig roll vid födseln och utstötandet av gulkroppen och genom att hämma progesteronet så möjliggör det en ny brunst. Oxytocin har en viktig roll även vid digivning har då det bidrar till mjölknedsläpp (Sjaastad et al. 2016).



Figur 1: Förändringar av progesteron, östradiol, LH och FSH under brunstcykeln hos gris. (Illustration av Linda Larsson efter Ehrenkrona 2017)

2.3 Rödklöver och fytoöstrogener

2.3.1 Fytoöstrogener i rödklöver

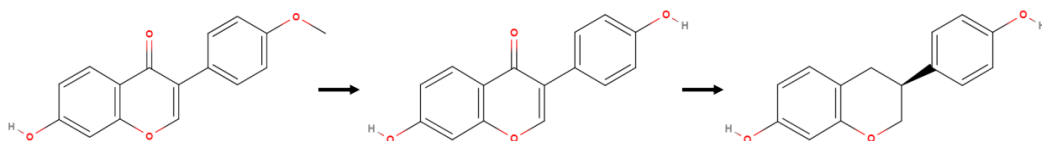
Rödklöver (*Trifolium pratense L.*) är en av de vanligast förekommande baljväxterna i vallodling. Den har en djupt gående pålrot som gör den torktålig. En bra egenskap hos rödklöver är det höga proteininnehållet, och det är främst i bladen som proteinhalten är hög. Eftersom rödklöver är en baljväxt kan den fixera luftens kväve med hjälp av kvävefixerande bakterier i rötterna, som lever i symbios med växten (Weidow 2000). Den höga kvävehalten gör att mjölksyran inte räcker till för att sänka pH vid ensilering. Det är därför extra viktigt med förtorkning och tillsatsmedel vid ensilering av rödklöver (Wilkins u.å.). Växten innehåller en rik mängd fytoöstrogener i form av isoflavoner. Fytoöstrogener är ett samlingsnamn för östrogenliknande ämnen som finns i växterna (Höjer et al. 2011), som kan orsaka reproduktionsstörningar hos djur. Rödklöver är den utav baljväxterna som innehåller mest fytoöstrogener och de viktigaste är formononetin, daidzein, biochanin A och genistein (Mustonen et al. 2014).

Den kemiska strukturen hos fytoöstrogener skiljer sig något från de kroppsegna östrogenerna men kommer så småningom metaboliseras till equol i kroppen, vilken

är den metabolit som har påverkan på reproduktionen (Sjaastad et al. 2016). Halten fytoöstrogener i rödklöver kan vara mellan 0,5 - 2,5% av växtens torrsbstans (TS) medan den i vitklöver endast är 0,02 - 0,06% av TS (Sarelli et al. 2003). Det är främst i bladen som halten av fytoöstrogener är hög, följt av stjälken och sist blommorna som innehåller lägst halt (Sivesind & Seguin 2005). Skördetidpunkten påverkar halten av fytoöstrogener i rödklöver, då ett tidigt skördat foder innehåller mer blad och därmed en högre halt av främst formononetin. Även lagringsmetod påverkar halten av fytoöstrogener i fodret, vid ensilering bevaras fytoöstrogenerna medan torkat hö kan ha upp till 70% lägre halt av fytoöstrogener (Lundh & Madej 2003). Enligt studier avgörs också koncentrationen fytoöstrogener av sortvalet (Sivesind & Seguin 2005). Det är främst halten av formononetin som påverkas av vilken sorts rödklöver som ingår i vallen (Bernes & Höjer 2013).

2.3.2 Omvandling av fytoöstrogener

Fytoöstrogener är lika kroppens egna östrogena substanser i den kemiska strukturen och det är främst fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A och genistein som finns i rödklöver (Setchell & Cassidy 1999). Den kemiska strukturen som liknar kroppens egna könshormoner gör att fytoöstrogener kan binda till samma receptorer och blockera eller inducera en reaktion som stör kroppens egna hormoner (Bernes & Höjer 2013). Studier visar att fytoöstrogener binder speciellt till östrogenreceptor β (Ren et al. 2001). I kroppen demetyleras formononetin till daidzein med hjälp av mikroorganismerna i mag- och tarmkanalen. Daidzein metaboliseras sedan till equol (Figur 2), vilken är den metabolit som är mest lik det kroppsegna östrogena ämnet östradiol. Equol kan därför binda till östrogenreceptorerna och ha en östrogen effekt (Setchell & Cassidy 1999; Grgic et al. 2021). Biochanin A kan omvandlas till genistein av mikrofloran i fodersmältningen, som sedan kan omvandlas till p-etylfenol vilken inte har samma stora inverkan som equol. Det krävs att mikrofloran i tarmarna har rätt sammansättning för att daidzein och genistein ska kunna omvandlas till equol eller p-etylfenol. Har mikrofloran inte rätt sammansättning behåller fytoöstrogenerna sin ursprungliga form och har inte någon direkt påverkan på djuret (Grgic et al. 2021).



Figur 2: Formononetin demetyleras till daidzein som metaboliseras till equol. (Illustration av Desirée Kristiansson efter Lundh 1995)

En stor del av fytoöstrogenerna konjugeras i levern till glukuronsyra och sulfat vilket huvudsakligen utsöndras via urin. Denna konjugering utgör den huvudsakliga avgiftningen av fytoöstrogenerna och om den inte kan ske skadas levern (Grgic et al. 2021). Konjugering och metabolisering av fytoöstrogener varierar mellan arter. Hos grisar är förmågan att bilda equol begränsad och skiljer sig mellan individer, medan alla idisslare kan bilda equol (Grgic et al. 2021). Hur mycket fytoöstrogener som tas upp av djuret varierar även mellan individer och beror bland annat på ålder och tarmmikroflora. Detta fenomen upptäcktes i en studie med råttor där det visade sig att de äldre hade producerat equol medan de

som var tre månader gamla inte hade producerat något equol (Sepehr et al. 2009). Detta beror på vilka bakteriearter som etablerar sig i tarmen under livstiden. Även fodrets sammansättning har en inverkan på ämnesomsättning och biotillgänglighet av fytoöstrogener. Det har visat sig att en högre andel kolhydrater och en lägre andel fett gynnar produktionen av equol (Rowland et al. 1999).

3. Material och metod

I arbetet ingick en litteraturstudie för att finna information om hur fytoöstrogener påverkar grisar och idisslare. Arbetet innefattade även att sammanställa resultat från en pågående forskningsstudie om rödklöverensilage i foder till suggor, med fokus på hur olika östrogena substanser kan påvisas i träck och urin samt om det var förändringar över tid.

3.1 Litteraturstudien

Litteraturstudien fokuserade på de fytoöstrogener som finns i rödklöver samt dess metabolisering och inverkan på reproduktionen hos idisslare och grisar. Det finns även andra växter som innehåller höga halter av fytoöstrogener, exempelvis soja, men detta var inte i fokus vid litteratursökning. Litteratur hämtades från böcker, vetenskapliga artiklar och myndigheters hemsidor. Litteratursökning gjordes främst via databaserna *Google scholar*, *Primo* och *Scopus*. Då vi hittade en källa med bra innehåll gick vi även igenom referenslistan för att hitta fler artiklar på ämnet. Vi letade främst efter vetenskapligt granskade artiklar men det var inte ett måste. Det strävades också efter att använda litteratur skriven inom de närmsta 20 åren men viss grundläggande forskning har varit äldre.

Sökord: idisslare/ruminant, gris/pig, sugga/sow, reproduktion/reproduction, rödklöver/red clover, isoflavon/isoflavone, fytoöstrogen/phytoestrogen, equol.

3.2 Försöket

3.2.1 Försöksdesign

Den pågående forskningsstudien som data insamlats från utfördes på Sveriges Lantbruksuniversitets forskningscentrum för lantbrukets djur på Lövsta utanför Uppsala. Försöket omfattade 16 suggor där hälften ingick i en försöksgrupp som utfodrades med rödklöverensilage och hälften ingick i en kontrollgrupp utan rödklöverensilage. Suggorna var en månad in i dräktigheten när försöket påbörjades och de inhystes då i ett lösdriftssystem med djupströbädd. Samtliga suggor utfodrades efter hull med ett kommersiellt färdigfoder lämpat för sinsuggor och försöksgruppen utfodrades utöver detta även med rödklöverensilage. De fick då 4,3 kg ensilage delat på två givor om dagen, i fyra veckors tid. Träck samlades in två gånger i veckan och urin samlades in en gång i veckan, under de fyra veckorna i försökstiden.

3.2.2 Provhantering och kemiska analyser

Proverna förvarades i frys (-20 °C) efter provtagning för vidare analys av fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A, genistein samt metaboliten equol. Träck samlades in två gånger i veckan och dessa slogs ihop till ett samlingsprov innan analys. Proverna med urin analyserades varje vecka både med och utan tillsats av enzymerna β -glukuronidas och sulfatas. Enzymerna bidrar till konjugering av fytoöstrogener som gör det möjligt att se det totala innehållet. Utan tillsats av enzym kan endast mängden fria (okonjugerade) fytoöstrogener detekteras. Samtliga rödklöver- och träckprover analyserades utan β -glukuronidas/sulfatas. De innehöll 1 g frystorkat prov vardera som extraherades med 17 ml 65% etanol. Därefter kördes proverna i en mikrovågsugn för att sedan svalna av och därefter centrifugeras. Proverna späddes därefter med 3 ml milli-Q-vatten och fördes genom en Sep-Pak. De eluerades sedan med 2 ml 80% metanol och filtrerades genom ett 0,2 μ m sprutfilter ner till provvialer. Urinproverna innehöll 3 ml urin. De prover som enzymbehandlats blandades med 10 μ l β -glukuronidas/sulfatas och inkuberades därefter i ett värmeskåp med 37°C i 20 timmar. Proverna fördes därefter genom en Beta-Gone kolonn och blandades sedan med 3 ml buffert av natriumacetat samt 10 μ l milli-Q-vatten. Detta filtrerades sedan genom ett 0,2 μ m sprutfilter ner till provvialer. Dessa placerades sedan i UHPLC-maskin (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) där proverna kördes med högt tryck genom en kolonn. UHPLC-maskin används för att identifiera, kvantifiera och separera varje växtöstroger från respektive blandning vid bestämda tider.

3.2.3 Sammanställning och statistisk bearbetning av data

Rådata från analyserna sammanställdes och bearbetades statistiskt för att undersöka skillnaderna mellan försöks- och kontrollgruppen. De rådata från urin som sammanställdes i detta arbete är från de prover där enzym tillsattes då detta gav ett tydligare utslag på UHPLC-maskinen, både hos försöksgruppen och hos kontrollgruppen. Hos kontrollgruppen uppmättes lägre halter av hormoner och i vissa fall hittades inte ämnet alls, detta har då räknats som värde 0 i de statistiska bearbetningarna. Den statistiska bearbetningen utfördes i Excel med ett ensidigt test genom att analysera effekten av behandling (rödklöver, kontroll) på innehåll av fytoöstrogener i träck och urin. Då det inte var samma sugor i försöksgruppen och kontrollgruppen utfördes t-testet som typ 2 då det utfördes på olika men liknande individer. Vår signifikansnivå var på 5% vilket betyder att om p-värdet var under 0,05 så förkastades nollhypotesen att det inte skulle vara skillnad. Vi ansåg då att det var en signifikant skillnad och mothypotesen var sann.

Nollhypotes: Ingen signifikant skillnad i koncentrationen av fytoöstrogener i träck och urin mellan försöksgruppen och kontrollgruppen kan påvisas.

Mothypotes: Signifikant högre koncentrationer av fytoöstrogener i träck och urin i försöksgruppen jämfört med kontrollgruppen kan påvisas.

Resultaten presenteras som medelvärden för varje vecka på de fem analyserade ämnena. Statistiskt signifikanta skillnader anges med p-värde <0,05.

4. Resultat

4.1 Litteraturstudien

4.1.1 Effekter av fytoöstrogener hos idisslare

Effekter hos får

Flertalet studier har funnit både positiva och negativa effekter hos idisslare som exponerats för fytoöstrogener (Grgic et al. 2021). Rödklöver är ett effektivt foder till idisslare, inte minst till högdräktiga eller digivande tackor samt växande lamm med högt proteinbehov eftersom det är smakligt och proteinrikt (Mustonen et al. 2014). En studie har funnit att både foderkonsumtion, proteinintag och tillväxt blivit signifikant högre hos lamm som ätit ensilage av rödklöver jämfört med hybridrajgräs (Marley et al. 2007). En annan studie har funnit att tillväxten på lammen varit både högre och snabbare hos lamm som ätit rödklöver än hos de som ätit vitklöver (Grgic et al. 2021).

På 1940-talet upptäcktes det att får påverkades negativt av rödklövern, då en grupp tackor betade en ny klöversort i västra Australien. Ett flertal tackor blev infertila och antal födda lamm sjönk med cirka 70%. De olika kliniska symptom som kunde komma att uppstå av detta fick samlingsnamnet *klöversjukan* (Lundh & Madej 2003). Ett lågt intag av fytoöstrogener kan resultera i tillfällig infertilitet men ett högt eller långvarigt intag kan visa sig som permanent infertilitet, onormal juverutveckling, onormal laktation, livmoderframfall eller ofullständig utveckling av livmoderhalsen som leder till svårigheter vid födsel. För tackor på bete bör vallblandningen därför inte innehålla mer än 0,3% formononetin i torrsubstansen. Vid koncentrationer över 0,8% kan fertilitetsproblem uppstå (Mustonen et al. 2014).

Effekter hos kor

Studier visar att även nötkreatur kan påverkas både positivt och negativt av rödklöver. Mjölkkor som utfodrats med rödklöverensilage har visat sig ha större TS-intag, högre mjölkavkastning och en mer önskvärd mjölksammansättning jämfört med kor som utfodrats med gräsenilage (Mustonen et al. 2014). Även hos nötkreatur har det visat sig att rödklövern kommer med fertilitetsstörningar trots att det inte är lika väl beskrivet som hos får. I en fallstudie har det visat sig att utfodring med rödklöverensilage orsakat flytningar och oregelbundna brunstcykler hos kor, vilket lett till missfall och för tidiga födslar. När utfodringen av rödklöver sedan avslutades så återgick fertiliteten till det normala. Grgic et al. har presenterat flertalet studier som visat på infertilitet, slidframfall, förstorat juver och ovarialcystor på äggstockarna (Grgic et al. 2021).

Fytoöstrogenerna som kommer via fodret har också visat sig överföras till mjölken. I ett försök delades 48 mjölkkor in i fyra grupper, som fick beta antingen cikoria-, lusern-, vitklöver- eller rödklöverrika betesmarker för att jämföra koncentrationen av fytoöstrogener som överfördes i mjölken. Resultaten visade att mjölken från rödklöverrika marker hade en 4 till 5,6 gånger högre koncentration av fytoöstrogener jämfört med resterande. Koncentrationen av equol i mjölken var 6,1

till 11,8 gånger högre. Mjölken från cikoria, lusern och vitklöver skiljde sig inte nämnvärt i koncentration sinsemellan (Andersen et al. 2009). Höjer et al. fann också att mjölken som säljs i butik innehåller fytoöstrogener. Prover från pastöriserad mjölk med 1,5% fetthalt har samlats in från flera olika mejerier i landet och analysresultaten visade att det fanns 0,16 mg fytoöstrogener per kg i den konventionella mjölken respektive 0,3 mg i den ekologiska. Att det är högre koncentration av fytoöstrogener i ekologisk mjölk beror troligen på att användningen av rödklöver är större på dessa gårdar (Höjer et al. 2011).

Att nötkreatur och får påverkas olika av fytoöstrogener beror bland annat på att absorptionen har visat sig vara olika mellan djurslagen. Hos mjölkkor absorberas formononetin och daidzein mycket fortare än hos tackor. Koncentrationen av de två fytoöstrogenerna i blodet har visat sig vara tre gånger högre under den första timmen jämfört med koncentrationen hos tackor som har fått foder med samma mängd fytoöstrogener. Equolkoncentrationen har mätts under 16 timmar efter utfodring hos mjölkkor och får. Då visades att mjölkorna hade en konstant nivå på 180 µg per 100 ml under hela perioden. Fåren däremot hade en lägre nivå till en början vilket sedan ökade och efter tre timmar var nivån lika hög som hos mjölkorna. Vid slutet av perioden hade nivån gått ner igen och var bara hälften så hög som hos mjölkorna, vilket tyder på en snabbare metabolism av fytoöstrogener hos får. Trots detta sägs får vara känsligare för equol än nötkreatur. En anledning till detta kan vara att östrogenreceptorerna i livmodern hos får är 2 – 4 gånger mottagligare än hos kor (Koligian & Stormshak 1977; Henricks & Harris 1978).

4.1.2 Effekter av fytoöstrogener hos grisar

Det finns i dagsläget få forskningsstudier på hur fytoöstrogener påverkar reproduktionen hos suggor. Av de studier som finns är det få som inkluderar just rödklöver, i de flesta fall används soja eller behandlingar med de olika östrogenerna var för sig.

Det har utförts studier med *in vitro*¹-försök där granulosaaceller från follikeln hos gris inkuberades i närvaro med daidzein eller genistein. Progesteronutsöndringen mättes därefter och samtliga studier kom fram till att progesteronhalten minskade. Detta betyder att daidzein och genistein kan ha en effekt på folliklarna i äggstockarna men på vilket sätt går inte att fastställa (Tiemann et al. 2007; Nynca et al. 2013). Nynca et al. (2013) studerade även hur progesteronutsöndringen påverkades av tillsatt östradiol vilket visade sig ha en triggande effekt och ökade progesteronet. Samma sak studerades med tillsatt daidzein vilket i stället visade sig ha en dämpande effekt och minskade progesteron.

I en studie av Ford et al. (2006) analyserades de östrogenkänsliga vävnaderna på livmoder och livmoderhals hos gyltor som fick olika behandlingar med östradiol och genistein. Gyltorna fick en intramuskulär injektion var tolfte timme i tio dagar, de olika injektionerna var östradiol bensoat (2 mg/dag) eller fyra olika doser med genistein (50, 100, 200 eller 400 mg/dag). Efter behandlingen avlivades gyltorna och vävnaderna på livmoder och livmoderhals analyserades. Hos de gyltor med 50,

¹ In vitro= i glas, försöket har utförts i laboratorium.

100 och 200 mg genistein syntes inga förändringar mot kontrollgruppen men hos de som fick 400 mg genistein såg man förstörade könsorgan, ökat antal progesteronreceptorer och förändringar i livmoderkörtlarna. Hos de gyltor som fick östradiol bensoat såg man en ännu större tillväxt på livmodern, som var nästan sju gånger så stor som hos kontrollgruppen. Studien visade också att gyltorna reagerade på genistein på liknande sätt som vid en hög dos östradiol. Dock kunde studien inte svara på hur det påverkar suggornas reproduktion och fruktsamhet (Ford et al. 2006).

I en studie av Lundh (1995) studerades halten av fytoöstrogener i blod och urin hos grisar som utfodrades med rödklöver. Formononetin absorberades fort och en timme efter foderintag var nivån uppe på maximal där den sedan var stabil, halten var 10 gånger högre än hos nötkreatur som utfodrats med samma mängd vid samma tid. Resultatet av att formononetin togs upp så snabbt i kroppen tyder på absorptionen sker redan i magsäcken där fodret stannar i ca två timmar efter foderintag hos gris. Åtta timmar efter foderintag hade 55% av fytoöstrogenerna utsöndras ur kroppen via urin. Fytoöstrogenerna i urinen identifierades som 72% formononetin, 6% daidzein och 22% equol. Huvuddelen av formononetinet som fanns i fodret utsöndrades i urinen utan att brytas ned i fodersmältningen. Man kunde därmed konstatera att huvuddelen av fytoöstrogenerna som intogs av grisen utsöndrades via urin (Lundh 1995).

I en studie av Koroljow (2007) genomfördes ett utfodringsförsök på dräktiga suggor som under den sista veckan av dräktigheten utfodrats med ett sojabaserat supplement. Detta innehöll minst 40% mixat genistein/daidzein/glycitin och den dagliga dosen av fytoöstrogener var 45,7 mg per kg kroppsvikt. Efter födseln studerades eventuella symptom hos suggorna genom gynekologiska undersökningar men inga signifikanta förändringar hittades. De nyfödda smågrisarna studerades också och där påvisades rodnade och svullna vulvor hos gyltorna. Ren et al. (2001) genomförde en liknande studie där man gav suggorna daidzein i fodret sista månaden inför grisning. När smågrisarna föddes vägdes alla grisar och man valde ut 2 galtar i varje kull som låg nära medelvikten i kullen. Man såg en signifikant skillnad i födelsevikt hos de galtar som var födda av daidzeinbehandlade suggor, de vägde mer än galtarna från kontrollsuggorna. Födelsevikten hos hongrisarna i kullarna skiljde sig inte mellan kontrollsuggor och daidzeinbehandlade suggor. Man såg även att de suggor som behandlats med daidzein hade en procentuellt högre överlevnad på smågrisarna.

4.2 Försöket

4.2.1 Innehåll i rödklöver

Tabell 1: Innehåll av fytoöstrogener i rödklöverensilage (g/kg)

PROV	FOMONONETIN	DAIDZEIN	BIOCHANIN A	GENISTEIN
1A	8,297	0,134	1,373	0,154
1B	8,075	0,105	1,376	0,158
2	7,346	0,099	1,405	0,155

I tabell 1 finns en sammanställning för samtliga fytoöstrogener som fanns i rödklöverensilaget som användes vid försöket. Två prover togs ut och prov 1 analyserades vid två tillfällen som benämns 1A och 1B.

4.2.2 Innehåll i träck

Tabell 2: Innehåll av fytoöstrogener i träck hos försökssuggor och kontrollsuggor. R=rödklöver (g/kg), K= kontroll (g/kg), P=p-värde

	FORMONONETIN			DAIDZEIN			BIOCHANIN A			GENISTEIN			EQUOL		
	R	K	P	R	K	P	R	K	P	R	K	P	R	K	P
V.1	0,011	0,011	0,48	0,014	0,015	0,47	0,012	0,009	0,15	0,005	0,004	0,32	0,103	0,127	0,23
V.2	0,046	0,0	0,09	0,021	0,010	0,00	0,020	0,018	0,40	0,001	0,0	0,07	0,211	0,0	0,00
V.3	0,013	0,0	0,02	0,024	0,010	0,00	0,010	0,018	0,00	0,001	0,0	0,17	0,289	0,0	0,00
V.4	0,030	0,0	0,12	0,028	0,008	0,00	0,010	0,017	0,00	0,001	0,0	0,17	0,346	0,0	0,00

I tabell 2 finns en sammanställning för samtliga undersökta ämnen och ett p-värde för att jämföra försöksgruppen och kontrollgruppen. P-värdet hos de flesta ämnen visade på en signifikant skillnad, biochanin A var under vecka tre högre i kontrollgruppen än i rödklöver vilket visar på att det inte var en förhöjd halt av biochanin A i träck hos suggorna.

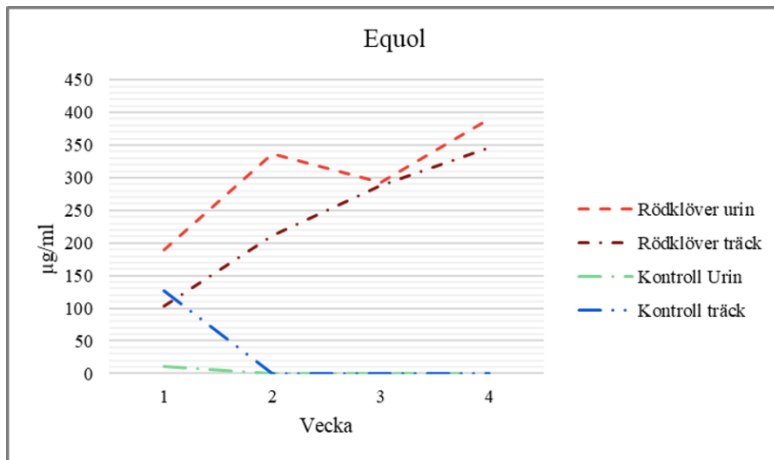
4.2.3 Innehåll i urin

Tabell 3: Innehåll av fytoöstrogener i urin hos försökssuggor och kontrollsuggor. R=rödklöver (µg/ml), K= kontroll (µg/ml), P=p-värde

	FORMONONETIN			DAIDZEIN			BIOCHANIN A			GENISTEIN			EQUOL		
	R	K	P	R	K	P	R	K	P	R	K	P	R	K	P
V.1	294,0	20,3	0,02	19,0	7,6	0,00	84,2	10,5	0,00	38,2	4,6	0,00	189,8	10,4	0,00
V.2	220,1	0,0	0,00	21,7	12,5	0,00	78,1	3,3	0,00	37,8	1,8	0,00	337,4	0,0	0,00
V.3	305,7	0,0	0,00	18,7	9,6	0,02	104,8	3,5	0,00	38,9	0,8	0,00	292,7	0,0	0,00
V.4	356,7	0,0	0,00	22,2	6,9	0,00	123,1	3,4	0,00	45,3	1,2	0,00	389,5	0,0	0,00

I tabell 3 finns en sammanställning för samtliga undersökta ämnen och ett p-värde för att jämföra försöksgruppen och kontrollgruppen. P-värdet visade på en signifikant skillnad hos samtliga ämnen.

4.2.4 Innehåll av equol i träck och urin



Figur 3: Sammanställning av equol i träck och urin (total mängd) över tid

I figur 3 finns en sammanställning för equol i träck och urin angett i $\mu\text{g/ml}$ analyserat prov. Man kan se en ökning med tiden hos de suggor som utfodrades med rödklöver. Denna ökning visar på att suggorna hade förmågan att omvandla formononetin och daidzein till equol.

5. Diskussion

Det vi kommit fram till är att reproduktionen hos idisslare som kor och får påverkas negativt då de utfodrats med en hög halt av rödklöver. Detta visar sig som sämre brunst, ökad frekvens av abort, infertilitet, livmoderframfall och svårigheter vid födsel (Mustonen et al. 2014). Vi har även kunnat se att det ännu inte är fastställt huruvida reproduktionen hos suggor skulle kunna påverkas av fytoöstrogener. Vi har inte hittat några belägg för att reproduktionen skulle påverkas negativt, men det finns heller inga studier som visar på det motsatta. Det vi har kunnat se genom sammanställningen av analysresultaten från försöket är att de suggor som utfodrats med rödklöver haft en signifikant större mängd av fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A och genistein samt metaboliten equol i urin, jämfört med de som inte utfodrats med rödklöver. Detta tyder på att suggorna har förmåga att metabolisera fytoöstrogenerna i rödklöver till equol, vilket skulle kunna ha en östrogen effekt. Det skulle därmed kunna påverka negativt på liknande sätt som hos idisslare, men för att kunna fastställa detta behövs mer forskning på hur fytoöstrogenerna tas upp och påverkar suggors reproduktion.

En allmän uppfattning om rödklöver till suggor är att det ska utfodras med stor försiktighet. Detta eftersom det påverkar idisslars reproduktion negativt och att det inte är vetenskapligt bevisat att det inte skulle påverka suggor också. En av de allmänna teorierna är att det skulle kunna påverka suggornas fertilitet så att de börjar brunsta vid fel tillfälle (Jordbruksverket 2013). Då man inom modern grisproduktion tillämpar omgångsuppfödning där man planerar att hela suggruppen ska brunsta, bli dräktig och därmed grisa samtidigt är det viktigt att suggornas brunst synkas. Vid eventuella störningar i reproduktionen som man misstänker kan

uppstå vid utfodring av rödklöver kan detta leda till att suggrupperna blir ojämna och den planerade omgångsuppfödningen skulle bli svår att genomföra.

Ett huvudproblem i modern hållning av grisar är att det råder brist på sysselsättning som kan leda till stress vilket i sin tur kan ge negativa effekter. Grovfoder är en bra sysselsättning som förhindrar stress och stereotypiska beteenden (Rantzer et al. 2019) och är därför intressant ur ett djuretiskt hållbarhetsperspektiv. Utöver sysselsättning och minskad stress bidrar grovfoder även till minskad risk för magsår, då den grövre strukturen med fiber är positiv för fodersmältningen (Gård och djurhälsan u.å.). Grisar och idisslare har olika fodersmältningssystem, idisslare kan äta större mängder och ta upp mer näring av grovfoder än grisar. Detta gör det svårt att jämföra rakt av hur fytoöstrogener påverkar reproduktionen hos de olika djurslagen. Rödklöver är en vanlig komponent i grovfoder och har ett högt kväveinnehåll vilket gör den proteinrik. Den kan därför användas som proteinfodermedel och som ett inhemskt alternativ till importerad soja, vilket är positivt ur ett miljömässigt hållbarhetsperspektiv. Den har även mycket goda växtföljdsegenskaper då den är kvävefixerande och därmed minskar behovet av konstgödsel, vilket är miljömässigt och ekonomiskt hållbart. Tack vare den djupa pålroten har den en luckrande effekt i jorden vilket också är önskvärt (Jordbruksverket 2022b).

Försöket har omfattat 16 suggor varav 8 ingick i försöksgruppen och 8 ingick i kontrollgruppen. Metaboliseringen av fytoöstrogener skiljer sig mellan individer och beror bland annat på individens ålder och tarmmikroflora (Sepehr et al. 2009), därför borde det varit samma suggor som först provtagits som kontroll och sedan provtagits som försök. Detta hade gett ett mer trovärdigt resultat då proverna tagits på samma individer och det hade inte heller riskerat att bli en carry-over-effekt.

Provresultaten på urin visade över lag jämna värden med små avvikelser mellan individer och mellan veckor. Det vi däremot kunde se på träck var att resultaten varierade kraftigt, både mellan individer från vecka till vecka men även mellan veckornas medelvärden. Detta kan tyda på att analysmetoden för träck inte var lika väl utvecklad som den för urin där provsvaren var mer stabila med färre avvikelser vilket vi uppfattar som mer säkert. Provresultaten på träck som avvek från övriga kan också bero på kontamination i labbet som påverkar resultatet. Vid analys av rådata från träck av kontrollgruppen fann vi att proverna från vecka 1 skiljde sig mycket från övriga veckor. Det gör resultaten svårtolkade och fler analyser på proverna för denna vecka skulle behöva utföras för att få säkrare siffror då variationen är stor. Flera av analysresultaten från träck saknades och detta beror troligen på att de var under detektionsgränsen eller att ämnet saknades helt.

Under analys av urinproverna från försöket noterade vi vid några tillfällen suggor som hade lägre mängd av alla ämnen vid provtagningstillfället även om suggan hade liknande som övriga suggor andra tillfällen. Förklaring till detta kan vara att provet togs vid en annan tidpunkt och det kan påverka koncentrationen beroende på tid från utfodring och därmed intag av fytoöstrogener. En annan förklaring kan vara att suggan vid provtagningstillfället inte varit helt frisk och därmed varken ätit, druckit eller urinerat som normalt. Det kan också bero på att UHPLC-maskinen

som använts för att analysera lösningarna är mycket känslig och det krävs därför inte mycket för att ett resultat ska bli missvisande.

6. Slutsats

Litteraturstudien visade att idisslare hade möjlighet att omvandla fytoöstrogener till equol vilket påverkar reproduktionen negativt. Sammanställningen av resultaten från försöket visade att fytoöstrogenerna formononetin, daidzein, biochanin A och genistein samt metaboliten equol återfanns i högre halter i urin hos suggor som utfodrades med rödklöver. Resultaten var mer varierande i träck men man såg även där en ökad halt av equol hos de suggor som utfodrades med rödklöver, vilket visar på att fytoöstrogenerna metaboliserades till equol. Hur detta påverkar suggorna och deras reproduktion på liknande sätt som hos idisslare kan inte fastställas av detta arbete. Det behövs mer forskning på hur fytoöstrogenerna tas upp i kroppen och hur det i sin tur påverkar reproduktionen.

Referenser

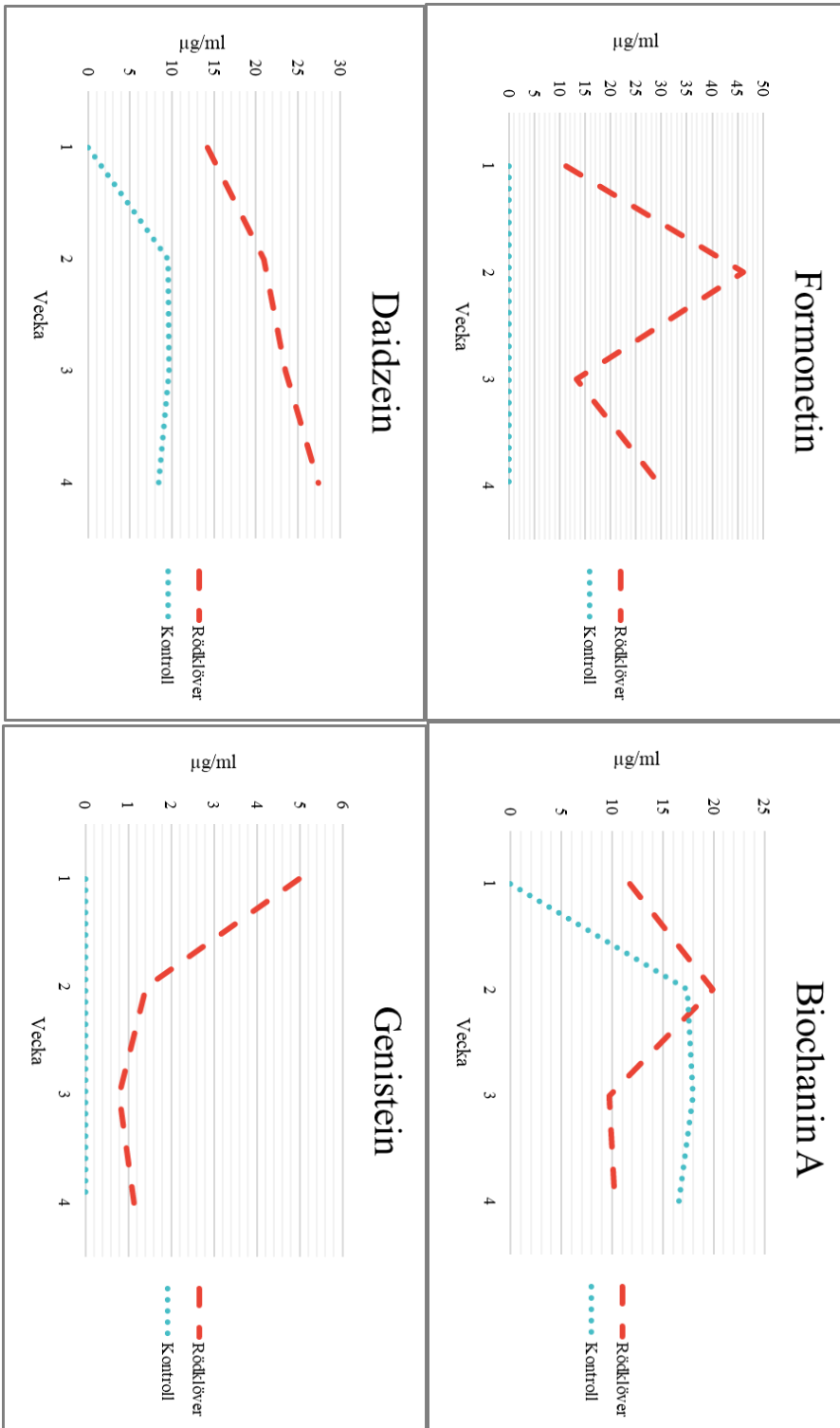
- Andersen, C., Nielsen, T.S., Purup, S., Kristensen, T., Eriksen, J., Søgaard, K., Sørensen, J. & Fretté, X.C. (2009). Phyto-oestrogens in herbage and milk from cows grazing white clover, red clover, lucerne or chicory-rich pastures. *animal*, 3 (8), 1189–1195.
<https://doi.org/10.1017/S1751731109004613>
- Bernes, G. & Höjer, A. (2013). Innehåll av fytoöstroger i olika rödklöversorter. 13
- Bowey, E., Adlercreutz, H. & Rowland, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41 (5), 631–636.
[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00324-1)
- Ehrenkrona, W. (2017). *Hormonella mönster under brunstcykel, tidig dräktighet och skendräktighet hos gris och hund*. [Grundnivå, G2E].
<https://stud.epsilon.slu.se/10383/> [2022-05-11]
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L. & Guillarme, D. (2014). Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 2–13.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>
- Ford, J.A., Jr., Clark, S.G., Walters, E.M., Wheeler, M.B. & Hurley, W.L. (2006). Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts1. *Journal of Animal Science*, 84 (4), 834–842.
<https://doi.org/10.2527/2006.844834x>
- Grgic, D., Varga, E., Novak, B., Müller, A. & Marko, D. (2021). Isoflavones in Animals: Metabolism and Effects in Livestock and Occurrence in Feed. *Toxins*, 13 (12), 836. <https://doi.org/10.3390/toxins13120836>
- Gård och djurhälsan (u.å.). *Stalltips: magsår*. (4:3).
<https://www.gardochdjurhalsan.se/wp-content/uploads/2019/01/magsar.pdf> [2022-04-12]
- Henricks, D.M. & Harris, R.B., JR. (1978). Cytoplasmic Estrogen Receptors and Estrogen Concentrations in Bovine Uterine Endometrium*. *Endocrinology*, 103 (1), 176–185. <https://doi.org/10.1210/endo-103-1-176>
- Höjer, A., Martinsson, K. & Gustavsson, A.-M. (2011). Fytoöstrogener i foder och mjölk – vad påverkar halterna? I: Bernes, G. (red.), mars 2011. 20–21. Department of Agricultural Research for Northern Sweden, Swedeish University of Agricultural Sciences. <https://orgprints.org/id/eprint/18830/> [2022-03-31]
- Jordbruksverket (2013). Ekologisk grisproduktion. Jordbruksverket.
https://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_jo/jo13_2.pdf
- Jordbruksverket (2021). *Ekologiska grisar*.
<https://jordbruksverket.se/djur/lantbruksdjur-och-hastar/grisar/ekologiska-grisar> [2022-03-30]
- Jordbruksverket (2022a). *Skötsel och stallmiljö för grisar*.
<https://jordbruksverket.se/djur/lantbruksdjur-och-hastar/grisar/skotsel-och-stallmiljo> [2022-03-30]

- Jordbruksverket (2022b). *Sprida gödsel*.
<https://jordbruksverket.se/vaxter/odling/vaxtnaring/sprida-godsels> [2022-04-11]
- Jönsson, R. (2013). *Klöver i ensilage till suggor - effekter på reproduktion och produktivitet*. [Grundnivå, G2E]. <https://stud.epsilon.slu.se/5691/> [2022-03-30]
- Koligian, K.B. & Stormshak, F. (1977). Nuclear and Cytoplasmic Estrogen Receptors in Ovine Endometrium During the Estrous Cycle1. *Endocrinology*, 101 (2), 524–533. <https://doi.org/10.1210/endo-101-2-524>
- Lundh, T. (1995). Metabolism of Estrogenic Isoflavones in Domestic Animals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208 (1), 33–39. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43828>
- Lundh, T. & Madej, A. (2003). Fytoöstrogener i foder och dessas effekt på husdjuren. *Kungl. Skogs- och Lantbruksakademiens Tidskrift*, 142 (12), 37–42
- Lärn-Nilsson, J. & Danielsson, D.-A. (2006). *Naturbrukets husdjur D. 2. 2. uppl.* Stockholm: Natur och kultur.
- Lärn-Nilsson, J., Jansson, D.S. & Strandberg, L. (1997). *Naturbrukets husdjur D. 1. 1. uppl.* Stockholm: Natur och kultur/LTs förlag.
- Marley, C.L., Fychan, R., Fraser, M.D., Sanderson, R. & Jones, R. (2007). Effects of feeding different ensiled forages on the productivity and nutrient-use efficiency of finishing lambs. *Grass and Forage Science*, 62 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2007.00556.x>
- Mustonen, E., Taponen, S., Andersson, M., Sukura, A., Katila, T. & Taponen, J. (2014). Fertility and growth of nulliparous ewes after feeding red clover silage with high phyto-oestrogen concentrations. *Animal*, 8 (10), 1699–1705. <https://doi.org/10.1017/S175173111400161X>
- Nynca, A., Nynca, J., Wąsowska, B., Kolesarova, A., Kołomycka, A. & Ciereszko, R.E. (2013). Effects of the phytoestrogen, genistein, and protein tyrosine kinase inhibitor-dependent mechanisms on steroidogenesis and estrogen receptor expression in porcine granulosa cells of medium follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 44 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.07.002>
- Rantzer, D., Svendsen, J., Olsson, A., Andersson, M., Thomsson, A. & Botermans, J. (2019). *Gris- undervisningskompendium*. Alnarp: Institutionen för biosystem och teknologi.
- Ren, M., Kuhn, G., Wegner, J., Nurnberg, G., Chen, J. & Ender, K. (2001). Feeding daidzein to late pregnant sows influences the estrogen receptor beta and type 1 insulin-like growth factor receptor mRNA expression in newborn piglets. *Journal of Endocrinology*, 170 (1), 129–135. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700129>
- Rowland, I., Wiseman, H., Sanders, T., Adlercreutz, H. & Bowey, E. (1999). Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: Role of the gut microflora. *Biochemical Society transactions*, 27, 304–8. <https://doi.org/10.1042/bst0270304>

- Sarelli, L., Tuori, M., Saastamoinen, I., Syrjälä-qvist, L. & Saloniemi, H. (2003). Phytoestrogen Content of Birdsfoot Trefoil and Red Clover: Effects of Growth Stage and Ensiling Method. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 53 (1), 58–63.
<https://doi.org/10.1080/09064700310002053>
- Sepehr, E., Cooke, G.M., Robertson, P. & Gilani, G.S. (2009). Effect of glycosidation of isoflavones on their bioavailability and pharmacokinetics in aged male rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (S1), S16–S26. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800170>
- Setchell, K.D.R. & Cassidy, A. (1999). Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal of Nutrition*, 129 (3), 758S–767S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.3.758S>
- Sivesind, E. & Seguin, P. (2005). Effects of the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (16), 6397–6402.
<https://doi.org/10.1021/jf0507487>
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of domestic animals*. 3. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Tiemann, U., Schneider, F., Vanselow, J. & Tomek, W. (2007). In vitro exposure of porcine granulosa cells to the phytoestrogens genistein and daidzein: Effects on the biosynthesis of reproductive steroid hormones. *Reproductive Toxicology*, 24 (3), 317–325.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.008>
- Weidow, B. (2000). *Växtodlingens grunder*. 2:1. Helsingborg: LTs förlag.
- Wilkins, R.J. (u.å.). Legume silages for animal production : LEGSIL ; proceedings of an International Workshop supported by the EU and held in Braunschweig, 8-9 July 2001. 104

Bilagor

Bilaga 1. Fytoöstrogener i träck



Bilaga 2. Fytoöstrogener i urin

