

Vaikuttaako karsinan lattiamateriaali tai vasikoiden siirto niiden veren kortisoli- tai kasvuhormonipitoisuuksiin?

Laura Hänninen¹⁾, Peter Løvendahl²⁾, Anne Marie de Passillé³⁾ ja Jeffrey Rushen³⁾

¹⁾ *Eläinten hyvinvoinnin tutkimuskeskus, PL 57, 00014 Helsingin Yliopisto*

²⁾ *Animal Breeding and Genetics, Research Centre Foulum, Po Box 57, DK-8830, Denmark*

³⁾ *Dairy and Swine Research and Development Centre, PO Box 90, QCJLM IZ3, Canada*

Johdanto

Nautojen ja muiden kotieläinten stressiä mitattaessa on perinteisesti keskitytty kortisoliin ja sen tuotantoon vaikuttavien hormonien mittaukseen. Kasvuhormonin erittyminen on myös stressille altis. Kortisolin konsentraatio ja pulssien kesto vaikuttavat kuitenkin kasvuhormonin erittymiseen stressitilanteissa moni-ilmeisesti joko vähentäen tai lisäten kortisolin tuotantoa (Giustina and Veldhuis 1998).

Kortisolin ja kasvuhormonin mittaus ei ole kuitenkaan ongelmattonta, sillä molemmilla hormoneilla on vahva vuorokausirytmiksi sekä pulssimainen erittymistapa (Lefcourt et al. 1993, Lefcourt et al. 1995). Tämän vuoksi käytettäessä kasvuhormonin tai kortisolia stressireaktion mittarina, on näytteitä otettava tiheästi ympäri vuorokauden (Ladewig and Smidt 1989). Woolliams yms. (1993) mukaan perinteiset tilastolliset menetelmät eivät riittävästi tunnista pitkiä pulsseja.

Uni on yksi yhteisistä kasvuhormonin ja kortisolin tuotannon säätelytekijöistä ihmisillä ja laboratorioeläimillä (Giustina ja Veldhuis, 1998). Naudoilla unen ja kasvuhormonin tai kortisolin erittymisen yhteyttä ei ole vielä osoitettu. Kasvuhormonin ja kortisolin erittymiseen tiedetään aikuisilla nautoilla vaikuttavan kuitenkin samat tekijät, jotka muuttavat nautojen lepokäyttäytymistä: Lattian kovuus vähentää aikuisten nautojen lepoa (Haley et al., 2001) sekä lisää niiden kortisolin erittymistä (Ladewig and Smidt 1989). Kun lehmien makuullemeno estyy, niiden kasvuhormonin tuotanto vähennee (Munksgaard and Løvendahl, 1993). Ei kuitenkaan ole tutkimuksia lattiamateriaalin vaikutuksista nuorten vasikoiden kasvuhormonin tai kortisolin tuotantoon.

Nuoria vasikoita uudelleen ryhmitellään ja siirrellään kasvatusyksiköstä toiseen. Siirtojen otaksutaan olevan yksi tuotantovaiheen stressitekijöistä, joka voi muuttaa mm. uni- ja aktiivisuusrytmejä (mm. Veissier et al. 1989) ja oletamme sen vaikuttavan myös kortisoli- ja kasvuhormonin vuorokausirytmisiin.

Tässä tutkimuksessa tarkastelimme kasvuhormonin ja kortisolin pulssimaista erittymistapaa ja vuorokausirytmisiä vasikoilla jotka olivat 8 viikon ajan kasvaneet joko kova- tai pehmeälustaisessa yksilökarsinassa. Mahdollista siirron stressivaikutusta vasikoiden kasvuhormoni ja kortisolin erittymiseen tarkasteltiin siirtämällä puolet koevasikoista identtiseen, mutta eläimille vieraaseen kasvuympäristöön.

Aineisto ja menetelmät

Noin viikon ikäiset Holstein-rotuiset sonnivasikat (keskipaino 48 ± 1.0 kg) satunnaistettiin jompaankumpaan kahdesta yksilökarsinakäsittelystä 9 – 10 viikoksi: 12 vasikkaa karsinoihin, joissa oli betonilattia (BETONI) ja 12 vasikkaa karsinoihin, jossa oli betonilattian päällä n. 5cm paksu kumimatto (Cloud 9, NRI Industries, Kanada) (KUMIMATTO). Molemmat yksilökarsinatyytit olivat samankokoisia (1.05m * 1.8m) ja ne kuivitettiin päivittäin kahdella lapiollisella (n. 2 kg) sahanpurua. Vasikoilla oli rajallinen näkö- ja kosketuskontakti naapurikarsinoiden vasikoihin metallitankoseinien läpi. Karsinatyytit oli satunnaistettu tasapuolisesti kahteen koehuoneeseen. Huoneissa oli mekaaninen ilmanvaihto ja keskilämpötila $+19C^0$ (vaihteluväli $+14 C^0 - + 33 C^0$). Eläintiloissa oli valot päällä klo 6.00 – 18.00 ja yöaikaan antoivat valoa himmeät viiden luxin punaiset jouluvalot. Vasikoiden terveydentila ja rehunkulutus tarkastettiin päivittäin. Vasikat vieroitettiin juomarehusta 7 viikon ikäisinä, ja ne saivat sen jälkeen vapaasti vettä, väkirehua (klo 15.30) ja heinää (klo 6.00). Karsinat siivottiin klo 6.15 – 7.00.

Vasikoiden verinäytteenotto- ja siirtokoe oli 10–11 elinviikon iässä. Vuorokausi ennen verinäytteiden ottoa vasikoille laitettiin kanyylit kaulalaskimoon. Verinäytteet ja siirtotestit tehtiin kahdessa erässä viikon välein (kts. kuva 1). Vasikoilta otettiin ensimmäisen vuorokauden ajan verinäytteitä 20 minuutin välein perustason selvittämiseksi. Verinäytteen ottoa jatkettiin kaikista eläimistä myös siirron jälkeen seuraavat 24 tuntia.

1. toisto



2. toisto



Kuva 1. Koeasetelma. BETONI: yksilökarsina, jossa purukuivitettu betonipohja, KUMIMATTO: yksilökarsina, jossa betonin päällä 5cm paksu purukuivitettu kumimatto. Molempien mitat 1.8 * 1.05 m.

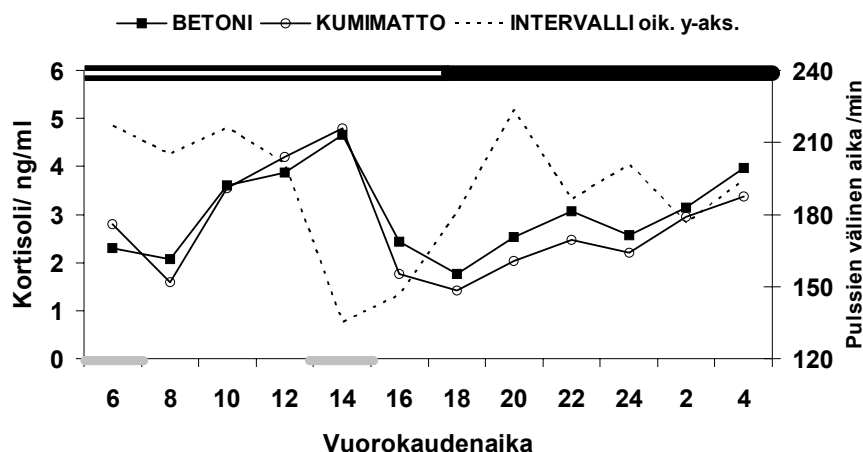
Plasman kasvuhormonipitoisuus määritettiin kaksoisvasta-aine RIA:lla (Petielerc et al. 1987) ja kortisolipitoisuudet kaupallisella ELISA-kitillä (No. #402210, Neogen corp.). Kummankin analyysin herkkyys oli 1 ng/ml.

Tilastollista tarkastelua varten plasman kasvuhormoni ja kortisolipitoisuudet log-korjattiin normaalia jakaumaa mukaileviksi. Takaisinkorjattuja arvoja (e^x) käytetään taulukoissa ja kuvaajissa. Kasvuhormoni- ja kortisolipulssit määritettiin tilastollisesti plasman konsentraatioiden vaihteluista. Yksi pulssi voi sisältää useampia 20 minuutin välein otettuja näytteitä. Lyhyesti, kyseinen tilastollinen metodi määrittää pulssiksi ne konsentraatioiden nousut, jotka ylittävät tietyn kynnsarvon. Yksityiskohdaisempi selvitys aiheesta on saatavilla mm. (Woolliams et al. 1993) ja Breierin yms. (1986) artikkeleista.

Pulsseista määritettiin tilastollisesti useita pulssimääreitä, kuten pulssien lukumäärä, pulssien välinen aika ja pulssin leveyttä kuvaava suure; keskiarvo kahden perättäisen ylimmän pulssipisteen välillä (YLÄLEVEYS). Lisäksi vuorokaudenaika jaettiin analyysiä varten kahden tunnin jaksoihin. Split-plot sekamallien avulla testattiin eläinten siirron sekä lattiatyyppin vaikutusta plasman kortisoli- ja kasvuhormonin konsentraatioihin sekä pulssiparametreihin. Lopullisessa mallissa oli plasman konsentraatioita analysoitaessa kiinteinä vaikutuksina Lattiatyyppi (BETONI vs. KUMIMATTO), Siirtovaikutus (SIIRRETTY vs. EI SIIRRETTY), Päivä (KONTROLLIPV vs. SIIRTOPV), Vuorokaudenaika ja Toisto. Yhdysvaikutukset analysoitiin Lattiatypin, Päivän ja Siirtovaikutuksen välillä. Satunnaistaikutuksina oli vasikka pesitetynä Siirtovaikutukseen, Toistoon ja Lattiatyyppiin. Pulssisuureet analysoitiin vastaavalla mallilla, mutta mallissa oli mukana myös pulssien välinen aika.

Tulokset ja niiden tarkastelu

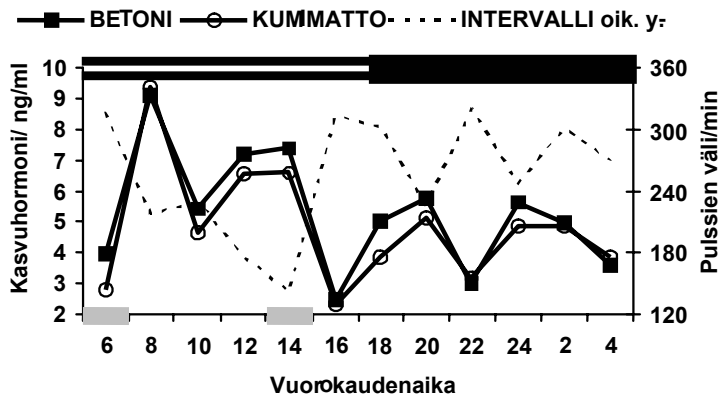
Nuorilla vasikoilla oli keskimäärin 5-6 kortisolipulssia vuorokaudessa, joka on vähemmän kuin aikuisilla naudoilla (Lefcourt yms. 1993). Keskimääräinen kortisolikonsetraatio vaihteli välillä 1-6 ng/ml, mikä vastaa vasikoilla mitattuja pitoisuuksia muissa tutkimuksissa (Wohlt et al. 1994). Kortisolipitoisuus vaihteli vuorokaudenajan mukaan, ja oli korkeimmillaan keskipäivällä (kts. kuva 2). Vanhemmat tutkimukset aikuisilla naudoilla ovat löytäneet ristiriitaisia tuloksia kortisolin vuorokausirytmistä (Fulkerson and Tang 1979, Fulkerson et al. 1980), (Thun et al. 1981). Syinä näiden tutkimusten keskinäisiin eroa-



kuu- ja vuorokausirytmistä (Fulkerson and Tang 1979, Fulkerson et al. 1980), (Thun et al. 1981). Syinä näiden tutkimusten keskinäisiin eroa-

vaisuuksiin saattavat olla kokeiden pienet eläinmäärät sekä erilaiset tilastolliset menetöt. Tutkimuksemme vasikat olivat noin kahden kuukauden ikäisiä, joten niiden vuorokausirytmii ei ollut vielä välttämättä täysin kehittynyt aikuisen kaltaiseksi. Vauvoilla (Mantagos et al.) ja porsailia (Ruis et al. 1997) rytmii kehittyv vasta 3-6 kuukauden ikäisenä. Ihmisistä ja jyrtsijöillä kortisoli on korkealla heti valveillaolojakson alussa, ja sitä pidetään merkkinä biologisen vuorokauden alkamisesta (Czeisler and Klerman 1999). Kortisolipulssien välinen aika lyheni väkirehuruokinnan aikaan, joka on yhtäpitävä mm. (Follenius et al. 1982) tutkimusten kanssa.

Vasikoilla oli keskimäärin 4-5 kasvuhormonipulssia vuorokaudessa ja pitoisuudet olivat välillä

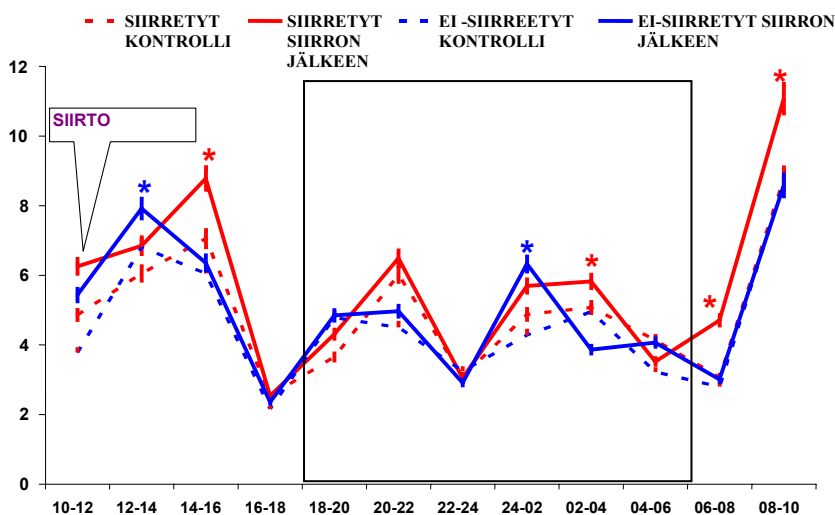


2-10 ng/ml, kuten myös aiemmissa tutkimuksissa on näytetty (Breier et al. 1986, Lefcourt et al. 1993). Päiväsaikaan kasvuhormonin konsentraatiot olivat korkeampia ja myös pulssien väli lyheni (kts. kuva 3.).

Laboratorioeläimillä ja jyrtsijöillä kasvuhormonia vapauttavan hormonin (GHRH) eritysv on voimakkaasti kytkök-

sissä uneen (Giustina ja Veldhuis, 1998). Myös lampailta on viitteitä, että niiden kasvuhormonin ja levon välillä olisi yhteyttä (Laurentie et al. 1989). Vastaavaa yhteyttä ei ole näytetty vielä naudoilla toteen, mutta naudat nukkuvat lyhyissä jaksoissa ympäri vuorokauden (Ruckebusch 1974), joten kasvuhormonin rytmisen eritysv ei sulje ko. yhteyttä pois.

Vasikoiden siirto ei vaikuttanut tilastollisesti niiden kortisoli- tai kasvuhormonin konsentraatioihin. Tähän saattaa vaikuttaa eläinten siirtotapa, me siirsimme yhden vasikan kerrallaan, rauhallisesti



huutamatta tai läimäyttämättä eläimiä. Lisäksi, pysyivät hoitajat, hoitorutiinit ja yksi naapurivasikka siirrettyille eläimille samana myös uudessa kasvatustilassa Siirto sen sijaan muutti vasikoiden kasvuhormonin erittymisrytmii (kts. kuva 4), joka saattaa heijastaa niiden lisääntyntä fyysistä aktiviteettia ja/tai uni-valverytmin muutoksia (Giustina ja Veldhuis 1998).

BETONI ja KUMIMATTO vasikoiden välillä ei ollut eroa vuorokauden keskimääräisessä kortisoli- tai kasvuhormonipitoisuuksissa: 2.9 [2.6- 3.3] ng/ml vs. 2.6 [2.3 – 2.9]ng/ml tai 5.0 [4.3 – 5.8] vs. 4.5 [3.9 – 5.2] ng/ml. Vuorokauden ajan ja lattiatyyppin välillä oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus kummallakin hormonille (p<0.001): BETONI vasikoilla oli korkeampi kortisolikonsetraatio alkuillasta kuin KUMIMATTO vasikoilla (kts. kuva 1.). Vastaavaa trendiä mukailee myös kasvuhormonikonsetraatio (kuva 2.). Sen sijaan BETONI vasikoiden kasvuhormonipulssit olivat KUMIMATTO vasikoita korkeampia (16.1 [12.8 – 20.4] ng/ml vs. 11.3 [9.0 – 14.1] ng/ml) ja pulssien väli oli suuntaa antavasti pitempi (272 [232 - 318] min vs. 225 [195 - 260] min). Emme voi sanoa, johtuiko vuorokausivaihtelu eri lattiatyyppien välillä kahden kuukauden kasvatusoloista vai testivuo-

rokausien lämpötilaeroista: yöt olivat suhteellisen kylmiä kuumiin päivälämpötiloihin verrattuna ja saattoivat suosia betonilattialla pidettyjä vasikoita päivisin ja kumimatolla pidettyjä öisin. Kova lattia häiritsee aikuisten lehmien lepoa (Haley et al. 2001) ja kasvuhormonin erittymistä (Munksgaard and Lovendahl, 1993). Kuitenkin, kevyemmille vasikoilla parikiloa sahanpurua saattaa olla riittävä pehmike. On toisaalta myös mahdollista, että 5cm paksu kumimatto ei ollut riittävän pehmeä tuomaan eroja esille.

Johtopäätökset

Betonilattiat saattavat häiritä vasikoiden unta ja lepoa, sillä niiden kortisolin vuorokausirytmii muuttuu. Vasikoiden rauhallinen siirto kasvatusstilasta toiseen ei lisännyt niiden kortisolin eritystä, mutta muutti kasvuhormonin erittymisrytmii. Tutkittaessa pulsseittain erittyviä hormoneja joilla on vahva vuorokausirytmii, kuten kasvuhormonia tai kortisolia, on näytteitä otettava tiheästi. Pulseja kuvaavat parametrit antavat lisätietoa biologisista lainalaisuuksista.

Kirjallisuus

- Breier, B. H., J. J. Bass, J. H. Butler, and P. D. Gluckman. 1986.** The somatotopic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulation concentrations of insulin-like growth factor 1. *Journal of Endocrinology* 111:209-215.
- Czeisler, C. A. and E. B. Klerman. 1999.** Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Progress in Hormone Research* 54:97-130.
- Follenius, M., G. Brandenberger, and B. Hietter. 1982.** Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 55:757-761.
- Fulkerson, W. J., G. J. Sawyer, and C. B. Gow. 1980.** Investigations of ultradian and circadian rhythms in the concentration of cortisol and prolactin in the plasma of dairy cattle. *Australian Journal of Biological Sciences* 33:557-561.
- Fulkerson, W. J. and B. Y. Tang. 1979.** Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep. *The Journal of Endocrinology* 81:135-141.
- Giustina, A. and J. D. Veldhuis. 1998.** Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human. *Endocr Rev* 19:717.
- Haley, D. B., A. M. dePassillé, and J. Rushen. 2001.** Assessing cow comfort: effects of two floor types and two tie stall designs on the behaviour of lactating dairy cows. *Appl Anim Behav Sci* 71:105-117.
- Ladewig, J. and D. Smidt. 1989.** Behavior, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Hormones and Behaviour* 23:344-360.
- Lefcourt, A. M., J. Bitman, S. Kahl, and D. L. Wood. 1993.** Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 76:2607-2612.
- Lefcourt, A. M., J. Bitman, D. L. Wood, and R. M. Akers. 1995.** Circadian and ultradian rhythms of peripheral growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 12:247-256.
- Mantagos, S., A. Moustogiannis, and A. G. Vagenakis. 1989.** Diurnal variation of plasma cortisol levels in infancy. *Journal Of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 11:549-553.
- Ruckebusch, Y. 1974.** Sleep deprivation in cattle. *Brain Research* 78:495-499.
- Ruis, M. A. W., J. t. Brake, B. Engel, E. D. Ekkel, W. G. Buist, H. J. Blokhuis, J. M. Koolhaas, and B. J. Te. 1997.** The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. *Physiology and Behavior* 62:623-630.
- Thun, R., E. Eggenberger, K. Zerobin, T. Luscher, and W. Vetter. 1981.** Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology* 109:2208-2212.
- Veissier, I., P. I. Neindre, G. Trillat, and P. Le-Neindre. 1989.** The use of circadian behaviour to measure adaptation of calves to changes in their environment. *Appl Anim Behav Sci* 22:1-12.
- Wohlt, J. E., M. E. Allyn, P. K. Zajac, and L. S. Katz. 1994.** Cortisol increases in plasma of Holstein heifer calves from handling and method of electrical dehorning. *J Dairy Sci* 77:3725-3729.
- Woolliams, J. A., K. D. Angus, and S. B. Wilson. 1993.** Endogenous pulsing and stimulated release of growth-hormone in dairy calves of high and low genetic merit. *Anim. Prod.* 56:1-8.