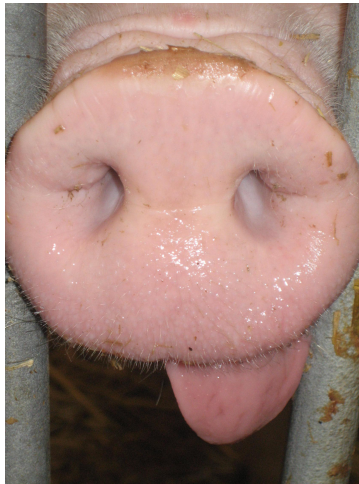




Brunstbeteendets relation till gyttans intag av genistein



Av
Ellinor Henningson

Handledare: Mattias Norrby
Inst. för anatomi, fysiologi och biokemi
Examinator: Elisabeth Persson

Husdjursvetenskap - Examensarbete 30hp
SLU, Uppsala 2009

Innehållsförteckning

Abstract	3
Sammanfattning	3
Introduktion	3
Litteraturstudie	4
Beteende och vanor	4
Progesteron	6
Östrogen	7
Foder-Växtöstrogen-Genistein	8
Material och Metod	11
Förberedelser	11
Beteendestudien	11
Provtagning och insemination	12
Progesteronanalys	13
Östrogenanalys	13
Resultat	14
Beteendestudien	14
Hormonanalyser	17
Diskussion	18
Grisars beteende	18
Hormoner och genistein	19
Slutsats	20
Tack	20
Referenser	21
Bilaga 1. Etogram	23
Bilaga 2. Etogram beskrivning	24

Abstract

Many scientists agree that phytoestrogens could have an effect on the reproduction of an animal. The question is now why and what mechanisms that play an important role. This paper has been focusing on the estrus behavior of gilts by use of a behavioral study. Some of the gilts were given additional feed with the phytoestrogen genistein which commonly occurs in the feed as a part of soybean products. Blood samples were collected and analyzed for progesterone and estradiol concentrations. Due to few samples, possible differences in hormonal levels between feeding groups could not be determined. The results from the behavioral study show a clear difference ($P < 0.001$) in vocalization rate prior to estrus between the two feeding groups. The gilts given feed with no genistein had a higher vocalization rate than those with genistein in the feed. This has not previously been shown for pigs. The results of this study, and possible explanations, are discussed in relation to available literature on the subject.

Sammanfattning

Att växtöstroger skulle kunna påverka reproduktionen hos ett djur är många forskare överens om. Den stora gåtan är nu varför och vilka mekanismer som spelar en avgörande roll. Detta arbete har fokuserats på gyltors brunstbeteende, med gyltorna grupperade så att hälften av djuren tilläggsutfodrats med växtöstrogeret genistein. Detta växtöstroger återfinns bland annat i sojabönan och är av intresse eftersom sojamjöl numera är en vanlig ingrediens i grisars foderstat. Parallellt med beteendestudien samlades även blodprover in för analys av progesteron- och estradiolkoncentrationer. På grund av få prover kunde inte någon skillnad i hormonnivåer mellan fodergrupperna fastställas. Resultaten visade en stor skillnad ($p > 0.001$) i vokaliseringfrekvens dagarna före brunst. De gyltor som inte utfodrats med genisten hade ett högre antal vokaliseringar per dag jämfört med gyltor utfodrade med genistein. Detta har aldrig tidigare visats hos gris. Studiens resultat och möjliga bakomliggande förklaringar diskuteras i jämförelse med tillgänglig litteratur inom området.

Introduktion

Tamgrisen (*Sus scrofa*) härstammar från vildsvinet och trots domesticering återfinns beteenden som förändrats väldigt lite (Pond & Mersman, 2001). Det finns ett flertal beteenden som anses gynna domesticering. Bland annat de sexuella signaler som fås från djurets hållning eller rörelse gör det lättare för människan att detektera brunsten. I det vilda lever sogrisarna i små familjegrupper större delen av året. Hanen lever ofta ensam och söker upp den lilla familjegruppen när det är tid för parning. I Norden infaller parningssäsongen vanligtvis under november och december för vildsvin (Mauget, 1982).

Näringsbehovet för en sugga varierar beroende på var i reproduktionscykeln hon befinner sig (Miller *et al.*, 1991). Gyltämnen som ska användas i avel bör utfodras med ett foder med högt energiinnehåll för att gynna tillväxt och mognad. Då gyltan uppnått en vikt på cirka 80-90 kg kan energigivan begränsas utan att det påverkar reproduktionsförmågan. Till exempel kan cirka 2 kg av ett fullfoder innehållande 14 % majs- och sojamjöl användas. Sojamjöl innehåller växtöstrogener från sojabönan och dessa växtöstrogener har bland annat visats påverka reproduktionsorganen hos gyltor genom att öka livmoderns våtvikt (Drane *et al.*, 1981).

En gylta är könsmogen när den visar sin första brunst och ovulerar vilket normalt infaller då hon är cirka sex-sju månader (Sjaastad *et al.*, 2003). Vid brunst sker en ovulation där mogna ägg avges från folliklar i äggstockarna. Dessa folliklar har under mognadsfasen producerat hormonet östrogen som inducerar hondjurets parningsvilja och förbereder kroppen för brunst. Östrogen påverkar djurets beteende och brunstsymtomen från de yttre könsorganen samt har även en tillväxtfrämjande effekt på slemhinnorna i könsorganen (Einarsson *et al.*, 1987). Östrogen orsakar således det speciella beteende som benämns brunst. När äggen avlossats bildar de brutna folliklarna gulkroppar som producerar progesteron vilket bidrar till bibehållande av den möjliga dräktigheten (Sjaastad *et al.*, 2003). En eventuell befruktning av äggen sker i äggledaren där ägg och spermier möts (Pond & Mersman, 2001). Vid utebliven befruktningen utsöndras prostaglandin från livmoderslemhinnan vilket leder till att gulkropparna tillbakabildas och därmed sjunker progesteronproduktionen. En ombrunst sker då hos gris efter cirka tre veckor.

Brunstcykeln är cirka 21 dagar (18-24) och kan delas in i fyra olika faser:

Diöstrus: Inga yttre tecken på brunst vare sig beteendemässigt eller fysiskt.

Proöstrus: Tecken på kommande brunst i form av rodnad och svullnad av vulva, ökad generell aktivitet och högljuddhet.

Östrus: En topp av ovanstående tecken fås vid full brunst vilken varar i cirka 30-48 timmar hos en gylta och börjar ett till två dygn före ovulation. För en sugga kan brunsten vara mellan 48-72 timmar. Nu visas också "ståreflexen" (se beskrivning nedan).

Metöstrus: De yttre tecknen avtar och ovulation sker.

Frågeställningar till detta examensarbete har tagits fram som en egen del av ett större forskningsprojekt som pågår vid Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi på Sveriges lantbruksuniversitet (pers medd. Norrby, M.). Djur som deltagit i denna studie har även ingått i det större forskningsprojektet. Syftet var att registrera gyltors brunstbeteende samt östrogen- och progesteronkoncentrationer i plasma i relation till intag av växtöstroget genistein.

Litteraturstudie

Beteenden och vanor

Grisen har en välstrukturerad daglig aktivitetsrepertoar (Pond & Mersman, 2001). En vanlig dag för en gris består till cirka 80 % av att sitta eller ligga ner, cirka 10 % för att äta och resterande tid åtgår till övriga aktiviteter. Grisar kommunicerar mycket med hjälp av ljud, men innebörden av alla olika vokaliseringar är dock idag oklar.

Brunst definierades av Altmann (1941) som yttre tecken såsom svullna rödaktiga genitalier, rastlöshet och grymtningar vilka beskrivs som frekventa och typiska. Försök visade dock att vulva inte alltid fick en rödaktig färgskiftning vid brunst. Grisens aktivitet mättes i antal steg och vid brunst dubblades denna stegfrekvens vilket tyder på en ökad aktivitet kring brunst. På grund av en stor variation i slidsekretets karaktär kunde inte någon slutsats dras om förekomst av cykliska variationer. Inte heller hjärtfrekvensen visade något mönster kopplat till brunstcykeln. Under brunst minskade aggressiviteten generellt hos grisarna i form av bland annat färre försök att bita försökspersonalen. Grisar av Duroc-Jersey-korsning blev däremot mer aggressiva under brunst och hade tämligen oregelbundna brunstcykler.

Enligt Signoret (1970) innefattar mekanismerna bakom det sexuella beteendet tre huvudsteg där de hormonella signalerna mellan fortplantningsorganen och det centrala nervsystemet

omnämns först. Nästa steg berör hjärnans omkoppling av dessa signaler till parningsdrift och motoriska mönster kring parning. Det tredje huvudsteget består av den sensoriska informationen såsom leder till sökande efter partner och identifiering av dess fysiologiska status samt utlösning av anpassade motoriska reaktioner. Detta tredje steg studerades närmare och visade på åtskilliga beteendefenomen. Det visade sig att suggan utforskar och rör sig mer under brunst. Det fanns ingen skillnad i galtens intresse för honan vare sig gyltorna inhystes normalt eller med en social begränsning. Hos gyltor som fått äggstockarna avlägsnade (ovarieektomerade) och istället injicerats med estradiolbenzoat för att inducera brunst, sågs en tendens till att ökad dos ledde till ökat intresse av galten. Vid brunst tar honan initiativ till uppvaktning och söker aktivt efter galten. Observationer från olika besättningar indikerar att honans passiva signaler som ljud och lukt kring brunst, inte är av samma vikt för galten som hennes övriga signaler, dvs. framför allt rörelser.

Förekomst av ståreflexen är ett allmänt vedertaget sätt att detektera hongrisar i brunst (Signoret, 1970). Vid tryck på ryggen står då honan stilla för att tillåta bestigning och parning. Ståreflex kan som regel provoceras fram utan galtnärvaro. I ett försök testades olika galtstimuli på gyltor som inte visade ståreflex för försökspersonalen. Samtliga visade då ståreflex, varav 90 % efter ljud och lukt från galt och ytterligare 6,7 % när de även fick se galten. Resterande 3,3 % av gyltorna visade ståreflex när de utöver ovan nämnda stimuli också fick galkontakt. Högre dos av estradiolbenzoat injicerat i gyltor som saknade äggstockar visade inte på någon ökad ståreflexfrekvens när galt var frånvarande i jämförelse med de gyltor som injicerats av en lägre dos av estradiolbenzoat. Detta visar att galtens närvaro har större inverkan på gyltans ståreflexfrekvens i jämförelse med injektion av estradiolbenzoat.

Gyltor har visats vara mer intresserade av en tom box när de är i brunst jämfört med innan och efter brunst (de Jonge *et al.*, 1994). Vid försöket prövades gyltors beteende före, under och efter brunst då de släpptes individuellt i en gång med två boxar i slutet av gången. De två boxarna skildes åt med hjälp av galler. I det första försöket var endast en box öppen och tom. Under det andra försöket placerades en galt i ena boxen. Gyltans tid i gången respektive i boxen noterades. Spenderad tid i boxen ökade under brunst både utan och med närvaro av galt i angränsande box. Mer tid spenderades dock i boxen då galt var närvarande jämfört med en tom box. Författarna nämner i sin diskussion att de även observerade höga vokaliseringar då gyltan under brunst vankade intill gallret till den tomma boxen och försökte förstöra den.

Vid en studie av Dailey & McGlone (1997) avseende dräktiga gyltors beteende i utomhus- och inomhusmiljö visade det sig att de som vistas utomhus hade mer bökningsbeteende och låg ner mindre. Däremot kunde studien inte påvisa några genotypskillnader mellan de undersökta typerna; PIC Camborough-15, PIC Camborough-Blue och York x Lantras. Pedersen *et al.* (1997) studerade relationen mellan stress och inhysning respektive gyltors brunst- och parningsbeteende genom en beteendestudie. De fann skillnader mellan de två inhysningsgrupperna; individuell och parvis, när det gällde beteende. Vid brunst visade de gyltor som inhystes individuellt en frekvensökning av bland annat intresse för beteendeobservatören, rastlöshet, galkontakt samt antal beteendeväxlingar. De gyltor som inhystes parvis visade även de på ett ökat intresse för beteendeobservatören och rastlöshet vid brunst. Antal beteendeväxlingar och intresse för observatören ökade dock mer för gyltorna i individuell box jämfört med dem som inhystes parvis. Stress mättes i denna studie genom utdelning av elchocker. När gyltorna i försöket var mellan 115-168 dagar gavs en grupp fem korta elstötar 0-5 gånger per dag i cirka 54 dagar. Den andra gruppen fungerade som kontroll.

Behandlingen hade ingen signifikant effekt på vare sig gyltans beteende gentemot galtstimuli, hennes sexuella mottaglighet kring brunst eller beteendet i hemboxen.

Jensen (1995) granskade litteratur om individuell variation i beteende hos gnagare och gris. Slutsatsen var bland annat att det finns tecken som tyder på individuella överlevnadstyper hos gnagare men de kunde inte påvisas hos gris. Han efterlyste även behovet av mer studier på området. Spoolder *et al.* (1996) kunde inte heller stödja teorin om att det finns olika beteendetyper hos gris. Gyltorna i det försöket reagerade konsekvent på en specifik uppgift under ett kort tidsintervall. De beteendeskilnader som fanns mellan gyltorna kunde inte kategoriseras. En studie av Hessing *et al.* (1993) visar dock att klassificering genom förekomst av till exempel passiv eller aktiv social respons hos smågrisar kan vara möjlig. Resultaten visade att de som kategoriserats som motståndskraftiga i ett test vokaliserade mer än smågrisar som kategoriserades som icke-motståndskraftiga. Motståndskraftiga var de smågrisar som gjorde två eller fler försök att ta sig loss då de lades på rygg med en lätt hand tryckande över huvudet under en minut. De smågrisar som kategoriserades som icke-motståndskraftiga gjorde färre än två försök att ta sig loss.

Grisars rädsla för människan har visat sig minska efter upprepad mänsklig kontakt (Hemsworth *et al.*, 1986). Signifikanta skillnader fanns mellan kullursprung och hur lång tid det tog innan grisen kom inom 0,5 meter från försökspersonen. Däremot sågs ingen effekt på grisens kontaktilja vare sig försökspersonen ropade högt eller lågt. Genom att testa 67 dräktiga gyltor studerades hongrisens vokalisering i samband med mänsklig kontakt (Marchant *et al.*, 2001). Resultaten visade indikationer för en rad distinkta vokaliseringar. Testet utfördes individuellt för varje gylta. Efter att gyltan acklimatiserats i två minuter ställde sig en människa på utsatt plats i testboxen under tre minuter. Gyltans beteende och ljud registrerades med hjälp av en videokamera. Testet visade på en stor individuell spridning i gyltornas reaktioner på människan, trots att alla försöksdjuren kom från liknande bakgrund både genetiskt och miljömässigt. Under isoleringsperioden registrerades mest korta grymtningar som kan visa på gyltans undersökningsbeteende. Gyltans vokalisering var mer frekvent då människan var närvarande.

Progesteron

Progesteron brukar kallas dräktighetsbevarande eller gulkroppshormon (Pond & Mersman, 2001) och är det mest dokumenterade hormonet i grisens brunstcykel (Foxcroft *et al.*, 1982). Syntesen av progesteron stimuleras av luteiniserande hormon (LH) från hypofysen (Sjaastad *et al.*, 2003). Progesteron förhindrar ny ovulation och follikelutveckling. Utöver gulkroppar som källa, bildas progesteron även i binjurebark och moderkaka. Binjuren som källa gör att det finns hos galt men plasmanivåerna är låga.

Via en direkt effekt från progesteron regleras sekretionen av GnRH genom bindning till receptorer i neuroner i hypotalamus (Sjaastad *et al.*, 2003). Genom negativ feedback påverkar även progesteron sekretionen av gonadotropiner (FSH och LH). Enzymer som kan omvandla progesteron, som är ett steroidhormon, till andra steroider saknas hos gulkroppen och moderkakan. Steroidhormoner är fettlösliga och därför sker cirka 98 % av progesterontransporten i blodet via transportproteiner som produceras och bryts ner i levern. Dessa kan dock inte ta sig igenom cellmembranet såsom steroidhormonerna kan, och gör för att kunna binda till intracellulära receptorer som främst är lokaliserade till cellkärnan.

Progesteron bidrar bland annat till stimulering av tillväxt av och sekretion från livmoderslemhinnan (Sjaastad *et al.*, 2003). Sekretet innehåller specifika ämnen som ger

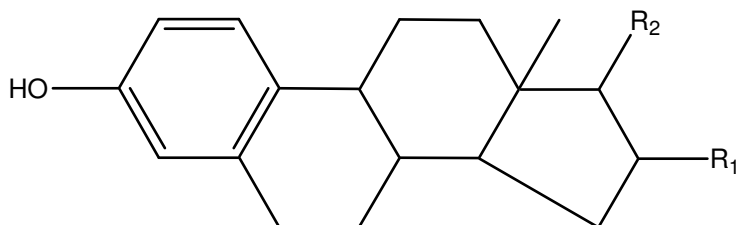
embryot näring innan bildning av placenta sker. Slemhinnan tillbakabildas när progesteronproduktionen upphör. För att förhindra för tidig födsel stabiliserar progesteron den glatta muskulaturen i livmodern. Progesteron medverkar även till förberedelsen av mjölksyntes och tillväxt av juvervävnad.

Sekretionen av progesteron faller snabbt när gulkroppen genomgår luteolys som startas när livmodern utsöndrar tillräckliga mängder av prostaglandiner, PGF-2 α , vilket i sin tur sker i slutet av diöstrusperioden vid avsaknad av embryon i livmodern (Sjaastad *et al.*, 2003). Regleringen av sekretionen av PGF-2 α styrs bland annat genom det oxytocin som utsöndras från gulkroppen. Plasmanivåerna av progesteron kan sjunka snabbt eftersom hormonet har en kort biologisk halveringstid och progesteronnivån i plasman är därför väldigt låg kring brunst (Pond & Mersman, 2001). Progesteronnivåerna i plasman kring brunst ligger mellan 5,7–9,3 ng/ml (Tillson & Erb, 1967). Efter ovulation ökar sedan progesteronkoncentrationen drastiskt. Under diöstrus är gulkroppen fullt utvecklad och plasmanivåerna av progesteron är då som högst (Sjaastad *et al.*, 2003). Maximalnivåerna för progesteron nås därmed sju till tio dagar innan brunst och har värden på 22,6–32,0 ng/ml (Van de Wiel *et al.*, 1981; Tillson & Erb 1967).

När Ford (1985) undersökte progesteronets funktion för stimuleringen av gyltans sexuella mottaglighet genom att använda ovarieektomerade gyltor som behandlades med estradiolbenzoat och progesteron i olika doser. Ford tittade bland annat på ett antal olika bestigningssekvenser samt hur många gyltor som visade ståreflex. Progesteron visades inte förbättra någon av de undersökta egenskaperna. I stället visade sig mängden estradiolbenzoat ha betydelse genom att ökad dos gav ökad frekvens ståreflex och bestigningar.

Östrogen

Produktion av honans östrogener sker i äggstocken, gulkroppen, moderkakan och binjurebarken (Pond & Mersman, 2001). Östrogen har ett antal funktioner relaterade till olika aspekter av reproduktionen, bland annat genom att stimulera follikeltillväxt och att signalera follikulär mognad. Follikeln har receptorer för både follikelstimulerande hormon (FSH) och LH. Dessa hormoner påverkar enzymer som konverterar kolesterol till androgener som i sin tur kan ombildas till östrogener. Östrogener är C₁₈-steroider, d.v.s. en molekylstruktur som innehåller 18 kolatomer (Sjaastad *et al.*, 2003). Det finns olika typer av östrogener bland annat estradiol, estron och estriol (figur 1). Det är framförallt estradiol som förekommer hos däggdjur. Den aktiva formen av estradiol kallas 17- β -estradiol. Det finns även 17- α -estradiol som återfinns i höga koncentrationer hos foster. Estron och estriol har en lägre östrogenaktivitet men har liknande molekyluppbyggnad som estradiol.



Figur 1. Kemisk struktur för estradiol, estron och estriol. Modifiering från Fransworth *et al.* (1975).

Estradiol reglerar sekretionen av GnRH och gonadotropiner (Sjaastad *et al.* 2003). När estradiolkoncentrationen stiger i plasman och håller en hög nivå i minst 24 timmar framkallas

även en positiv feedback som leder till en topp av LH. Det är denna LH-topp som leder till ovulation. Van de Wiel *et al.* (1981) publicerade en artikel som bland annat beskrev hur 17- β -estradiol hos fyra gyltor studerades grundligt under delar av brunstcykeln. Estradiolkoncentrationernas maximalnivåer låg mellan 32.1 och 56.4 pg/ml och noterades dagen innan brunst samt under brunstens första dag. Man studerade även LH och visade att detta hormon börjar stiga cirka fyra timmar innan maximalnivåerna av 17- β -estradiol nåddes. Detta anses stödja teorin att estradiol utövar en positiv feedback på LH vid höga koncentrationer. Östrogenkoncentrationen har enligt bland andra Pond & Mersman (2001) även en inverkan på dräktighet och förlösning. Efter knappt två veckors dräktighet utsöndras östrogen från grisembryon som gör att suggans kropp uppfattar dräktigheten, s.k. 'maternal recognition of pregnancy'. Vid dräktighet ökar plasmanivåerna av östrogen från dag 60 fram till förlösning. Östrogen ingår också som ett av huvudhormonerna som stimulerar juverutveckling. Östrogener är steroider liksom progesteron, och dess receptorer finns bland annat i cellkärnan (Adams, 1989). Östrogenreceptorer (ER) finns i två former, ER- α och ER- β (Kuiper *et al.*, 1998).

Dial *et al.* (1983) studerade hur varierande dos av estradiolbenzoat påverkade unga gyltor (135-150 d). En positiv korrelation hittades mellan mängd estradiolbenzoat och brunstens varaktighet där ökad dos gav ökat antal gyltor i brunst. Däremot sågs ingen inverkan på brunstintervallet. Författarna jämförde resultaten med en studie av van de Wiel *et al.* (1981) som undersökt äldre ovarieektomerade gyltor (cirka 210-270 d), även de behandlade med estradiolbenzoat. Vid administration av 10 μ g estradiolbenzoat/kg kroppsvikt noterades dubbelt så höga plasmavärden av östrogen hos de yngre gyltorna (Dial *et al.* 1983) i jämförelse med de äldre gyltorna (van de Wiel *et al.* 1981). Hos samtliga äldre gyltor (4/4) inducerades trots det brunst efter giva av 10 μ g estradiolbenzoat (van de Wiel *et al.* 1981) men inte hos alla yngre gyltor (6/10, Dial *et al.* (1983). Skillnaderna skulle enligt Dial *et al.* (1983) visa på en variation i absorptionen och/eller metabolismen av östrogen mellan de två åldrarna.

Foder – Växtöstroger – Genistein

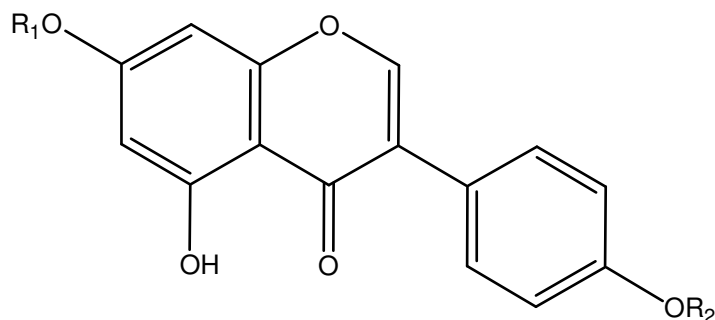
Näringsinnehållet påverkar suggan och därmed produktionen (Miller *et al.*, 1991). Kopplingar mellan näringsinnehåll och reproduktionskapacitet anses dock vara svårt att studera då många andra faktorer spelar in såsom miljöfaktorer och individskillnader. Trots att mycket information om grisens nutrition dokumenterats finns fortfarande många luckor. Detta gäller även interaktionen mellan näringsämnen. Det finns också studier för många näringsämnen som inte är konsekventa. Sojabönan, i olika former, fungerar bra som foderingrediens till gris. Det har dock visat sig ofördelaktigt att utfodra med enbart råa sojabönor vilket till exempel har lett till reducering av daglig tillväxtökning (Crenshaw & Daniel, 1985). Sojamjöl är ursprungligen en biprodukt från extraktionen av olja och korrekt processat sojamjöl kan ses som en god proteinkälla (Miller *et al.*, 1991). Sojamjölet innehåller låga halter av kalcium, fosfor, karoten och vitamin D samt aminosyrorna lysin och methionin.

Drane *et al.* (1981) studerade sojamjölets effekt på bland annat vulvadiameter hos unga gyltor. Försöket pågick i 14 veckor och vid försökets början var gyltorna tio veckor gamla. Sex gyltor utfodrades med en foderstat innehållande 20 % sojamjöl. En kontrollgrupp på sex gyltor fick en sojafri foderstat kompenserad med fiskmjöl, linfröexpeller och lysin (HC1-tillskott). Kroppsvikt och vulvas diameter mättes en gång i veckan. Vid jämförelse av försöksveckorna 6 och 11-14 visades en stor signifikant skillnad mellan de två grupperna. Vulvadiametern var då större hos gyltorna som utfodrads med sojamjöl. Djuren avlivades efter försöket och histologiska prover samt vikt på reproduktionsorganen undersöktes. Ingen

skillnad hittades mellan de gyltor som intog sojamjöl jämfört med gyltorna utan soja i foderstaten.

Växtöstroger finns i vissa växter och kan orsaka en östrogen effekt hos djur då den kemiska strukturen möjliggör bindning till östrogenreceptorer (Adams, 1995). Växtöstrogener är relativt inaktiva och försök att uppskatta östrogenhalten är delvis influerade av den teknik som används vid mätningarna (Adams, 1989). En ratio av växtöstroger i förhållande till östrogen har visat sig avgöra om växtöstrogeret agerar additivt eller antagonistiskt till östrogen (Adams, 1989; 1995). Affiniteten till östrogenreceptorerna är lägre för växtöstroger än för steroida östrogener (Adams, 1989). Steroidreceptorkomplexet omformas vilket möjliggör bindning till DNA på specifika platser. Detta aktiverar sedan gentranskriptionen. Växtöstrogerkomplexet är mer instabilt när det gäller transformering och varaktigheten av bindningen till DNA jämfört med steroidkomplexet. Växtöstrogener kan metaboliseras av djuret både innan och efter bindning till östrogenreceptorer. Det finns en skillnad i receptoraffinitet där konkurrensen om bindningsytan mellan växtöstrogener och östradiol är starkare för bindning till ER β än till ER α (Kuiper *et al.*, 1998). Växtöstrogeners förmåga att binda framförallt till ER β anses kunna trigga många av de biologiska reaktioner som väcks av fysiologiskt östrogen.

År 1933 isolerades växtöstroger för första gången (Farnsworth *et al.*, 1975). I Australien uppdagades 1946 att kraftigt sjunkande antal lamningar berodde på bete bestående av subklöver (*Trifolium subterraneum*). Senare visades subklöver innehålla isoflavonen genistein (figur 2). Dessa fynd ökade intresset för icke-steroida östrogena substanser. I växter kan det finnas tre kemiska huvudtyper av växtöstroger som benämns flavoner, isoflavoner och coumestanser. Inom gruppen isoflavoner har genistein högst bindningsaffinitet till östrogenreceptorer. Coumestrol har i sin tur högre bindningsaffinitet för östrogenreceptorer än genistein och är dessutom den mest potenta bland växtöstrogener som kan finnas i fodergrödor (Jordan, 1985; Farnsworth *et al.*, 1975). Coumestanser agerar troligen som fytoalexiner, vilka är en grupp av substanser som hjälper plantan att motstå patogener. Isoflavoner och coumestanser utmärks genom graden av oxidation av de tre centrala kolatomerna på det isoflavonoida kolskelettet (Adams, 1989). Vissa av isoflavonernas fria hydroxylgrupper anses vara viktiga för effektiv interaktion med östrogenreceptorer (Farnsworth *et al.*, 1975).

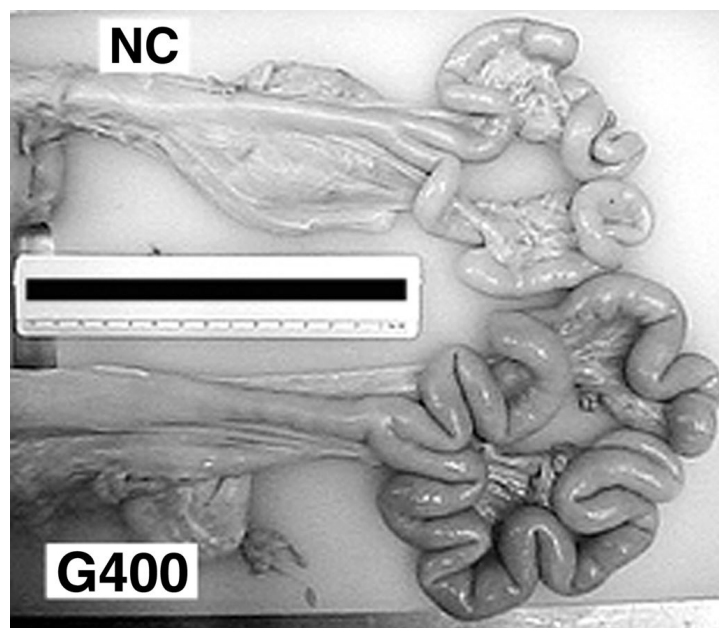


Figur 2. Kemiskstruktur för genistein. Modifiering från Farnsworth *et al.* (1975).

Enligt en genomgång av Farnsworth *et al.* (1975) finns det 220 växtsorter inom åtta olika växtarter som innehåller isoflavonoider. Inom baljväxter är isoflavoner och coumestanser de föreningar som är mest östrogena enligt Adams (1995). Produkter av sojaböna (*Glycine* sp.) kan innehålla upp till 0,25 % isoflavoner, huvudsakligen genistein, diadzein och glycyetin.

Eldridge (1982) visade att 100 g avfettat mjöl från skalade sojaböner innehöll 26,7 mg genistein. Av isoflavonerna i sojamjöl bestod mer än 50% av daidizin och genistein. Förekomst av steroidöstrogener i växter anges för totalt 14 sorter utspridda på åtta arter, däribland baljväxterna lakritsrot (*Glycyrrhiza glabra*) och böna (*Phaseolus vulgaris*) och främst genom steroidöstrogeten estron (Farnsworth *et al.*, 1975).

Ford *et al.* (2006) undersökte effekten av genistein på reproduktionsvävnad hos ovariektomerade gyltor. Via intramuskulär injektion behandlades gyltor med genistein i varierande dos (50, 100, 200 eller 400 mg/dag). Vid en förstudie fick man resultat som visade att ovariektomerade gyltor som injicerats med 12,5 mg och 25 mg genistein per dag inte visade mätbara effekter på reproduktionssystemet. Kontrollgrupper behandlades intramuskulärt med 4 mg estradiolbenzoat eller 4 ml majsolja per dag. Behandlingsperioden varade i tio dagar under vilka injektionerna administrerades med tolvtimmars intervaller. Genom uträkning av foderstaten antog forskarna att en gylta konsumerade cirka 230 g sojaböner per dag. Efter ytterligare beräkningar visade konsumtionen på 725 mg fytoöstroger varav cirka 7 mg genistein och 137 mg genistin. Gyltorna avlivades efter behandlingsperioden och reproduktionsorganen undersöktes. Ingen dos av genistein inducerade en respons så stor som den av 2 mg estradiolbenzoat i stimulering av vävnadstillväxt. Jämfört med kontrollen visades livmoderns våtvikt öka från en dos av 200 mg genistein per dag. Massvikten ökade för livmoder och livmoderhals vid ökad dos av genistein. Genom immunohistokemisk infärgning av livmoderkörtlarna visades en procentuell ökning av progesteronreceptorer i de gyltor som behandlats med 400 mg genistein eller 2 mg estradiolbenzoat per dag. Vid administration av 400 mg per genistein per dag visades en storleksökning av hela reproduktionsorganet (figur 3).



Figur 3. Nästan fördubbling av reproduktionsorganens storlek vid administration av 400 mg genistein/dag (G400) jämfört med reproduktionsorgan från kontrollgylta utan genistein (NC) (Ford *et al.*, 2006). Publicerad med godkännande från Journal of Animal Science och medförfattaren Walter Hurley.

Genisteins effekt på reproduktionsprocessen hos domesticerade djur studerades *in vitro* av Makarevich *et al.* (1997). Vid en mängd av 0,001-1 $\mu\text{g/ml}$ genisteinlösning tillförd till odlade granulosaaceller från gris ökade utsöndringen av tillväxtfaktorn IGF-I. Estradiolutsöndringen

från äggstocksfolliklar hos gris kunde stimuleras av genistein (10 µg/ml) medan samma mängd inte gav någon effekt på utsöndring av PGF-2α och progesteron. När genisteins effekter undersöktes *in vitro* av Vodkova *et al.* (2008) avseende mognaden av äggceller hos gris, drogs bland annat slutsatsen att en östrogen effekt troligen finns. Beroende på dos (13, 40 och 80 µg/ml av medium) visades genistein kunna blockera äggcellernas mognad. Äggcellerna kunde återhämta sig efter behandlingen, dock med vissa abnormaliteter.

Material och metod

Förberedelser

Gyltorna i försöket var av rasen Yorkshire och var cirka sju månader gamla vid försökets början. Totalt ingick tio gyltor i beteendestudien från fem olika kullar (kull 1: nr 7 och 8, kull 2: nr 18 och 19, kull 3: nr 41, 42 och 43, kull 4: nr 58 samt kull 5: nr 992 och 994). Innan flytten till försöksenhetsen hade gyltorna fri tillgång till vatten och utfodrades med foder fritt från växtöstrogener två gånger om dagen. De levde i grupp och kom från fem olika kullar. Gyltornas första brunst noterades. När gyltorna närmade sig den andra brunsten flyttades de till försöksanläggningen. Antal dagar till brunst och inseminering räknat från förflyttningdagen skiljde mellan 5 till 17 dagar.

På försöksanläggningen inhystes gyltorna i enskilda boxar om 2,9 x 1,5 m. Boxarna var placerade i två rader med en mittgång. Boxarna hade långsidor av trä och kortsida mot gången i gallerstål. Gallret möjliggjorde synkontakt mellan djuren. Den enskilda gyltan hade även hörselkontakt med andra gyltor men begränsade möjligheter till noskontakt. De fick fri tillgång på vatten och utfodrades två gånger om dagen med totalt 2,5 kg av ett specialfoder som var fritt från sojaprodukter. I boxen fanns även strö i form av spån och halm. I samma rum fanns också två boxar med suggor och deras smågrisar samt två boxar med en könsmogen galt per box. Efter gyltornas ankomst till försöksanläggningen acklimatiserades de genom att försökspersonal vistades i boxen och utsatte dem för beröring, främst runt öronen, samt utfodrade dem för hand med frukt. Frukten bestod till största delen av äpplen, päron, banan och sharonfrukt. Slumpmässigt utvalda gyltor (nr 7, 8, 18, 19, 992 och 994) fick även en gelatinkapsel innehållande 130 mg genistein morgon och kväll under försöksperioden, vilket motsvarar 2 mg/kg kroppsvikt per dygn. Utfodring av genistein skedde när progesteronkoncentrationen i plasman låg under 10 ng/ml vilket var cirka 4-5 dagar före inseminering. Genom att trycka in kapseln i en frukt kunde kapslarna distribueras på ett smidigt sätt. Detta intag observerades noga för att fastställa att kapseln säkert svalts. Gelatinkapslarna fylldes manuellt innan försökets början med hjälp av våg, vågpapper, spatel och glastratt.

Brunstkontroller genomfördes morgon och kväll varje dag. Kontrollen genomfördes oftast i samband med rengöring av boxarna eller vid provtagningstillfällen. Gyltan släpptes då ut i mittgången och hennes intresse för galtarna noterades. Gyltorna inseminerades ett dygn efter start av visad ståreflex.

Beteendestudien

Beteendestudien pågick i totalt 18 dagar och omfattade tio gyltor. Observationer registrerades var sjätte minut med hjälp av ett etogram (bilaga 1 & 2). Registreringar för en enskild gylta startade när hon anlände till försöksanläggningen. Beteendena registrerades som direktobservationer genom att observatören passerade aktuella boxar eller stod på ett sådant sätt att beteenderegistrering för aktuellt djur var möjlig. Tiden för observationerna var klockan

10-12 på förmiddagen och klockan 13-15 på eftermiddagen. För att få en mer korrekt bedömning av enskild gris delades gyltorna in i två grupper när antalet djur som skulle observeras överskred sex individer. Ena gruppen observerades då med tre minuters förskjutning, och observationstillfällena startades då klockan 10.03 och 13.03 för ena gruppen. Ett tidtagarur som signalerade var sjätte/tredje minut användes. Observatören infann sig några minuter innan observationspassets start och befann sig mellan observationerna i en tom box i slutet av stallgången där foder och halm förvarades. Innan varje observationspass startade passerade därför observatören alla djur.

När gyltorna låg eller stod med bakdelen till under observationstillfällena noterades även deras vulva avseende färg och svullnad genom en fyrgradig skala:

- 1 – normal till lätt rosa, ej nämnvärt svullen
- 2 – rosafärgad med tendens till svullnad
- 3 – mörkare rosa till lätt röd och svullen
- 4 – röd/lila och svullen

Under studiens gång fick vissa djur byta boxplats. Avlivning av samtliga gyltor, med hjälp av bultpistol och avblodning, utfördes i en av boxarna som fanns i stallgången. Alla gyltor i försöket upplevde avlivning av minst en annan gylta genom ljud och lukt. En del gyltor hade också en viss visuell uppsikt av avlivningen och/eller bortforslingen av kadavret. Även det som kan kallas ”naturliga stallaktiviteter” ägde rum under vissa av observationstillfällena, såsom rengöring och utfodring, behandling av övriga djur, insemination, brunstkontroll samt förbipassering av personal.

Provtagning och insemination

För att lättare veta när gyltan började närma sig brunst togs blodprover i jugularvenen för analys av progesteronkoncentrationen. Proven samlades in i 10 ml EDTA-rör behandlade med Trasylol® (Aprotinin 10000 KIE/ml, Bayer) medan gyltan immobiliserades med hjälp av en brems. Det uppsamlade provet förvarades i isbox och centrifugerades inom 20 minuter. Proven centrifugerades i 20 minuter med ett varvtal på 3000 per minut. Med hjälp av en glaspipett kunde sedan blodplasma överföras till två plaströr. Rören förseddes med plastkork och placerades i frysen (-18°C). Delar av blodproven analyserades på progesteronhalten för att detektera förändringar då gyltan misstänktes var på väg in i brunst. Försök att sätta permanentkateter i örat gjordes när progesteronhalten i provet var låg, cirka 10 nmol/l. Permanentkateter behövdes för att underlätta kommande provtagningar. När katetern skulle sättas fanns i regel fyra personer närvarande. Ingreppet skedde i djurets box och startades med att djuret sederades intramuskulärt med 10ml Stresnil® som innehåller den aktiva substansen Azaperon (40 mg/ml injektionsvätska, Bayer). Efter cirka 20-30 minuter injicerades ytterligare 5-10 ml om djuret fortfarande reagerade nämnvärt på beröring. Gyltans öron inspekterades för att finna lämplig ven. Örat rakades och rengjordes med Jodopax. En brems användes när ingreppet utfördes då grisen inte var fullkomligt sederad. Med hjälp av ett skalpellblad gjordes ett snitt i huden och katetern fördes in i kärlet. För att förebygga infektion användes ett biologiskt klister (Vetbond från 3M) i snittytan runt katetern. Infarten fylldes med några milliliter Heparin för att förhindra koagulation. Öppningen på katetern tejpades fast och ytterligare tejp sattes över för att skydda mot smuts. Man lyckades inte sätta permanentkateter på alla gyltor.

För de gyltor som hade permanentkateter i örat togs 10 ml blod morgon och kväll fram till två dagar efter inseminering. För att underlätta provtagningen fanns två personer på plats. En

utfodrade djuret med frukt för att få henne stilla medan den andra samlade blodprovet. Koagulering i katetern förhindrades genom tillförsel av en heparinlösning direkt efter provtagningen. Från övriga försöksdjur, dvs. de utan kateter, togs bara prover från jugularvenen för att detektera brunst genom progesteronkoncentrationen enligt följande: Gylta nr 8 provtogs sex dagar innan inseminering; nr 41 provtogs från tio dagar fram till sex dagar innan inseminering; nr 42 provtogs sjutton dagar innan inseminering och från elva fram till fem dagar innan inseminering förutom dag åtta; nr 43 provtogs sex, fyra och tre dagar innan inseminering samt nr 994 provtogs från sex fram till fyra dagar innan inseminering.

Insemination genomfördes på gyltorna cirka 12-24 timmar efter att de visat ståreflex för galt. Under inseminationen hade gyltan syn- och noskontakt med galt. För de gyltor som inte hade kateter genomfördes en konventionell insemination där en person inseminerade och en annan stimulerade gyltan med hjälp av tryck och beröring. Vid inseminering av de grisar som hade permanentkateter krävdes sex personer. Blodprover (10 ml) togs då kontinuerligt innan/under och efter inseminationen.

Progesteronanalys

Analys av samtliga plasmaprover utfördes igen efter djurförsökets slut, då de tidigare progesteronanalyserna utförts vid olika tillfällen, och delades upp på två dagar. Vid analysen användes Coat-a-Count Progesterone kit (Siemens) vilket innehåller ¹²⁵I-märkt progesteron som under en viss tid konkurrerar med provets progesteron om att fästa på antikroppsytan i ett provrör. Dessa antikroppar är bundna till provrörsväggen vilket gör att man genom en gammarräknare kan räkna ut fraktionen av det radioaktiva progesteronet. Detta värde kan därefter konverteras för att få ut mätvärden för provets progesteroninnehåll.

Aktuella plasmaprover tinades till rumstemperatur före analysstart. Två 12x75 millimeter stora polypropylenrör märktes upp för att fungera som Total (kontroll) och NSB (non-specific binding). Märkning skedde även för antikroppsbehandlade rör i samma storlek som ovan. Alla rör märktes upp i duplikat. 100 µl av standard och 100 µl prov pipetterades ner i respektive rör efter att de först omrörts av en vortexmixer. Mellan varje pipettering byttes pipettspets för att undvika kontaminering. Före varje ny pipettering pipetterades den vätska som redan fanns i röret några gånger då progesteron har en tendens att absorberas av plast. Inom tio minuter tillsattes 1 ml ¹²⁵I progesteron till varje rör och innehållet blandades med hjälp av vortexmixer. Rören inkuberades i vattenbad (37°C) under en timme. Efter inkubering tömdes samtliga rör noga förutom Totalen. Rören torkades utvändigt med Kleenexpapper och sattes sedan i en gammarräknare. Resultatvärden från gammarräknaren överfördes till dator för bearbetning och utskrift.

Östrogenanalys

Analys av samtliga plasmaprover utfördes efter djurförsökets slut och delades upp i två omgångar på två dagar vardera. Första dagen späddes 300 µl prov med 300 µl destillerat vatten och förvarades sedan i kyl (2-8°C). Rutiner för pipettering utfördes enligt ovan. Dag två användes ett högkänsligt Salivary 17-β-estradiol enzyme immunoassay kit (Salimetrics) enligt dess instruktioner men med vissa modifikationer. När samtliga delar av kittet och provlösningarna fått rumstemperatur påbörjades analysen. 600 µl fosfatbuffert tillfördes i sex rör. Sedan pipetterades 600 µl av medföljande estradiolstandard i ett rör. Därefter skedde en spädningsserie med hjälp av de sex rören där 600 µl pipetterades och vortexmixer användes innan varje spädning. Kittets medföljande kontrollvätskor (hög och låg koncentrat av estradiol) späddes vardera genom att tillsätta 300 µl destillerat vatten till två rör innehållande

300 µl kontroll. 200 µl av provlösningarna, standardspädningen och kontrollerna pipetterades ner i enskilda brunnar. Samma mängd fosfatbuffert pipetterades till fyra brunnar för att fungera som kontroll och NSB (non-specific bindning). Alla brunnar var behandlade med antikroppar förutom de två NSB-brunnarna som var utbytta mot speciellt märkta brunnar vilka inte innehöll några antikroppar. Brunnarna täcktes med tillhörande plastfilm och inkuberades på skak-platta (cirka 500 varv per minut) i en timme. Efter ytterligare en timmes inkubation tillsattes 100 µl av en enzymblandning till vardera brunn. Denna blandning hade innan inkubationens slut skapats genom att tillsätta 15 µl enzymkonjugat till ett rör innehållande 12 ml fosfatbuffert. Brunnarna täcktes sedan på nytt och inkuberades på skak-platta (cirka 500 varv per minut) i fem minuter. Efter ytterligare inkubation i en timme och 55 minuter tvättades brunnarna med buffertlösning. Då brunnarna var tvättade pipetterades 200 µl tetrametylbenzidine lösning i samtliga brunnar. Därefter väntade fem minuters inkubation på skak-platta. Brunnarna täcktes sedan med aluminiumfolie då 25 minuters inkubation i mörker väntade. Även lampor i laborationsrummet släcktes ner. Efter denna inkubation pipetterades 50 µl stopvätska i alla brunnar. Brunnarna sattes sedan på skak-plattan i tre minuter för att invänta en färgskiftning till gul i samtliga brunnar. Skillnaden i absorbans mellan brunnarna mättes och konverterades till analysvärden. Med hjälp av datorprogrammet Multicalc[®] beräknades en standardkurva på analysvärdena. Genom att sedan sätta in analysvärdena mot den standardkurvan erhöles brunnarnas innehåll av estradiol i pg/ml.

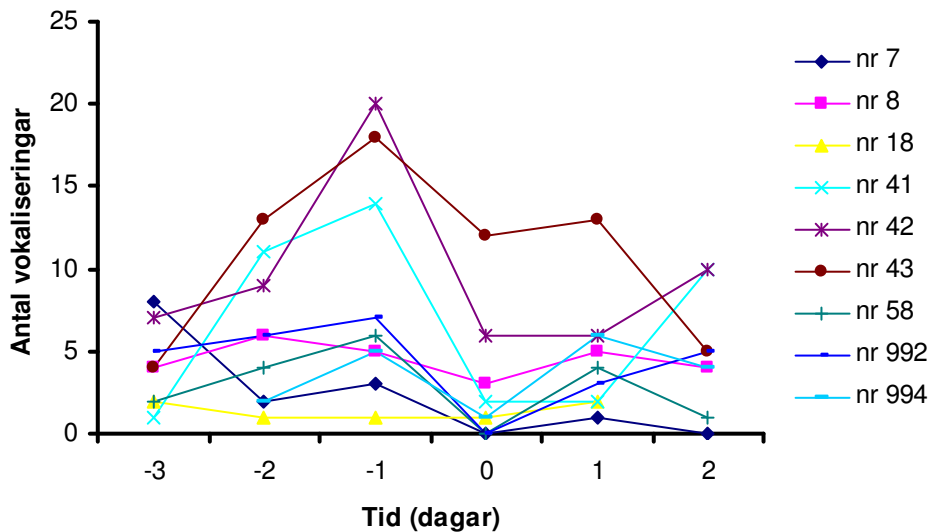
Resultat har bearbetats statistiskt genom MIXED modell i SAS (Statistical Analysis System program package, version 9.1, SAS Institute INC., Cary, NC, USA). Där det inte framgår av texten att resultaten bearbetats statistiskt har de genom enklare beräkningar summerats genom dataprogrammet Microsoft Excel[®].

Resultat

Gylta nr 19 visade aldrig någon tydlig brunst och har därför uteslutits från resultatberäkningarna. Resterande nio gyltor bekräftades dräktiga genom identifiering av befruktade ägg efter avlivning. Cirka 75-80 % av totalantalet ovulerade ägg (representerade av totalantal gulkroppar i äggstockarna) var befruktade.

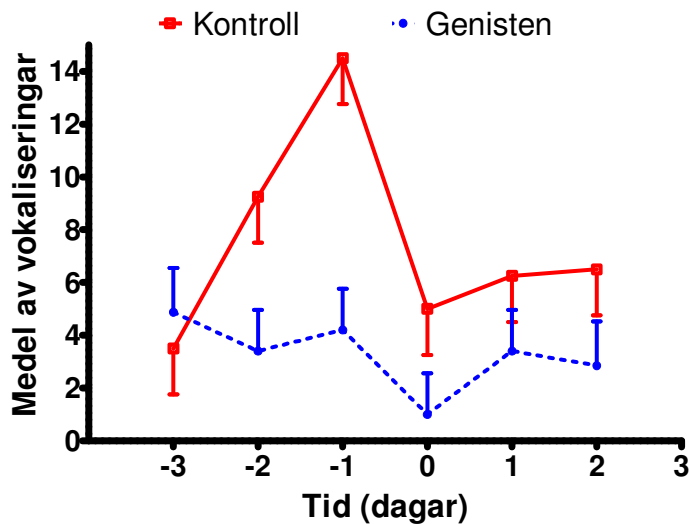
Beteendestudien

Alla data från beteendestudien överfördes till Microsoft Excel. Genom summering av totalobservationer per dag beräknades värden av aktiviteterna går och står till kategorin *aktivitet* samt värdena av kort grymt, lång grymt, skäller och skriker till *vokalisering*. Resultaten för kategorin *vokalisering* tyder på skillnader mellan vissa individer (figur 4). De gyltor som hade flest antal *vokaliseringar* en och två dagar före inseminering (id-nummer 41, 42 och 43) utfodrades alla med foder fritt från genistein.



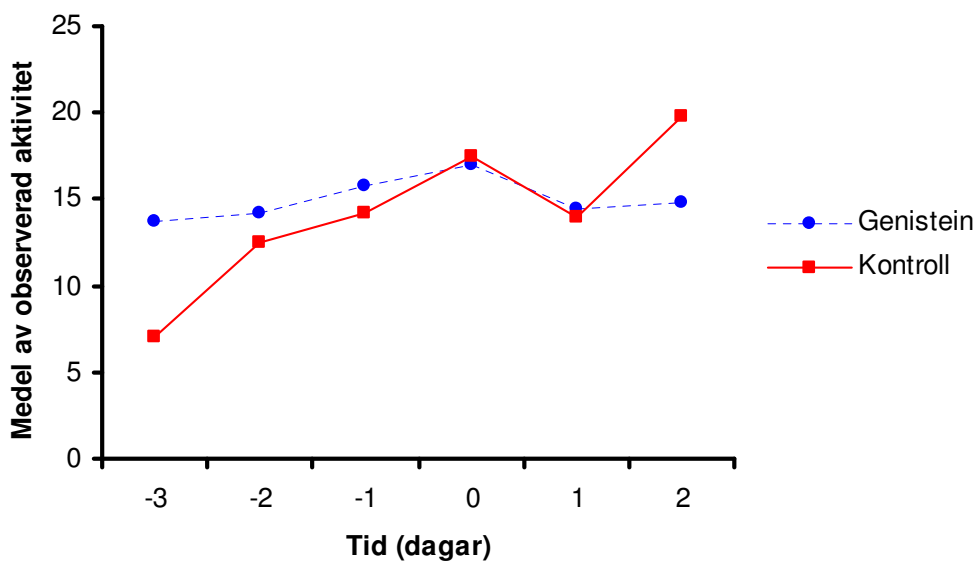
Figur 4. Antal *vokaliseringar* per dag och gris (id-nummer; 7, 8, 18, 41, 42, 43, 58, 992 och 994) före, under och efter inseminering (dag 0). Id-nummer 7, 8, 18, 992 och 994 utfodrades med genistein.

Genom beräkningar i SAS sågs att de individer utan genistein i dieten (id-nummer 41, 42, 43 och 58) *vokaliserade* mer en och två dagar innan insemination ($P < 0.001$) jämfört med de grisar som utfodrades med genistein (figur 5). Gyltor som utfodrats med genistein uppvisade färre fluktuationer i *vokaliseringsantal* mellan försöksperiodens olika dagar i förhållande till kontrollgruppen.



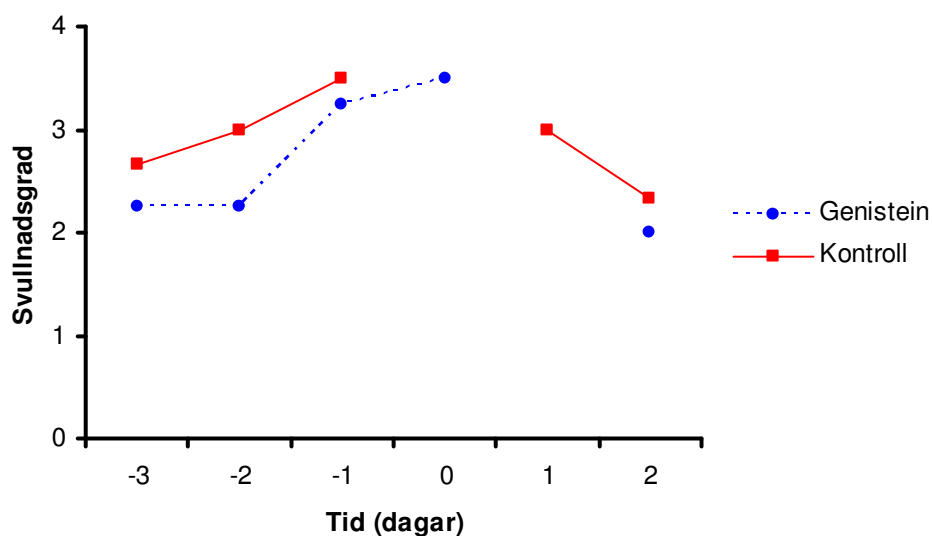
Figur 5. Medelvärden av antal *vokaliseringar* per dag för grisar utfodrade med genistein och kontrollgrupp före, under och efter inseminering (dag 0) beräknat genom MIXED modell i SAS.

Kategorin *aktivitet* från beteendestudien visade genom summering av värdena per dag i de olika fodergrupperna inte några direkta individskillnader. Den statistiska beräkningen för *aktivitet* visade inte heller några signifikanta skillnader mellan fodergrupper (Figur 6). Statistisk skillnad i djurens *aktivitet* kunde endast observeras mellan dagar där *aktiviteten* ökade närmare brunst för båda grupperna.



Figur 6. Medelvärde av *aktivitetsfrekvens* per dag mellan grisar utfodrade med genistein (n=5) och kontrollgrupp (n=4) före, under och efter inseminering (dag 0). Kategorin *aktivitet* är ett mått av observationerna ”gå” och ”stå”.

Vid beräkning av resultaten från noteringarna av vulvasvullnad sågs inga skillnader mellan fodergrupper (figur 7).

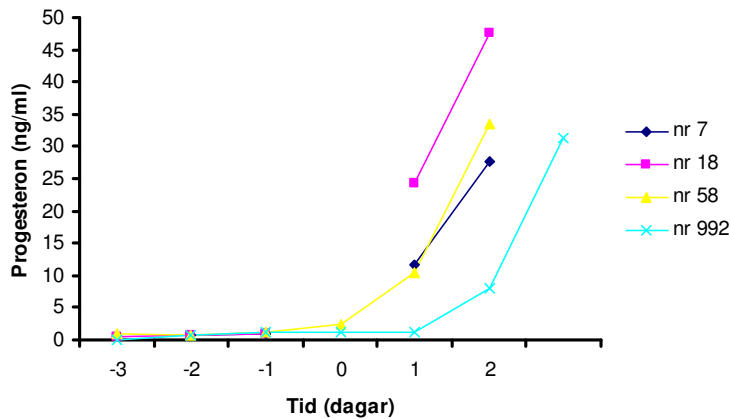


Figur 7. Noterade vulvaförändringar (1 – normal till lätt rosa, ej nämnvärt svullen, 2 – rosa färgad med tendens till svullnad, 3 – mörkare rosa till lätt röd och svullen, 4 – röd/lila och svullen) mellan grisar utfodrade med genistein och kontrollgrupp före, under och efter inseminering (dag 0).

Värden för svullnadsgrad noterades inte konsekvent för samtliga individer. Ovanstående diagram (figur 7) innehåller därför olika antal observationer (mellan en till åtta individer per dag).

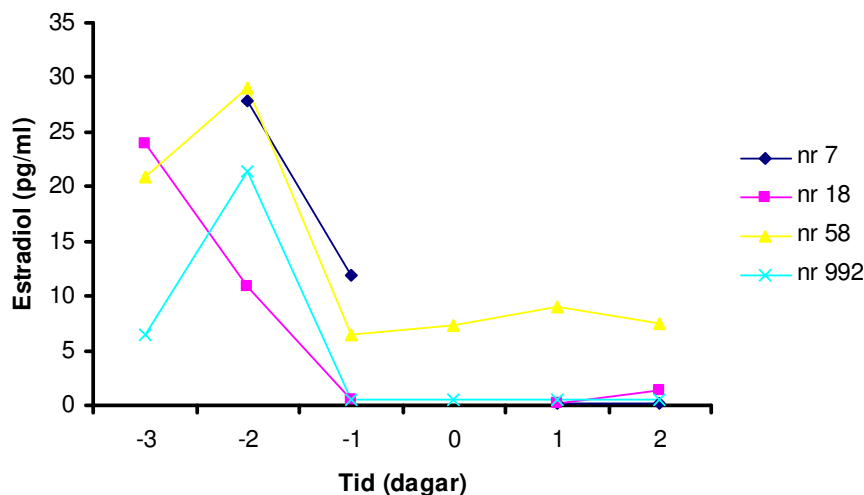
Hormonanalyser

Då alla gyltor inte hade permanent kateter samlades inte tillräckligt många prover in för att möjliggöra statistiska beräkningar på hormonella skillnader mellan fodergrupperna. Nedan beskrivs analysresultaten från de fyra gyltor (id-nummer 7, 18, 58 och 992) med flest plasmaprover kring brunst. Figur 8 visar progesteronvärden (ng/ml) från tre dagar innan insemination (dag 0) till två dagar efter där man kan se skillnader mellan dagar. Ingen skillnad kunde dock ses mellan de grisar som utfodrats med genistein jämfört med en individ utan genistein i dieten dagarna kring insemination. Generellt för samtliga individer är att progesteronvärdet är lågt före insemination (dag 0) och stiger sedan markant.



Figur 8. Medelvärdet av progesteronvärden (ng/ml) per dag mellan grisar utfodrade med genistein (nr 7, 18 och 992) och kontroll (nr 58) före, under och efter inseminering (dag 0).

Resultaten från östradiolanalysen visar skillnader mellan dagar (figur 9). Samtliga gyltor i analysen hade en östradioltopp någon dag innan insemination (dag 0) som följdes av en kraftig sänkning och därefter låga värden.



Figur 9. Medelvärdet av östradiol-17 β (pg/ml) per dag mellan grisar utfodrade med genistein (nr 7, 18 och 992) och kontroll (nr 58) före, under och efter inseminering (dag 0).

Diskussion

Denna studie presenterar fynd som inte tidigare visats angående påverkan av växtöstrogener på gyltans vokalisering före brunst. De gyltor som inte utfodrades med genistein hade högre vokaliseringsfrekvens dagarna innan brunst jämfört med dem som utfodrats med genistein. Generellt var fluktuationerna mellan de olika parametrarna i försöket också större för gyltorna utan genistein i foderstaten, dock ej alltid signifikanta. Flertalet studier av växtöstrogeners reproduktionseffekter är utförda på idisslare (Adams, 1989). Då kor utfodrats med en stor mängd soja i fodret har studier visat att brunst och ovulation störts genom växtöstrogenernas effekt på det centrala nervsystemet (Woclawek-Potocka *et al.*, 2005). En studie som undersökt brunstvokalisering hos kvigor med vanlig foderstat visade att frekvensen ökade drastiskt innan detekterbar brunst (Schön *et al.*, 2007). Det fanns ingen koppling mellan denna frekvensökning och djurens progesteronkoncentrationer. Det senare kunde tyvärr inte undersökas i den här studien, på grund av begränsat antal blodprover.

Grisars beteende

Trots att grisar i hög grad kommunicerar med hjälp av ljudsignaler, är inte innebörden av de olika vokaliseringarna helt klarlagd (Pond & Mersman, 2001). En del beteendestudier har inte något större fokus på vokalisering vilket har gjort det svårt att hitta jämförelser med fynden i denna studie. Det har visats att vokaliseringsfrekvensen bland unga kastrerade hangrisar kan korreleras till deras nivå av upphetsning och endokrin balansen i binjurebarken (von Borell & Ladewig, 1992; Schrader & Todt, 1998). När kastrerade hangrisar utsattes för en ny miljö ökade vokaliseringsfrekvensen av skrik/grymtningar och deras adrenalinkoncentration (Schrader & Todt, 1998). Trots att individvariationen var stor har en ökad vokaliseringsfrekvens i ny miljö också visats öka binjurebarkens reaktivitet (von Borell & Ladewig, 1992).

Mekanismerna bakom sexuellt beteende består bland annat av signaler som tas emot och omkopplas i hjärnan (Signoret, 1970). Vid brunst är det suggan/gyltan som tar initiativ till uppvaktning och söker aktivt efter galten. Hennes vokaliseringar har dock visats spela mindre roll för galten i jämförelse med hennes övriga kroppssignaler. Ökad vokalisering noterades då en brunstig gylta försökte forcera en gallerbarriär (de Jonge *et al.*, 1994) vilket skulle kunna tolkas som ett uttryck på frustration. Gyltor har noterats vokalisera mer när en människa är närvarande (Marchant *et al.*, 2001) och inhysningsformen kan påverka grisars beteende både när det gäller miljö och sällskap (Altmann, 1941; Dailey & McGlone, 1997; Pedersen *et al.*, 1997). De gyltor som levt enskilt har uppvisat större intresse för mänsklig kontakt jämfört med gyltor som var inhysta parvis (Pedersen *et al.*, 1997). Innan beteendestudien i föreliggande arbete påbörjades var det därför viktigt att observationspersonen vände gyltorna vid att denne ofta gick i gången. Den aspekten förstärktes av en studie som visat att gyltors rädsla för människan minskar efter upprepad mänsklig kontakt (Hemsworth *et al.*, 1986). Marchant *et al.* (2001) använde sig av videoinspelning för att registrera ljud och rörelsemönster från gyltor under deras försök. Det skulle vara en önskvärd metod om denna studie skulle genomföras på nytt, eftersom direktobservationer till större grad påverkas av den mänskliga faktorn. Videoinspelning med ljudupptagning skulle även möjliggöra studier av vilken ljudfrekvens vokaliseringarna har.

Rödaktig, svullen vulva, rastlöshet och frekventa vokaliseringar beskrevs som tecken på brunst redan år 1941 (Altmann) och Signoret (1970) fann att suggor rör sig mer under brunstperioden. Dessa beskrivningar stämmer överens med de resultat som framkommit av denna studie angående svullen vulva och aktivitetsfrekvens. Vid en mätning av gyltors

stressrespons under brunst sågs ingen skillnad i hennes beteende i hemboxen eller sexuella mottaglighet i jämförelse med en kontrollgrupp som inte utsatts för stress (Pedersen *et al.*, 1997). Detta skulle kunna utesluta den eventuella stressinverkan som någon gylta kanske upplevde i samband med försöket. Att dock helt avskriva stressinverkan känns dock inte helt korrekt. Frågan är till exempel hur gyltorna egentligen uppfattar och reagerar fysiologiskt på syn-, lukt- och hörselintryck från avlivning av andra gyltor.

I denna studie observerades gyltor från fem olika kullar. På grund av det låga antal individer från varje kull i de olika fodergrupperna kunde ingen statistisk analys göras utifrån kulltillhörighetens inverkan på försöket. Åsikterna går isär angående frågan om det går att utskilja olika individtyper hos gris. Jensen (1995) och Spoolder *et al.* (1996) har inte funnit någon skillnad när det gäller individuella överlevnadstyper eller beteendetyper. Hessin *et al.* (1993) har dock visat att smågrisar som kategoriserats till två grupper reagerade liknande inom kategorigruppen och individuella variationer i reaktioner på människan har visats vara stora enligt Marchant *et al.* (2001). Skillnader har till exempel registrerats relaterat till kullursprung och därmed kan inverkan av de individuella skillnader som finns i detta försök ha haft betydelse.

Hormoner och genistein

Resultaten från östradiol- och progesteronanalyserna stämmer i stort överens med vad som tidigare var känt, dock med viss förskjutning. Progesteronnivåerna kring brunst var låga i enlighet med tidigare fynd (Erb 1967; Pond & Mersmann, 2001) och visade inte några koncentrationsskillnader mellan fodergrupperna. Skillnader i mängden östradiol mellan fodergrupperna kunde inte beräknas statistiskt på grund av lågt antal prover. Det skulle ha varit väldigt intressant att kunna jämföra östradiolnivåerna i de olika fodergrupperna. Maximalnivåer för östradiol hos gyltor visade sig i enlighet med tidigare studier (Van de Wiel *et al.*, 1981) på gyltor ligga precis före/i början av brunsten, dock med viss förskjutning där östradioltoppen inträffade cirka en dag tidigare än vad andra visat. Ovulation sker cirka två dygn efter brunsten startar (Pond & Mersmann, 2001). Då alla gyltor i försöket konstaterades dräktiga kan dock inte inseminationen ha skett för sent. Förskjutningen i försöket är något förbryllande och kan möjligen förklaras med sen brunstdetektion i kombination med stresspåslag då bland annat avlivning förekom relativt frekvent under hela försöksperioden. Stresspåverkan är väldigt individuellt och dess inverkan på reproduktionen är inte helt utredd.

Många publicerade beteendestudier på gris saknar foderdeklaration vilket gör det svårt att jämföra med den här studiens resultat. De hormonvärden och beteenden som anses normala idag kanske bygger på resultat från djur som fått foder med soja i. Fodrets näringsinnehåll kan indirekt påverka reproduktionskapaciteten men anses dock vara svårt att studera då många andra faktorer spelar in såsom miljöfaktorer och individskillnader (Miller *et al.*, 1991). Trots att mycket information om grisens nutrition dokumenterats finns fortfarande många luckor och forskningsresultat för många näringsämnen är inte samstämmiga. Vulvadiametern hos gyltor har visats öka vid hög utfodring (20 %) av sojamjöl jämfört med kontrollgrupp utan sojamjöl i foderstaten (Drane *et al.*, 1981). Däremot visade inte den studien någon skillnad histologiskt eller på reproduktionsorganens vikt mellan de gyltor som utfodrats med hög andel sojamjöl och kontrollgruppen. Sojamjöl innehåller växtöstroger (bland annat isoflavonen genistein) som kan binda till djurets östrogenreceptorer och orsaka en östrogenliknande effekt (Adams, 1995). Det är en ratio av växtöstroger i förhållande till östrogen som avgör om växtöstroger agerar additivt eller antagonistiskt till östrogen (Adams, 1989;1995). Om dessa två ämnen då kan tävla om samma bindningsyta bidrar det eventuellt till att mängden östrogen som bildas minskar. Därmed minskar även de fysiologiska processer som påverkas av

östrogen, utöver de som sker via bindning till samma receptorer som växtöstroget bundit till. Tidigare studier har visat att ökad dos av estradiolbenzoat ökar attraktion och antal bestigningar av galt samt ger ökad brunstvaraktighet (Dial *et al.*, 1983; Ford, 1985) vilket visar att ökad östrogenmängd ökar de beteenden som påverkas av östrogen. Den antagonistiska balansen mellan genistein och östrogen skulle kunna förklara den minskade vokaliseringsfrekvens som observerades i denna studie hos de gyltor utfodrade med genisten då östrogen anses ligga bakom brunstbeteendet såsom ökad vokalisering. Detta argument håller dock inte helt då inga andra egenskaper såsom vulvasvullnad och aktivitetsfrekvens som också setts inverkas av östrogen inte visade på någon skillnad mellan fodergrupperna.

Kanske det finns en molekylär förklaring till skillnaden i vokaliseringsfrekvens mellan fodergrupperna då vissa av isoflavoners fria hydroxylgrupper anses vara viktiga för effektiv interaktion med östrogenreceptorn (Farnsworth *et al.*, 1975). Växtöstroget har dock en lägre affinitet till östrogenreceptorn jämfört med steroidöstrogener och är också mer instabila vid transformering och bindning till DNA (Adams, 1989;1995). Det är först vid en administration av 200 mg genistein per dag som våtvikten av livmodern setts öka hos gyltor enligt Ford *et al.* (2006). Dubbleras dosen (400 mg/dag) visas en ökad utveckling av hela reproduktionsorganet samt även en procentuell ökning av infärgade progesteronreceptorer i livmoderkörtlarna. Dessa mängder är mycket högre än de som administrerats under detta försök. Skulle högre doser ha använts under försöket kanske fler och tydligare resultat kunnat uppnås.

Slutsats

De gyltor som utfodrads med genistein kring brunst visar på lägre och jämnare vokaliseringsfrekvens i jämförelse med gyltor utan genistein i foderstaten. Detta har tidigare inte visats och förklaringen till dessa resultat är enbart hypotetiska. Östrogen anses inducera de yttre brunstsymtomen och genistein kan verka som en antagonist till östrogen. Frågan kvarstår dock varför enbart vokaliseringsfrekvensen visade på skillnad och ingen annan av de undersökta beteendeparametrarna om det nu är genisteins inverkan på östrogen som påverkat vokaliseringsfrekvensen. Inverkande faktorer såsom typer av östrogenreceptorer och variation i bindingsgrad samt påverkan av ålder, släktskap, individtyp, stress, inseminationstidpunkt och de normalt stora fluktuationerna i östradiolkoncentrationen under ett dygn kan diskuteras vidare. Ytterligare studier och grundligare försök med mer provtagning samt videoinspelning med ljudupptagning skulle förmodligen ge ökad förståelse av hur genistein kan inverka på gyltans vokaliseringsfrekvens vid brunst.

Tack

Stort tack till min handledare Mattias Norrby för stöd, kunskap och tålmod. Tack också till Andrzej Madej som med sin expertis visat vägen vid arbetets olika vägskäl och min examinator Elisabeth Persson för din tid och synpunkter. Vill även rikta ett tack till Gunilla Forslund, Åsa Eriksson och Sören Johansson samt alla andra som på något sätt varit delaktiga i detta projekt. Sist vill jag tacka min dotter som till viss del varit delaktig i detta arbete och till hela min familj för allt stöd under arbetets gång.

Referenser

- Adams, N.R. 1995. Detection of the effect of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of animal science*. 73:1509-1515.
- Adams, N.R. 1989. Phytoestrogens in: Toxicants in plant. Cheeke, P.R. (ed) Vol.IV. 23-51. CRC Press.
- Altmann, M. 1941. Interrelations of the sex cycle and the behaviour of the sow. *Journal of comparative psychology*. 31:481-498.
- Crenshaw, M.A. & Danielson, D.M. 1985. Raw soybeans for growing-finishing pigs. *Journal of animal science*. 60:725-730.
- Dailey, J.W. & McGlone, J.J. 1997. Pregnant gilt behavior in outdoor and indoor intensive pork production systems. *Applied animal behaviour science*. 52:45-52.
- de Jonge, F.H. Mekking, P. Abbott, K. & Wiepkema, P.R. 1994. Proceptive and receptive aspects of oestrus behaviour in gilts. *Behavioural process*. 31:157-166.
- Dial, G.D. Dial, O.K. Bevier, G.W. Glenn, S.D. & Dziuk, P.J. 1983. Estrous behaviour and circadian discharge of luteinizing hormone in the prepubertal gilt in response to exogenous estrogen. *Biology of reproduction*. 29:1047-1056.
- Drane, H.M. Wrathall, A.E. Patterson, D.S.P. & Herbert, C.N. 1981. Possible oestrogenic effects of feeding soyameal to prepuberal gilts. *British veterinary journal*. 137:283-288
- Einarsson, S. Gustafsson, H. Larsson, K. Swensson, T & Söderqvist, L. 1987. Artificiell insemination och reproduktion, nr 149. *Svensk husdjurskötsel ek. för*. Hållsta, Eskilstuna.
- Eldridge, A.C. 1982. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. *Journal of agricultural and food chemistry*. 30:353-355.
- Farnsworth, N.R. Bingel, A.S. Cordell, G.A. Crane, F.A. & Fong, H.H.S. 1975. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *Journal of pharmaceutical sciences*. 64:717-754.
- Ford, J.J. 1985. Reevaluation of the role of progesterone in stimulating sexual receptivity in estrogen-treated gilts. *Journal of animal science*. 61:36-43.
- Ford Jr, J.A. Clark, S.G. Walters, E.M. Wheeler, M.B. & Hurley, W.L. 2006. Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts. *Journal of animal science*. 84:834-842.
- Foxcroft, G.R. & Van de Wiel, D.F.M. 1982. Endocrine control of the oestrous cycle. *Control of pig reproduction*, 161-177. Butterworth Scientific, London.
- Hemsworth, P.H. Gohyou, H.W. & Dzink, P.J. 1986. Human communication with pigs: The behavioural response of pigs to specific human signals. *Applied animal behaviour science*. 15:45-54.
- Hessing, M.J.C. Hagelso, A.M. van Beek, J.A.M. Wiepkema, P.R. Schouten, W.G.P. & Krukow, R. 1993. Individual behavioural characteristics in pigs. *Applied animal behaviour science*. 37:285-295.
- Jordan, V.C. Mittal, S. Gosden, B. Koch, R. & Lieberman, M.E. 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environmental health perspectives*. 61:97-110.
- Jensen, P. 1995. Individual variation in the behaviour of pigs-noise or functional coping strategies?. *Applied animal behaviour science*. 44:245-255.
- Kuiper, G.G.J.M. Lemmen, J.G. Carlsson, B. Corton, J.C. Safe, S.H. van der Saag, P.T. van der Burg, B. & Gustavsson, J.-Å. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 139:4252-4263.
- Makarevich, A. Sirotkin, A. Taradajnik, T. & Chrenek, P. 1997. Effects of genistein and lavendustin on reproductive process in domestic animals in vitro. *Journal of steroid.biochemistry and.molecular biology*. 63:329-337.

- Marchant, J.N. Whittaker, X. & Broom, D.M. 2001. Vocalisations of the adult female domestic pig during a standard human approach test and their relationships with behavioural and heart rate measures. *Applied animal behaviour science*. 72:23-39.
- Mauget, R. 1982. Seasonality of reproduction in the wild boar. In: D.J.A. Cole and G. Foxcroft (ed.). *Control of Pig reproduction*, 509-526. Butterworth Scientific, London.
- Miller, E.R. Ullrey, D.E. & Lewis, A.J. (ed.) 1991. *Swine nutrition*, 5,457-580. Butterworth-Heinemann, USA
- Pond, W.G. & Mersman, H.J. (ed) 2001. *Biology of the domestic pig*, 152-202. Cornell University Press, Ithaca & London.
- Pedersen, L.J. Jensen, K.H. & Giersing Linder, A-M. 1997. Oestrus and mating behaviour in gilts during boar induced puberty in relation to stress and housing. *Applied animal behaviour science*. 52:13-24.
- Signoret, J.P. 1970. Reproductive behaviour of pigs. *Journal of reproduction and fertility*, *Supplement*. 11:105-117.
- Spoolder, H.A.M. Burbidge, J.A. Lawrence, A.B. Simmins, P.H. & Edwards, S.A. 1996. Individual behavioural differences in pigs: intra- and inter-test consistency. *Applied animal behaviour science*. 49:185-198.
- Schrader, L. & Todt, D. 1998. Vocal quality is correlated with levels of stress hormones in domestic pigs. *Ethology*. 104:859-876.
- Schön, P.C. Hämel, K. Puppe, A. Tuchscherer, A. Kanitz, W. & Manteuffel, G. 2007. Altered vocalization rate during the estrous cycle in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 90:202-206.
- Sjaastad, ØV. Hove, K. & Sand, O. 2003. *Physiology of domestic animals*, 622-654. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Tillson, S.A. & Erb, R.E. 1967. Progesterone concentration in periheral blood plasma of the domestic sow prior to and during early pregnancy. *Journal of animal science*. 26:1366-1368.
- van de Wiel, D.F.M. Erkens, J. Koops, W. Vos, E. & van Landeghem, A.A.J. 1981. Periestrous and midluteal time courses of circulating LH, FSH, prolactin, estradiol-17 β and progesterone in the domestic pig. *Biology of reproduction*. 24:223-233.
- Vodkova, Z. Rajmon, R. Petr, J. Klabanova, P. & Jillek, F. 2008. Effects of genistein and genistein on in vitro maturation of pig oocytes. *Czech journal of animal science*. 53:1-8.
- von Borell, E & Ladewig, J. 1992. Relationship between behaviour and adrenocortical response pattern in domestic pigs. *Applied animal behaviour science*. 34:195-206.
- Woclawek-Potocka, I. Bah, M.M. Korzekwa, A. Piskula, M.K. Wiczowski, W. Depta, A. & Skarzynski, D.J. 2005. Soybean-derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy. *Experimental Biology and Medicine*. 230:189-199.

Bilaga 1. Etogram

<i>Beteende/6 minut</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Går																				
Står																				
Sitter																				
Ligger ner																				
Sover																				
Vilar																				
Äter foder																				
Tuggar																				
Dricker																				
Vatten nippeln																				
Inredning																				
Luktar																				
Tuggar																				
Bökar																				
Bäddar																				
Vokaliserar																				
Kort grymt																				
Lång grymt																				
Skäller																				
Skriker																				
Allmänt intryck																				
Övrigt/ Felkälla																				

ID nr:

Datum:

Tid:

Bilaga 2. Etogram beskrivning

Går: Rörelse av ett eller flera ben när grisen är stående.

Står: Står stilla på alla fyra benen.

Sitter: Sittande ställning där bakbenen vilar mot golvytan.

Ligger ner - Vilar: Ligger ned med hela kroppen med öppna eller delvis öppna ögon

Ligger ner - Sover: Ligger ned med hela kroppen med slutna ögon. Kan inte grisens ögon ses till exempel om den vilar med huvudet bort antas att den sova.

Äter foder: Äter foder eller foder rester från foder tråget eller från den plats där det är synbart att grisen äter foder rester.

Tuggar: Tuggar på något från golvet som inte kan ses som delar av fodergivan det vill säga halm eller andra partiklar på golvet.

Dricker: Dricker från vatten tråget eller från vatten nippeln.

Vattennippeln: Leker med vatten nippeln på ett sådant sätt så att grisen får i sig lite vatten men inte uppenbart är tröstig.

Inredning - Luktar: Nosar på inredningen så som väggar och galler. Golvet och golvmaterial räknas inte som inredning.

Inredning - Tuggar: Tuggar/gnager på inredningen så som väggar och galler. Golvet och golvmaterial räknas inte som inredning.

Bökar: Nosar/luktar på golvet och/eller flyttar golvmaterial med trynet. Skrapar med klöven på golvet för att få fram något.

Bäddar: Flyttar golvmaterial med trynet och/eller munnen så att små högar bildas som kan anses vara till för bäddning. Vid osäker bedömning på skillnad mellan böka/bädda kommer beteendet böka att användas.

Vokaliserar - Kort grymt: Kort frekvent grymt.

Vokaliserar - Lång grymt: Grymt som varar någon sekund längre än en "kort grymt" och är dovre i tonen.

Vokaliserar - Skäller: Liknar ett hundskall. "Kort grymt" som är högre i tonen.

Vokaliserar - Skriker: Skrikande ljud som varar olika länge beroende på situation.

Allmänt intryck: Bedömning på grisens generella beteende under observations tid, nervös för främmande ljud, svullen blygd, aktiv, etcetera.

Övrigt/Felkälla: Utrymme för notering av avvikande händelse, ljud eller annan aktivitet runt boxen som kan tänkas stört grisens vanliga beteenderepertoar.