

Die waarde van spoorelementaanvulling aan skape op 'n
subonderhoudsrantsoen

deur

Marietjie (M. C.) Cronje
B.Sc. (Agric) Veekunde (UP)

Voorgelê ter vervulling van die vereistes vir die graad Magister Scientiae (Agriculturae)
in Veekunde (Voedingkunde)

in die
Departement Vee- en Wildkunde
Fakulteit Biologiese en Landbouwetenskappe
Universiteit van Pretoria
Pretoria

Promotor: Prof J.B.J van Ryssen

Verklaring:

Hiermee verklaar ek, Maria Catharina Cronje, dat hierdie tesis wat ingedien word ter vervulling van die vereistes van die graad M.Sc, (Agric) in Veekunde (Voedingkunde), by die Universiteit van Pretoria nog nie voorheen deur my vir graaddoeleindes by enige ander universiteit ingedien is nie.

INHOUDSOPGAWE

OPSOMMING	6
SUMMARY	8
HOOFSTUK 1: LITERATUUROORSIG	10
INLEIDEND	10
1.1 Oksidante en hul invloed op die dierlike sel se metabolisme	13
1.1.1 Vrye radikale Die reaktiewe suurstof spesies en hul invloed op die dierlike sel	14
1.1.2	14
1.1.3 Antioksidant ensiemes	16
a. Superoksied dismutase	16
b. Glutatioonperoksidase	18
1.2 Selenium	20
1.2.1 Die biologiese rol van selenium	20
1.2.2 Bronne van selenium	22
1.2.3 Selenium metabolisme	22
1.2.4 Bloed, serum en weefsel selenium	23
1.3 Koper	24
1.3.1 Koper en die immuun sisteem	24
1.3.2 Biobeskikbaarheid van koper	25
1.4 Sink	25
1.4.1 Sink ensiemes	25
1.4.2 Sink en selreplikasie	26

1.4.3	Sink en die immuunsisteem	26
1.4.4	Sink en stres	26
1.5	Spier-spesifieke ensiemes in die serum	27
1.6	Antiliggaamtiter	29
1.7	Hipotese	30
HOOFSTUK 2:	PROSEDURE	31
2.1	Diere	31
2.1.1	Behuising	32
2.1.2	Groepindeling	32
2.1.3	Vorbereiding van supplementasie	32
2.1.4	Voeding	33
2.2	Monsterneming-, preservering- en analisering	33
2.2.1	Droëmateriaal en ruproteïen ontleding van voer	34
2.2.2	Minerale ontleding	36
2.2.3	Antiliggaamtiter	41
2.2.4	Superoksied dismutase	43
2.2.5	Kreatienfosfokinase	47
2.2.6	Aspartaat transaminase	48
2.2.7	Hematokrit	49
2.2.8	Statistiese ontledings	49

HOOFSTUK 3:	RESULTATE	51
3.1	Resultate van die voorafgaande slaggroep	51
3.2	Ruproteïen, mineraal en droëmateriaal bepaling op die voer	51
3.3	Daaglikse voerinnome	52
3.4	Massas	52
3.5	Seleniumvlakke in volbloed, plasma en weefsels	56
3.6	Kopervlakke in die lewer	64
3.7	Hematokritwaardes	65
3.8	Antiliggaamproduksie	66
3.9	Superoksied dismutase	67
3.10	Kraetienfosfokinase an aspartaat transaminase	68
3.11	Lewermassa	68
HOOFSTUK 4:	BESPREKING	70
HOOFSTUK 5:	GEVOLGTREKING	85
HOOFSTUK 6:	VERWYSINGS	88

OPSOMMING

Die invloed wat die suplementering van die mikro-elemente selenium, sink en koper tydens subonderhoudsrantsoene by oilammers is bepaal. Sekere parameters van die immuunsisteem is ondersoek op verskillende tye voor en na die aanvang van die suplementering. Die akkumulاسie van die elemente in die bloed en die verskillende weefsels is bepaal met spesifieke klem op selenium en die akkumulاسie daarvan in die plasma en volbloed onderskeidelik. Bloedmonsters vir die spesifieke doel is op dag 0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 en 90 geneem om die wyse waarop selenium in die twee komponente (volbloed en plasma) sal styg te onderskei.

Natrium seleniet is as bron vir selenium, sinkoksied as bron vir sink en kopersulfaat as bron vir koper gebruik. Hierdie drie groepe verbindings is aan twee groepe van 11 elk oilammers gedoseer (oraal, twee maal per dag). Die derde groep van 11 het slegs die basiese dieet van gemiddelde kwaliteit Smutsvinger hooi ontvang. Al drie behandelingsgroepe het *ad libitum* water en voergraad growwe sout ontvang.

Die gesupplementeerde groepe, genoem groep 1 en groep 2, het onderskeidelik 1.6 en 3.2 mg selenium/dier/dag, 48.1 en 96.2 mg sink/dier/dag en 5 en 10 mg koper/dier/dag ontvang.

Die twee gesupplementeerde groepe het 'n neiging tot hoër massatoename getoon maar die verskille was nie statisties betekenisvol nie ($P > 0.05$). Dit dui egter daarop dat die gesupplementeerde groepe gesonder as die ongesupplementeerde kontrole groep was. Die kreatienfosfokinase (CK) en aspartaat transaminase (AST) aktiwiteit was ook betekenisvol laer in die gesupplementeerde groepe as in die kontrole groep (CK, $P < 0.01$ en AST, $P < 0.05$), wat daarop dui dat die spierselmembrane beter beskerm is in die gesupplementeerde groepe.

Die primêre antigeen produksie teen beeseritrosiete neig ook om hoër te wees by die gesupplementeerde groepe as by die kontrole groep, maar die verskille is nie betekenisvol nie ($P > 0.05$). Die periode toegelaat vir die produksie van teenliggame

was heelwaarskynlik te kort en beter resultate kon moontlik verkry geword het, indien die diere aan 'n sekondêre respons blootgestel was.

Die seleniumvlakke in die bloed (volbloed en plasma) en weefsels was betekenisvol hoër ($P < 0.01$) by die gesupplementeerde groepe as die kontrole groep. Die seleniumakkumulasie in die lewer was baie hoër as die normaal en dit was selfs hoër as in die niere.

Kopervlakke in die lewer was betekenisvol hoër in groep 2 as by die kontrole groep ($P < 0.05$), maar daar was geen betekenisvolle verskille tussen groep 1 en die kontrole groep nie ($P > 0.05$).

Daar was geen betekenisvolle verskille tussen die behandelingsgroepe by die ontleding van superoksied-dismutase nie ($P > 0.05$).

Die slotsom van die studie is dat die hipotese wel ondersteun word deur die resultate wat verkry is van sommige van die immuunsisteen parameters. Dit is dus duidelik nodig om diere wat op 'n subonderhoudsrantsoen geplaas word weens voedselskaarste of droogtes wel gesupplementeer moet word deur elemente wat kan help met die verhoging van die antioksidantstatus van dier. Dit sal 'n positiewe ekonomiese rol speel in sekere produksie-aspekte (groei, gesondheid en reproduksie) van diere.

SUMMARY

The influence supplementing the micro-elements selenium, zinc and copper during drought feeding on ewe lambs has been studied. Certain parameters of the immune-system were studied at different times during the trial. The accumulation of the elements in the different tissues was investigated with specific emphasis on the accumulation of selenium in blood and plasma. Blood samples were collected on days 0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 and 90 to determine the peculiar way in which the selenium levels rise in the whole blood and plasma.

Sodium selenite was used as source for selenium, zinc oxide as source of zinc and copper sulphate as source of copper. These three groups of chemical compounds were dosed to two groups of S. A. Mutton Merino lambs (two times a day). A third group of sheep was given only the basic diet which consisted of Smutsvinger hay. Salt and water were given *ad lib* to all three groups.

The supplemented groups (groups 1 and 2) received 1.6 or 3.2 mg selenium/animal/day, 48.1 or 96.2 mg zinc/animal/day and 5 or 10 mg copper/animal/day, respectively.

The two supplemented groups showed a tendency to heavier body weights than the control group, but the differences were not significant ($P > 0.05$). This could mean that the supplemented groups were healthier than the control group. The creatine phosphokinase (CK) and aspartate transaminase (AST) activities were significantly lower in the supplemented groups than in the control group (CK, $P < 0.01$ and AST, $P < 0.05$). This could mean the muscle cell membranes in the supplemented groups were better protected against degradation.

There were a tendency for higher primary antibody production against bovine erythrocytes in supplemented groups than in the control group, but with no significant differences ($P > 0.05$).

The selenium levels in tissues and blood (whole blood and plasma) were significantly higher in the supplemented groups than in the control group ($P < 0.05$). The selenium accumulation in the liver was exceptionally high, even higher than the selenium concentration in the kidneys, which is difficult to explain.

Copper levels were significantly higher in group 2 than in the control group ($P < 0.05$). No significant differences were found between the groups when superoxide dismutase activities were studied ($P > 0.05$).

The conclusion could be drawn that it is necessary to supplement micro-elements which will contribute to the antioxidant status of the animal especially in times of food scarcity and elevated stress in the animals. The supplementation will have a positive economical influence on the production (growth, health and reproduction) of the animal.

HOOFSTUK 1

LITERATUUROORSIG

Inleidend

Die verlies van produksie in veekuddes wat gedurende droogtes voorkom is seker die enkele grootste probleem wat die veeboer in Suid-Afrika beleef (Van Niekerk, 1971). Droogte kan gedefinieer word as die periode waartydens aanvullende voeding nodig is om skape op 'n aanvaarbare liggaamsmassa te hou. Op individuele plase is daar ander faktore as net die klimaatstoestand wat die ernstigheid van die droogte bepaal. 'n Onderontwikkelde plaas wat oorbelaai is met vee, sal 'n groter vraag na aanvullende voeding hê as 'n goed ontwikkelde plaas wat ekonomies goed bestuur word (Davis, 1976).

Ongeveer een derde van die Afrikakontinent bestaan uit oop grasvelde of savanna. Reënval in hierdie areas is streng seisoenaal en baie ongereeld. Dit lei tot lang en varieerbare droë seisoene wat met die winter periodes saamval. Die droë seisoen strek normaalweg vanaf Mei deur Oktober tot soms in November in areas nader aan die trope. Periodieke droogtes, waartydens tot minder as die helfte van die normale jaarlikse reënval voorkom, is algemeen (Van Niekerk, 1975).

'n Eienskap van die weiding in hierdie areas is die afwesigheid van natuurlike peulplante. Die vee is dus meestal afhanklik van gras vir hul nutriënt inname, met slegs 'n klein fraksie blare wat in die bosveld areas ingeneem word. Die voedingswaarde van die gras in 'n gegewe area verskil baie tussen seisoene. Gedurende die droë seisoen kan beeste vir ses tot agt maande van die jaar massaverlies toon. In die suurveld gebiede kan die verlies 25 – 30% van die maksimum somermassa wees (Van Niekerk, 1975). Onder hierdie kondisies sal ongesupplementeerde diere 'n netto jaarlikse massa toename van slegs 40 tot 70 kilogram toon en neem lank om 'n bemerkbare massa te bereik. Mortaliteit is hoog en verse kalf nie voor die ouderdom van drie en 'n half tot vier jaar oud nie. Herkonsepsie van koeie is swak en in die meeste gebiede van Afrika is die persentasie onder 50%.

Die finale resultaat is uiters swak vleisproduksie met lae gemiddelde kudde omset tempo's (Van Niekerk, 1975). Volgens Steenkamp & Hayward (1975) is die twee mees belangrike nutriënte wat tydens droogtes gesupplementeer moet word proteïen en energie. Aangesien energie die mees beperkende nutriënt is waar dit die voeding van skape gedurende droogte toestande aangaan, beveel Davis (1976) ook aan dat wanneer daar na die bron van voeding gesoek word, die koste van 'n eenheid metaboliseerbare energie van die voere eers bereken moet word, voor die bron van voer gekies word.

Grasmonsters is gedurende die somer en die winter geneem vanaf dieselfde gebiede. Daar is waargeneem dat die kopervlakke in die gras gedurende die somer 28.2 mg/kg teenoor die winter se 2.8 mg/kg was. Sinkvlakke in die somer was 30.1 mg/kg en in die winter 14.8 mg/kg. Na aanleiding hiervan moet die aanbevelingsvlakke vir spoorelement byvoeding ook seisoonaal geskied (Clark *et al.*, 1995). Chemiese analiese van droë grasveld het getoon dat die veld ook 'n tekort aan ander nutriënte soos β -karoteen, natrium en swael het (Van Niekerk, 1975).

Navorsing op spoorelemente demonstreer hul belangrikheid in die onderhoud van lewe. Ongelukkig word die noodsaaklikheid van spoorelemente dikwels deur die voedingkundiges oorgesien en word die suplementasie van spoorelemente aan die algemene voormengsels oorgelaat. Spoorelemente word slegs in klein hoeveelhede benodig, maar is tog 'n essensiële deel van die dieet. Moderne produksie praktyke het die bewustheid van die voedingswaarde van spoorelemente verhoog. Belangrike ekonomiese faktore insluitend groei, gesondheidstatus en prestasie word deur spoorelement suplementasie beïnvloed (Marston, 1999). Volgens Caple (1983) is dit 'n algemene reël dat energie en proteïen tekorte meer belangrik in fetale groei en laktasie is as die tekorte van die hoofelement groepe. Energie en proteïen tekorte kan gedefinieer word deur swak liggaamskondisies van dragtige ooie, lae geboorte massas van lammers, 'n tekort aan lewensvatbaarheid van lammers, hoë mortaliteite van pasgebore lammers asook vertraagde groei van die lammers. Die essensiële minerale wat deur die ooi gedurende laat dragtigheid en gedurende laktasie benodig word om in

die fetus se behoeftes te voorsien, word geklassifiseer as makro-elemente en spoorelemente, waaronder selenium, sink en koper val. Die makro-elemente help hoofsaaklik by strukturele doeleindes en in die handhawing van die osmotiese en suurbasis balans. Dit dra ook by tot energie oordrag, die oordra van sensuiewe impulse en normale ensiemaktiwiteit. Die spoorelemente dien hoofsaaklik as kataliste in ensiem sisteme deur as ko-faktore te dien. Dit kan ook 'n strukturele en funksionele bydrae tot die aktiwiteite van ensieme, hormone en vitamienes lewer. In teenstelling met makro-elementtekorte by ooie, is spoorelemente onafhanklik van proteïen en energie innames. 'n Ander onderskeid tussen makro- en spoorelemente is dat tekorte van byvoorbeeld jodium, koper en selenium 'n nadeliger invloed op die fetus en pasgebore lammer het as op die ooi (Caple, 1983).

Goeie gesondheid in terme van groei, melkproduksie en vrugbaarheid hang af van genoegsame en gebalanseerde inname van spoorelemente (sink, selenium en koper byvoorbeeld), en alhoewel die kennis van die werking van spoorelemente op molekulêre vlak onvolledig is, word daar tog erken dat verskeie spoorelemente lewens belangrike rolle speel om die normale sellulêre metabolisme in alle diere te handhaaf. Nuwe tegnieke in biochemie en molekulêre biologie het ons kennis verbreed wat die rol van spoorelemente in sellulêre sisteme byvoorbeeld nuut ontdekte ensieme, geenregulasie deur metaalresponsiewe elemente die veelvuldige funksies in die immuunsisteem en hormonale aksies, betref. Ernstige tekorte kan klinies maklik herken word en word ook maklik behandel deur suplementasie. Hoe meer marginale tekorte verspreid voorkom hoe minder word dit egter geïdentifiseer, maar dit het tog 'n ekonomiese impak. Marginale tekorte kan dikwels vererger word deur die interaksies tussen spoorelemente of word verwar met variasies in die proteïen en energie voorsiening (Lee *et al.*, 1999). Tekorte kan gedefinieer word as diere waarvan daar baie min of geen reserwes van spesifieke elemente in die weefsels voorkom nie tesame met die onderdrukking van sekere biologiese en fisiologiese prosesse en 'n respons tot behandeling is hoogs waarskynlik. Diere met marginale tekorte kan gedefinieer word as diere met verlaagde liggaamsreserwes en ekonomiese response

kan slegs verwag word indien daar 'n verdere periode van tekort volg en die weefsel reserwes uitgeput word (Caple, 1983).

Stres, oksidatiewe skade en gewysigde sel differensiasie kan siekte weerstand van diere verswak. Glukokortikoïede, epinefriene en prostaglandiene word vrygestel in reaksie op stres. Hierdie verbindings verhoog die konsentrasies van die sikliese AMP in die volwasse gedifferensieerde limfosiet, en onderdruk die limfosiet se funksie (Castaldo, 1989).

Vrye-radikaal en nie-vrye-radikaal oksidante kan skadelik wees vir dierlike weefsels as daar 'n tekort aan antioksidante in die liggaam voorkom. Hierdie oksidante word gedurende metabolisme geproduseer en kan verhoog word deur aerobiese oefening, spanning, weefselskade, infeksie en die detoksifikasie van baie komponente. Antioksidant nutriënte soos vitamien E, β -karoteen en die spoorelemente selenium, koper, sink en mangaan in ensiemes is baie belangrik in die beskerming van die dierlike weefsel teen oksidatiewe vernietiging. Hierdie beskermings voordeel lei ook tot verbeterde immuunrespons wat mastitis in melkkoeie verlaag, en infeksies wat voorkom wanneer beeste byvoorbeeld verskeep word (Nockels, 1996).

1.1 Oksidante en hul invloed op die dierlike sel se metabolisme

Wat is oksidasie? Dit is 'n proses waar 'n verbinding een of meer elektrone verloor. Die verbinding wat die elektron opneem word 'n oksidant, 'n oksidasie agent of 'n pro-oksident verbinding genoem (Halliwell, 1994; Van Metre & Callan, 2001).

In dierlike selle kom fosfolipiede voor en dit sluit die selmembrane en die beperkende membrane van sellulêre organelle in. Hierdie fosfolipiede bevat groot hoeveelhede poli-onversadigde vetsure. Sellulêre poli-onversadigde vetsure bevat onversadigde koolstof-koolstof dubbelbindings. Dit is by hierdie dubbelbindings in die poli-onversadigde vetsure waar skade deur pro-oksident verbindings aangerig word (Van Metre & Callan, 2001).

Sulfhidriël-groepe (-SH) in selmembrane is ook teikens van pro-oksidadant verbindings. Sulfhidriël-groepe word primêr in swael-bevattende aminosure verkry, en dien as 'n verbindingsmembraan om fosfolipiede soos ensiemes, reseptors en ioon-kanale te verbind. Die oksidasie van hierdie sulfhidriël-groepe sal lei tot 'n wysiging in die bogenoemde konformasie en sal dan noodwendig die funksie van die proteïen beïnvloed (Van Metre & Callan, 2001).

1.1.1 Vrye radikale

Gedurende normale metabolisme produseer die mitochondria voortdurend 'n klein hoeveelheid waterstofperoksied (H_2O_2) en superoksied radikaal (O_2^-) deur die reduksie van molekulêre suurstof. Waterstofperoksied is 'n sterk oksidadant en is in staat om elektrone van ander molekules aan te neem (Karlmark, 1993; Van Metre & Callan, 2001).

Die superoksied-radikaal is 'n vorm van 'n vrye radikaal, 'n hoogs reaktiewe molekule wat 'n enkele ongepaarde elektron in sy buitenste orbitaal bevat. Deur die verwydering van 'n elektron vanaf 'n naburige nie-radikaal molekule, en die elektron dan by die ongepaarde elektron in die buitenste orbitaal te voeg, tree die superoksied-radikaal as 'n oksidadant op. Hierdie proses maak die superoksied-radikaal meer stabiel as molekulêre suurstof. Die naburige molekule het egter nou 'n ongepaarde elektron in die buitenste orbitaal en is dus nou omgeskakel na 'n radikaal. Hierdie nuutgevormde radikaal verwyder dus nou 'n elektron van 'n volgende naburige nie-radikaal molekule en sodoende word 'n kettingreaksie geïnisieer (Van Metre & Callan, 2001).

1.1.2 Die reaktiewe suurstof spesies en hul invloed op die dierlike sel

In die yster-gekataliseerde Haber-Weiss, of Fenton se reaksie, word waterstofperoksied en die superoksied ioon, in die sitosol, omgeskakel na die hidroksiel ioon (OH^-) wat nog 'n kragtiger pro-oksidadant verbinding is. Tesame staan die waterstofperoksied, die superoksied-radikaal en die hidroksiel ioon as die reaktiewe suurstof spesies ("ROS, *reactive oxygen species*") bekend. Hierdie is 'n groep pro-oksidadante wat in staat is tot die oksidering van poli-onversadigde vetsure en sulfhidriël

groepe binne in die selmembrane, Golgi-apparate, endoplasmiese retikulum en lisosome (Van Metre & Callan, 2001).

Baie klein hoeveelhede van die ROS kan baie groter hoeveelhede membraan poli-onversadigde-vetsure oksideer. Wanneer die ROS 'n elektron, tesame met 'n waterstof atoom vanaf 'n poli-onversadigde vetsuur onttrek, word die poli-onversadigde vetsuur omgeskakel na 'n vrye radikaal (die ontstaan van 'n tekort aan een elektron in die buitenste orbitaal van die poli-onversadigde vetsuur). Hierdie lipied-alkiel radikaal verbind dan met molekulêre suurstof en vorm 'n peroksiel radikaal. In die volgende stap sal die peroksiel radikaal weer 'n elektron vanaf 'n naburige poli-onversadigde vetsuur onttrek en word sodoende omgeskakel na 'n "fatty acyl peroxide", terwyl die aangevalde poli-onversadigde vetsuur weer omgeskakel word na 'n lipied alkiel radikaal en die reaksie gaan voort. Dus is 'n kettingreaksie geïnisieer deur een enkele ROS. Die proses word lipied peroksidase genoem. Lipied peroksidase kan versnel word deur blootstelling aan sekere besoedelaars, organiese oplosmiddels, mikotoksiene, ultra-violetlig en insekdoders. Indien lipied peroksidase gelaat word sonder om beheer te word, kan dit lei tot die wysiging in deurlaatbaarheid en vloeibaarheidseienskappe van die selmembrane. Die vermindering van deurlaatbaarheid van membrane in die sel, veral met die oog op deurlaatbaarheid van die kalsium ion kan lei tot die verswakking van sellulêre energie metabolisme, terwyl die aktivering van sellulêre fosfolipase bevoordeel word. Die gevolg is dus onomkeerbare sellulêre skade (Jørgen & Larsen, 1993; Van Metre & Callan, 2001).

Wanneer lipiedperoksidase egter beheer word, is dit 'n natuurlike gebeurtenis wat noodsaaklik is vir die ontbinding van sellulêre membrane, pinositose en arichidoonsuur metabolisme (Halliwell, 1994; Van Metre & Callan, 2001)

Fagosiete is verantwoordelik vir die nie-spesifieke immuun respons naamlik fagositose, en kom in die milt, lewer en longe voor of sirkuleer in die bloed (Nockels, 1986). Die selle met 'n fagositotiese funksie word in die proses van lipiedperoksidase gebruik om opgeneemde bakterië te vernietig (Jørgen & Larsen, 1993; Van Metre & Callan, 2001).

Die peroksidase proses in die selle word bevorder deur ROS (Van Metre & Callan, 2001).

Die vatbaarheid van 'n sel vir peroksidase word beïnvloed deur die poli – onversadigde vetsure ("PUFA, *polyunsaturated fatty acid*") inhoud van die selmembrane. Wanneer daar 'n toestand van 'n hoë opname van PUFA in die dieet is, sal groter hoeveelhede daarvan in die membrane van sellulêre organelle geïnkorporeer word, en dit verskaf weer 'n groter aantal molekulêre "teikens" vir die peroksidase proses (Hakkarainen, 1993; Nockels, 1994; Van Metre & Callan, 2001).

Die beheer van lipied peroksidase vereis 'n aanhoudende voorsiening van suurstof en sellulêre energie, asook 'n balans tussen pro-oksidant komponente, die inhoud van PUFA in membrane en anti-oksidant verbindings binne die sel. Antioksidante is 'n groep nutriënte en ensiemes wat 'n kettingreaksie van lipiedperoksidase voorkom, deur die ROS te vernietig of om die kettingreaksie te onderbreek soos reeds beskryf (Van Metre & Callan, 2001).

1.1.3 Antioksidant ensiemes

Daar is 'n verskeidenheid ensiemes wat saamwerk om die negatiewe effekte van ROS te beperk en om die lipiedperoksidase proses in die sel te beheer. Superoksied dismutase (SOD) vernietig die superoksied radikaal in die sitosol en mitochondria matriks (Van Metre & Callan, 2001).

Glutation peroksidase (GSH-Px) is 'n proteïen tetrameer en bevat vier selenium atome wat weer waterstofperoksied in die vloeibare sitosol en die "Fatty-acyl peroxides" wat die sitosol binnekom, afbreek (Van Metre & Callan, 2001).

a. Superoksied dismutase

Die superoksied radikaal (O_2^-) is die een-elektron-reduksie produk van suurstof. Dit word geproduseer deur fagositiese selle soos neutrofille, monosiete, makrofage en eosinofiele en help hulle om virusse en bakterië te inaktiveer (Halliwell, 1994).

Die superoksied radikaal (O_2^-), asook H_2O_2 is 'n bedreiging vir lewende selle. Metallo-ensiemes wat superoksied dismutase (SOD's) genoem word verskaf 'n verdediging teen O_2 en word in omtrent alle organismes aangetref (Halliwell, 1994).

Iso-ensieme

Daar is drie tipes SOD's waarvan die eerste die koper-en-sink-bevattende SOD (CuZnSOD) is. Dit word gewoonlik in die sitosol van eukariotiese selle gevind. Tweedens is die mangaan-bevattende SOD (MnSOD) wat in die matriks van bakterië voorkom. Derdens is daar die yster-bevattende SOD (FeSOD) wat primêr in bakterië en 'n paar plantselle voorkom (Fridovich, 1986).

Meganisme

By al die SOD's sal die verwydering van die metaal die verlies van die katalitiese aktiwiteit tot gevolg hê, en die vervanging van die metaal sal die katalitiese aktiwiteit weer herstel.

In CuZnSOD is dit die koper se funksie om as elektron vervoerder gedurende die katalitiese siklus te dien, terwyl die sink 'n strukturele rol speel. Vervanging van die Cu(II) deur enige ander metaal word dus geassosieer met die algehele verlies van aktiwiteit. In teenstelling hiermee kan die Zn(II) vervang word deur Cu(II), Hg(II), Cd(II), en Cu(II) sonder veel verlies aan aktiwiteit (Fridovich, 1986).

Hierdie ensiem kataliseer die omskakeling van die superoksiedradikaal, O_2^- na H_2O_2 , en sodoende word eersgenoemde geïnhibeer om die natuurlike Fe^{3+} na die meer toksiese Fe^{2+} te reduseer. Daar moet egter onthou word dat die aksie van SOD tot 'n verhoogde produksie van H_2O_2 lei. Die produk word egter weer op sy beurt deur die kragtige aksie van die selenium bevattende ensiem glutatioon peroksidase geëlimineer (Karlmark, 1993).

b. Glutatioonperoksidase

Die mees belangrike H_2O_2 verwyderings ensiem in dierlike selle is die selenoproteïen, glutatioon peroksidase (GSH-Px) ensiemes. 'n Selenosistien residu, wat belangrik is vir die ensiem aktiwiteit, is teenwoordig by die aktiewe kant. GSH-Px verwyder H_2O_2 deur die H_2O_2 te gebruik om gereduseerde glutatioon (GSH) te oksideer na geoksideerde glutatioon (GSSH). Glutatioon reduktase, 'n flavoproteïen (FAD-bevattende) ensiem, regeneer GSH van GSSG, met NADPH as reduksie bron (Halliwell, 1994).

Die ontleding van hierdie seleno-ensiem word gebruik as 'n indirekte maatstaf van die seleniumstatus van diere. Hierdie ensiem word in rooibloeselle geïnkorporeer tydens die proses van eritropoëse. Dus word die aktiwiteit van die ensiem in volbloed stadig verander na gelang die dier se selenium status verander word (Van Metre & Callan, 2001).

Die aktiwiteit van GSH-Px neig om geleidelik te verhoog met 'n verhoogde selenium inname, maar bereik 'n plato sodra die dier 'n versadigingspunt vir die opname van selenium bereik. Dus sal 'n verdere verhoging in selenium innames nie tot verdere verhoging van GSH-Px lei nie (Van Metre & Callan, 2001).

Selenium-afhanklike GSH-Px

GSH-Px kataliseer die omskakeling van peroksides na die ooreenstemmende hidroksie verbindings. Nie net word die H_2O_2 gekataliseer na die hidroksielradikaal nie, maar dit "stap" ook in die lipoksigenese fase van die metabolisme van aragidoonsuur in (Karlmark, 1993). Oksidatiewe skade aan die lipied komponente van leukosiet membrane inisieer die proses van prostaglandien en leukotrien sintese en lei tot die verlies van vloeibaarheid sowel as verandering van reseptorfunksies (Jørgen, 1993). GSH-Px kataliseer die omskakeling van 5HETE (voorloper van leukotrienes) na HETE. Die insluiting van poli-onversadigde lipiede in diëte van diere kan tot hoë oksidatiewe stres lei. Daar is gevind dat die byvoeging van selenium in dië diëte, hierdie oksidatiewe stress tot 'n mate kan teëwerk (Karlmark, 1993).

Selenium onafhanklike GSH-Px

Daar is ook 'n Se-onafhanklike GSH-Px in die vorm van glutatioon-S-transferase B gevind. Die aktiwiteit van hierdie ensiem verhoog gedurende 'n seleniumtekort en kan 'n gedeeltelik kompenserende rol vir die verlies van selenium-afhanklike GSH-Px speel. Ten spyte hiervan as daar nog steeds 'n liniêre verwantskap tussen die konsentrasie van selenium in die plasma en GSH-Px aktiwiteit, wat dan die rol van selenium-onafhanklike GSH-Px baie klein maak as mens na die liggaam in geheel sou kyk (Karlmark, 1993).

Lammers en ooie wat in die lae selenium gebied van "New-England" in Australië gewei het, is gebruik om die effek van selenium suplementasie op bloed en plasma vlakke van selenium en GSH-Px te bestudeer en ook die moontlikheid te ondersoek of GSH-Px as 'n aanduiding van selenium beskikbaarheid of selenium status in weidende diere te bepaal. Daar is gevind dat gereelde bepalinge van eritrosiet of volbloed GSH-Px aktiwiteite gebruik kan word as 'n indikasie van selenium beskikbaarheid en die selenium status van weidende diere (Peter *et al.*, 1980).

Reffett *et al.* (1988), het 'n studie gemaak van die effek wat selenium en vitamien E op die primêre en sekondêre immuun respons van lammers (uitgedaag met die parainfluenza virus, PI₃V) het. Hulle het bevind dat die volbloed GSH-Px aktiwiteit laer was ($P < 0.01$) vir die (-)seleniumbehandelingsgroep, regdeur die studie. Ongeag die selenium status, het die vitamien E geen effek op die volbloed GSH-Px aktiwiteit gehad nie.

Die volbloed GSH-Px aktiwiteit in (+)selenium lammers het baie verhoog ($P < 0.01$) net na die primêre inokulasie van PI₃V en het ook regdeur die studie hoog gebly. Die verhoging van die GSH-Px kon die gevolg wees van die produksie van suurstof radikale wat veroorsaak is deur virale stres. Die verhoogde ensiem aktiwiteit maak staat op die Se-status van die diere en die beskikbaarheid van selenium vir inkorporering in GSH-PX en verduidelik dus die lae vlakke van GSH-Px in die -seleniumlammers na inokulasie.

1.2 Selenium

Selenium is in 1818 deur die apteker Berzelius in Gripsholm, Swede ontdek, maar het eers in 1957 sy status as essensiële nutriënt ontvang. Selenium responsiewe tekorte is al beskryf in muise, rotte, marmotte, hase, hoenders, kalkoene, eende, fisante, visse, honde, varke, skape, bokke, perde, kamele, lamas, waterbuffels, zebras, blesbokke, bontebokke en mense. Dit is dus heelwaarskynlik dat alle lede van die dierefamilie selenium benodig, so ook baie van die bakteriële spesies (Ullrey, 1992).

1.2.1 Die biologiese rol van selenium

Die funksie van selenium in die liggaam is as deel van die aminosuur selenosisteïene, binne 'n familie van proteïene wat die selenoproteïene genoem word. Glutatioon peroksidase is die ensiem wat die deeglikste bestudeer is. Die tiroïed hormoon diodinase is ook 'n selenoproteïen met 'n funksie in die vorming en regulering van triiodotironien, wat weer op sy beurt die aktiewe hormoon op sellulêre vlak is. Dus het selenium 'n belangrike rol in normale groei en metabolisme (Stabel *et al.*, 1989; Ullrey, 1992; Van Metre & Callan, 2001). Die rol wat twee ander selenoproteïene naamlik, selenoproteïen-P van plasma en selenoproteïen-W van spiere speel, is nog onbekend.

Nog 'n selenoproteïen, tioredoksien reductase, is betrokke by die reduksie van disulfied bindings en speel dus 'n belangrike rol in die bewaring van sulfhidriel groepe wat maklik geoksideer kan word. Hierdie ensiem is ook krities in die omskakeling van geoksideerde vitamien C (dehidro-askorbiensuur) na askorbiensuur (vitamien C). Die omskakeling lei tot die hersirkulasie van askorbiensuur in selle vir verdere funksie as 'n antioksidant. Seleniumtekort kan dus 'n negatiewe effek hê op die sellulêre voorsiening van funksionele vitamien C (Van Metre & Callan, 2001).

Neutrofiel wat verkry is vanaf bloed van rotte en beeste wat 'n seleniumtekort het, het 'n verswakte "microbicidal" aktiwiteit indien dit met selle van diere vergelyk word wat gesupplementeer is met selenium. Histochemiese toetse demonstreer dat die moontlikheid dat neutrofiel van diere met 'n selenium tekort, "nitroblue-tetrazolium"

(NBT) kan verminder wanneer met 'n endotoksien uitgedaag word, kleiner is, wat aantoon dat die moontlikheid vir hierdie diere om superoksied (O_2^-) wat nodig is vir "microbicidal" aktiwiteit ook kleiner is (Arthur, 1981).

Die neutrofiele van beeste met 'n seleniumtekort ontwikkel minder CO_2 wanneer dit met [1-C]glukose geïnkubeer word as selle van gesupplementeerde diere. Die oksidasie van glukose by die heksose monofosfaat "shunt" in neutrofille produseer NADPH wat nodig is vir O_2^- -produksie. Hierdie veranderinge in "microbicidal" en metaboliese aktiwiteit in neutrofiele met seleniumtekort word geassosieer met 'n verlaging in die aktiwiteit van die seleno-ensiem glutatioonperoksidase (GSH-Px). Hierdie verlaging van GSH-Px aktiwiteit sal die peroksiedes wat gedurende fagositose geproduseer word om te vermeerder en skade aan die neutrofil te veroorsaak. Met ander woorde daar is 'n direkte bewys van verswakte vermoë om O_2^- te produseer in beesneutrofiele met 'n seleniumtekort (Arthur, 1981).

Die effek van selenium op skaap-limfosiet reaksie tot mitogene is ondersoek. Die eksperiment is binnemuurs uitgevoer en die eksperimentele lammers is 'n dieet gevoer wat $0.13 \text{ mg selenium kg}^{-1}$, of as natriumseleniet, of as selenometionien. 'n Verhoging van die vermenigvuldigende reaksie van limfosiete na "phytohaemagglutinin" (PHA), "pokeweed mitogen" (PWM) en "concanavalin A" is waargeneem in lammers wat die selenium aanvulling op laer vlakke ontvang het (Larsen, 1988).

Die hoogste vlakke van seleniumaanvulling het egter 'n verlaagde mitogeen reaksie geïnduseer. Tydelike verhogings in limfosiet respons tot PHA en PWM by ooie wat met selenium gesupplementeer is, is gedemonstreer in 'n veldstudie en 'n gekombineerde effek van selenium en vitamien E is in 'n ander veldstudie waargeneem. Daar was geen stimulerende effek op die mitogeen respons van limfosiete by skape wat met vitamien E alleen gesupplementeer is nie (Larsen, 1988).

1.2.2 Bronne van selenium

Die konsentrasie van selenium in meeste grondsoorte wissel tussen 0.1 mg/kg tot 2 mg/kg. Skalie het 'n hoë selenium inhoud terwyl die selenium inhoud in vulkanies gevormde grond, sandsteen, graniet en kalkagtige grond in laer konsentrasies voorkom (Van Metre & Callan, 2001).

Daar is 'n paar faktore wat die assimilasië van selenium vanaf die grond na plante beïnvloed. Dus sal 'n grondontledingstoets nie 'n akkurate skatting van die seleniuminhoud van plante kan weergee nie. Die faktore sluit in die oksidasie-reduksie-potensiaal van die grond, grond-pH en die reënval (Van Metre & Callan, 2001).

Selenium kom in die anorganiese vorm in grond voor, naamlik selenaat, seleniet en selenied asook seleniumelement. Selenate en seleniete is wateroplosbare ione wat wel beskikbaar is vir opname deur 'n plant. Die opname word bevorder deur alkaliese goed belugte grond. Gedurende periodes van hoë reënval kan die selenium van die bogrond uitgeloog word of tydens bemesting wanneer plantgroeï maksimum is, kan die selenium inhoud van weidings verdun word. Die yster en swael inhoud van die grond kan ook die beskikbaarheid van selenium aan die plant vir opname beïnvloed (Van Metre & Callan, 2001).

1.2.3 Selenium Metabolisme

Die effektiewe absorpsie van selenium is baie laer by herkouters as by monogastriese diere, vanweë die reduserende omgewing van die rumen. In die rumen word 'n fraksie van die geoksideerde biobeskikbare selenate en seleniete na onbeskikbare seleniede gereduseer. Diëte hoog in stysel neig om die reduserende kapasiteit van die rumen te verhoog en kan in teorie die opname van selenium negatief beïnvloed (Van Metre & Callan, 2001).

Wanneer selenium as die organiese selenometionien aangebied word, word dit beter geabsorbeer as wanneer in die anorganiese seleniet aangebied word. Die rede hiervoor is heel waarskynlik die groter reduksie van anorganiese seleniet na die

onbeskikbare vorms in die rumen (Van Metre *et al.*, 2001). Van Ryssen *et al.* (1989) toon aan dat indien seleniet met rumenmikro-organismes (RMO) geïnkubeer word, selenosisteïen as die predominante seleno-aminosuur voorkom. Wanneer RMO egter met selenometionien (Semet) geïnkubeer is, is Semet as die predominante seleno-aminosuur voorkom. Daar is ook 'n aktiewe transport meganisme vir selenometionien oor die dermwand in vergelyking met die passiewe diffusie vir die anorganiese vorms van die element (NRC, 1983)

1.2.4 Bloed, serum en weefsel selenium.

Die meeste van die geabsorbeerde selenium akkumuleer in die lewer, waarna 'n groot gedeelte dan na die serum oorgedra word. Veranderinge in serum selenium kom binne 'n paar dae na die verandering in selenium inname voor. Dus is serumselenium analise 'n sensitiewe indikator van die selenium status van die dier of van die dier se onlangse selenium inname (Pherson, 1993; Van Metre & Callan, 2001).

Selenium word na ongeveer alle organe van die liggaam versprei met die grootste konsentrasies in die lewer en die niere. In die beenmurg word selenium geïnkorporeer in rooibloedselle gedurende eritropoëse, primêr as glutatioon peroksidase. Die hoeveelheid selenium wat beskikbaar is aan die rooibloedselle en die tempo van eritropoëse bepaal dus die hoeveelheid selenium teenwoordig in die rooibloedselle en die aktiwiteit van GSH-Px in die volbloed (Van Metre & Callan, 2001; Ullrey, 1987 & Knowles *et al.*, 1999).

Sodra die rooibloedsel in sirkulasie vrygestel word, dra dit by tot die selenium inhoud van die volbloed vir daardie sel se leeftyd. Volbloed selenium verteenwoordig die selenium in die rooibloedselle asook in die serum, met 'n baie, baie klein bydrae vanaf die witbloedselle. Die selenium binne enige gegewe rooibloedsel het 'n aaneenlopende bydrae tot die volbloedselenium vir die volle leeftyd van die betrokke sel wat by 'n skaap tot 150 dae kan wees (Van Metre & Callan, 2001). Die selenium inhoud binne die rooibloedselle en daarom ook die volbloedselenium het dus 'n baie stadiger "turn-over" as die serumselenium (Van Metre & Callan, 2001).

1.3 Koper

In 1924 is getoon dat koper 'n essensiële element is, toe eksperimente met rotte getoon het dat koper noodsaaklik is vir die vorming van hemoglobien. Alhoewel koper nie 'n bestanddeel van hemoglobien is nie, is dit teenwoordig in ander plasmaproteïene soos seruloplasmien wat betrokke is by die vrystelling van yster vanaf die selle in die plasma. Dus sal 'n kopertekort die dier se vermoë om yster te absorbeer, mobiliseer en te gebruik in hemoglobien sintese inhibeer (McDonald *et al.*, 1995).

Koper is ook 'n komponent van "erytrocuprein" wat in eritosiete voorkom en 'n belangrike rol in die metabolisme van suurstof speel. Koper speel ook 'n rol in ensiem sisteme byvoorbeeld sitochroomoksidase wat weer belangrik is in oksidatiewe fosforilase (McDonald *et al.*, 1995).

1.3.1 Koper en die immuunsisteem

Koper word benodig op spesifieke plekke vir spesifieke doeleindes, eerder as 'n daaglikse hoeveelheid. 'n Voorbeeld is antioksidant verdediging via die ensiem superoksied dismutase. Dit maak dit dus noodsaaklik om te fokus op die kritiese areas en funksies en lei tot navorsing op SOD in eritosiete, leukosiete, cytochrome, oksidase en koper in leukosiete in verskillende spesies (Suttle, 1994). Ward *et al.*, (1993) verwys na 'n studie wat op rotte uitgevoer is. Daar is bevind dat die leukosiet populasie verander het by rotte wat 'n kopertekort dieet gevoer is. Die T-helper selle het afgeneem en B-sel getalle het toegeneem.

In neutrofille kom die koperbevattende ensiem, sitochroomoksidase voor, en dit is bewys deur histochemiese tegnieke dat hierdie ensiem sy aktiwiteit verloor indien 'n koper tekort ontstaan. Rotte met 'n koper tekort het 'n groter vatbaarheid vir *Salmonella typhimurium* infeksie getoon as diere wat die kontrole dieet gevolg het (Boyne, 1981).

1.3.2 Biobeskikbaarheid van koper

Die biobeskikbaarheid van koper kan laag wees in die diëte van herkouters veral wanneer molibdeen en swael in matige tot hoë konsentrasies voorkom. Molibdeen en swael reageer met mekaar om tetratiomolibdate te vorm wat op hul beurt weer met koper in die rumen reageer wat dan baie stabiele verbindings vorm wat nie verteer of geabsorbeer kan word nie (Ward, 1993).

Koper kom in veevoere voor en onder normale omstandighede sal die diëte van plaasdiere voldoende hoeveelhede koper bevat. Die dreineringskondisies van die grond, asook weidingspesies het wel 'n invloed op die koperinhoud (McDonald *et al.*, 1995).

Koper kom voor in alle liggaamsselle, maar veral gekonsentreerd in die lewer, wat die hoof stoorplek is. Lewer en bloed koper analiese word dus gebruik om die koper status van diere te bepaal (McDonald *et al.*, 1995).

1.4 Sink

Sink is in die 1940's eers as essensiële element beskryf, maar dit is eers 18 jaar later erken dat 'n tekort aan sink die groei en gesondheid van plaasdiere kan beïnvloed toe aangetoon is dat 'n vorm van dermatitis wat veral by varke wat droë voer vreet, voorkom kon word indien sink by die voer gevoeg word. Sink toon geen neigings tot oksidasie of reduksie in biologiese sisteme nie en is algemeen teenwoordig in die vorm van die divalente kation (Mills, 1978).

1.4.1 Sink ensiemes

Sink vorm 'n integrale deel van die ensiem karboonanhidrase, maar ook van baie ander ensiemes en kom in elkeen van die ses kategorië van die ensiemes wat deur die Kommissie van Ensiem Nomenklatuur erken word. Die sink-ensiemes word in twee kategorië verdeel naamlik die sinkensiem-komplekse en sink-metalo-ensiemes (Mills, 1978). In eersgenoemde is die binding tussen die ensiem en ioon swak en is daar 'n

lae spesifisiteit vir sink om die ensiem te aktiveer. In teenstelling hiermee bind die Zn-metallo ensiemes sink baie sterk met definitiewe stogiometrie en 'n groot mate van spesifisiteit.

Sink het ten minste twee uitstaande funksionele rolle in ensiemes. Dit kan of betrokke wees in die onderhouding van die strukturele integriteit van die proteïen, of dit kan direk betrokke wees in die proses van ensiematiese katalise (Mills, 1978).

1.4.2 Sink en selreplikasie

Een van die belangrikste gevolge van 'n sink tekort in diere is 'n verlaging in groeitempo van diere. Tot dusver het pogings om hierdie effek in terme van 'n reduksie in die aktiwiteit van spesifieke sink ensiemes te koppel misluk (Mills, 1978).

1.4.3 Sink en die immuunstelsel

In beide varke en rotte lei 'n sink tekort in 'n afname in die hoeveelheid sirkulerende limfosiete, asook 'n merkbare afname in die massa van die timusklier (Mills, 1978).

'n Genetiese siekte onder mense, naamlik acrodermatitis enteropatika, wat gekenmerk word deur die onvermoë om sink op te neem, word geassosieer met uitermatige hipoplasia van die timusklier, limfknope, "Peyer's patches" en die milt. Sulke pasiënte het ook vertraagde sel gemedieerde immuunresponse en of vertraagde humorale immuniteit (Mills, 1978).

1.4.4 Sink en stres

Verlaagde plasma sink konsentrasies is gevind in diere wat onderwerp is aan infeksie, trauma, lae proteïen inname, en gedurende dragtigheid. Hierdie verandering is die gevolg van verhoogde weefselopnames van sink veral deur die lewer, asook verhoogde uitskeiding van sink in die uriene. Verhoogde proteïen katabolisme wat geassosieer word met stres sal 'n verhoogde uitvloei van aminosure deur die plasma tot gevolg hê. Hierdie aminosure kan die sink bind. Dit kan die filtreerbare sinkinhoud van die plasma verhoog en verhoogde urinêre sinkverlies veroorsaak.

Stres veroorsaak ook 'n verhoging in die konsentrasie plasmakortikosteroïede. Dit is aangetoon dat dië steroïde sinkopname deur selle *in vitro* stimuleer. Wāt ook al die onmiddelijke gevolg van die verlaagde sinkkonsentrasie in die plasma gedurende stres is, dit kan die oorlewing van die dier beïnvloed. Varke wat 'n dieet gevolg het wat aan hul sinkbehoefte voldoen, is aan infeksie blootgestel. Die sink plasma konsentrasie het gedaal, maar al die varke het oorleef, terwyl 'n ander groep varke wat 'n dieet gevolg het wat nie aan die sink behoefte voldoen nie, ook aan dieselfde infeksie blootgestel is en 'n derde van die varke het gevrek (Chesters, 1978).

Vyf gesonde nie-rokende manlike hardlopers is vir 'n studie gebruik om die effek van sink suplementasie op oefening-geïnduseerde verandering in die immuunfunksie te ondersoek. Die resultate toon dat akute suplementasie met 50 mg Zn/dag die oefening-geïnduseerde verandering in sirkulerende neutrofiel (PMN) en mononukleêre selle (MNC) se funksie gemodifiseer het. Sink blokkeer die verhoogde kapasiteit van PMN om superoksied ione te produseer na 'n harde oefensessie. Dus kan sink as supplement, 'n individu wat aan chroniese fisiese stres onderworpe is, beskerm teen potensiële skadelike effekte van oortollige reaktiewe suurstof spesies. Sink-supplementasie neig ook om die onderdrukte reaktiwiteit van T-limfosiete tot mitogene te vergroot direk na harde oefening. Onderdrukte limfosiet aktiwiteit kan atlete ook tydelik aan infeksie blootstel. Verdere studies moet gedoen word om te bepaal of die effekte van gesupplementeerde sink 'n respons van uitgeputte liggaamsreserwes is, en of dit 'n farmakologiese invloed het (Singh *et al.*, 1994).

1.5 Spierspesifieke ensiemes in die serum

Die serum vlakke van spierspesifieke ensiemes alanien transaminase (ALT, EC 2.6.1.2), aspartaat transaminase (AST, EC 2.6.1.1), melksuur dehidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) en kreatien fosfokinase (CPK, EC 2.7.3.2) is in twee skaapkuddes bestudeer. Een groep was skoon en die ander een besmet met "stiff lamb disease". Die serum-spier-spesifieke-ensiem vlakke was betekenisvol hoër in lammers wat besmet was in vergelyking met die nie-endemiese kudde. Vitamien E-

seleniumtoediening is gevolg deur 'n betekenisvolle verlaging in ensiemvlakke in subklinies geaffekteerde lammers van die endemiese kudde, terwyl geen veranderinge in lammers van die kontrole groep voorgekom het een week na behandeling nie. Lammers van die endemiese kudde is met relatiewe hoë serum ensiem vlakke gebore wat geleidelik en betekenisvol verhoog het vanaf twee weke en ouer. Maksimum vlakke is op vier weke ouderdom bereik. Op die stadium het die meeste lammers tipiese simptome van die siekte getoon. Kliniese verbetering gepaardgaande met 'n duidelike daling in ensiemvlakke het na die behandeling met vitamien E-selenium preparaat in klinies geaffekteerde lammers voorgekom (El-Neweehy, 1999).

Die voorkomingseffek van 'n parenteraal gedoseerde (enkel dosis) vitamien E-seleniumpreparaat wat aan dragtige ooie gegee is gedurende die laaste trimester van dragtigheid vir die beskerming teen "nutritional muscular dystrophy" (NMD) in die lammers, is bestudeer. Die studie is gebaseer op die beperking van spier-spesifieke ensieme in die serum van die lammers. Daar is gevind dat die toediening van 'n vitamien E-seleniumpreparaat aan dragtige ooie in 'n kudde met 'n bekende geskiedenis van NMD, 'n betekenisvolle verlaging van hierdie spierspesifieke ensiemes in die serum van die lammers tot gevolg het. Ook is daar waargeneem dat die vlakke van spierspesifieke ensieme in serum betekenisvol hoër is by lammers waarvan die ooie nie behandel is nie (in 'n kudde met 'n geskiedenis van NMD) as in lammers van onbehandelde ooie in 'n kudde met geen geskiedenis van NMD nie (kontrole groep). Die serum kreatien fosfokinase vlakke was betekenisvol hoër in lammers van behandelde ooie in vergelyking met lammers van die kontrole groep. Geen betekenisvolle verskille is waargeneem tussen die twee groepe lammers van die ander serum – spierspesifieke ensiemes wat gemeet is nie. Die lammers van die behandelde groep het geen kliniese tekens van NMD getoon tot en met speenouderdom nie. Dit kan dus gesê word dat 'n toediening van 'n vitamien E-seleniumpreparaat aan dragtige ooie in 'n kudde met 'n geskiedenis van NMD effektief is in die voorkoming daarvan (El-Neweehy, 2001).

1.6 Antiliggaam titers

β -limfosiete word geprosesseer in limfoïed weefsels in die ingewande voordat dit na die timus-onafhanklike areas migreer en B-selle word. Die humorale immuun respons word vanaf hierdie B-selle verkry en dit sluit die produksie van teenliggaampies of immunoglobulie in. Dit neem ongeveer 10 dae na die toediening van 'n antigeen, wat die dier nog nooit vantevore in sy lewe ontvang het nie, vir die antigeenliggaam respons om die maksimum vlak te bereik. Die antiliggaam respons wat as 'n titer gemeet word, bereik nie hoë vlakke nie en duur slegs vir twee tot drie weke. Die eerste respons tot die antigeen is die primêre immuun respons. Indien dieselfde antigeen vir 'n tweede maal toegedien word, sal die sekondêre immuun respons baie vinniger wees – wat 'n hoër teenliggaam titer gee en vir maande sal aanhou. Omdat die T-en B-sel respons 'n paar dae kan neem om te reageer, sal die onmiddellike immuun verdediging die fagositiese sisteem benodig wat neutrofille en makrofage gebruik (Nockels, 1996).

Die verwantskap tussen bloed selenium vlakke en GSH-Px aktiwiteit en die vermoë van beeste om teenliggame te produseer in respons tot antigeen uitdagings met skaapprooibloedselle (SRBS) en ovalbumin (OA) is ondersoek in 'n twee fase eksperiment met jaaroue vleisbeeste. In fase 1 het die ongesupplementeerde kontrole groep 'n laer bloed selenium vlak en GSH-Px aktiwiteit gehad teen week 8 as die beeste wat die selenium gesupplementeerde ruvoer ontvang het. Die antiliggaamtiter wat die resultaat was van die toediening van SRBS op week 4 van die proef, het op drie weke na die toediening 'n hoogtepunt bereik en daarna afgeneem. Dieselfde diere is in fase 2 van die eksperiment gebruik. Die helfte van die diere wat op elk van die vier behandelings van die fase 1 eksperiment was, het 'n gesupplementeerde seleniumryke gis ontvang en die ander helfte het as die ongesupplementeerde kontrole gedien. Verskille in die bloed selenium vlakke en GSH-Px aktiwiteit as gevolg van die fase-1 eksperiment het voortgeduur regdeur fase – 2. Verskille as gevolg van fase-2 is eers waargeneem na nege weke. Die beeste is met OA uitgedaag op 12 weke en op 17 weke met beide OA en SRBS. Verskille in antiliggaamtiter as gevolg van die

selenium behandelings was klein, maar was wel hoër in die selenium behandelde diere as in die ongesupplementeerde diere (Nicholson *et al.*, 1993).

Honderd-ses-twintig Angus en Angus X Hereford beeste is gebruik om die effek van kopervlakke en die bron van koper op die koper status, prestasie en immuun respons in groeiende beeste, wat diëte met of sonder gesupplementeerde swael ontvang het, te ondersoek. Die humorale immuunrespons tot ovalbumien is op dag 7 en 77 gemeet. Die behandeling het nie die antiliggam produksie op enige gegewe tyd geaffekteer nie. Sel-gemedieerde immuniteit is *in vivo* op dag 7 en 77 gemeet deur van "phytohaemogluttinine" gebruik te maak. *In vivo* selreaktiwiteit is nie deur die behandelings op dag 7 geaffekteer nie, maar is wel op dag 77 deur molibdeen en swael suplementasie verlaag (Ward, 1993).

1.7 Hipotese

Na aanleiding van die gegewe feite in die literatuuroorsig, is dit duidelik dat spoorelemente wel 'n belangrike rol in die algemene gesondheid en oorlewing van groot - en kleinvee speel. As gekyk word na die omgewings omstandighede in Suid-Afrika asook die weidingskondisies gedurende die winter se seisoenale droogtes, maar ook die periodieke rampdroogtes wat in die land voorkom word die hipotese gestel dat die byvoeding van spoorelemente van kardinale belang is in die handhawing van gesondheid en prestasie in veekuddes gedurende droogtes in suidelike Afrika. Alhoewel algemeen beweer word dat daar min of geen regverdiging bestaan om spoorelemente aan te vul as diere onderhewig is aan energie en proteïen tekorte nie, wil ons die stelling maak dat spoorelemente in besonder die wat betrokke is by die antioksidant status van diere, voordelig sal wees by diere wat aan proteïen en/of energie stres ly.

HOOFSTUK 2:

PROSEDURE

Om die hipotese te toets is hooi vir drie maande aan lammers teen 'n subonderhoudsvlak gevoer. Die kontrole groep het slegs hooi ontvang. Die lammers in die ander twee behandelings het daaglikse minerale byvoeding in die vorm van selenium, sink en koper ontvang. Die reaksie van die lammers is getoets deur verskillende laboratorium analyses uit te voer, naamlik seleniumvlakke in volbloed, plasma en weefsels, koper- en sinkvlakke in weefsels, superoksied dismutase in bloed, kreatienfosfokinase en aspartaat transaminase vlakke in die serum te bepaal. Antiliggamtiters is gemeet nadat diere met 'n vreemde proteïen ingeënt is.

Hierdie navorsing is uitgevoer met die goedkeuring en onder toesig van die etiese komitee van die Fakulteit van Biologiese- en Landbouwetenskappe van die Universiteit van Pretoria (000418-005).

2.1 Diere

Veertig Suid-Afrikaanse Vleismerino ooie van tweetand ouderdom is van dieselfde plaas aangekoop en vir die studie gebruik. Voor die aanvang van die toetsperiode is die diere vir 'n periode van drie maande op 'n lae kwaliteit hooi dieet geplaas om die minerale onder die soeklig tot lae reserwevlakke in die diere te laat daal. Die proef is op die Hatfield-proefplaas van die Universiteit van Pretoria uitgevoer.

Net voor die aanvang van die proef is vyf skape ewekansig gekies en geslag om sodoende die mineraalstatus van die diere te bepaal (dit word later verwys na as die slagproef). Die oorblywende skape is geweeg waarna die twee swaarste skape met die beste liggaamskondisie uitgegooi is. Drie-en-dertig skape is dus ontworm, ingeënt teen bloednier en in die proef gebruik.

2.1.1 Behuising:

Tydens die voorproefperiode is die skape saam in 'n kraal aangehou. Daarna is die diere vir die proefperiode van 90 dae individueel onderdak in hokke van 2.5 m x 1.5 m geplaas.

2.1.2 Groepindeling:

Nadat die skape geweeg is, is die massas geblok vanaf die ligste tot die swaarste skaap. Die skape is volgens gewig in drie blokke verdeel deurdat die skape uit die blokke gekies is, sodat al drie blokke eweveel van al die verskillende grootte diere bevat het.

In die onderstaande tabel word die behandelings van die drie groepe weergegee.

Tabel 2.1 Behandelingsgroepe (Selenium, koper en sink ontvang in mg/dier/dag en hooi in g/dier/dag)

Behandeling	Kontrole	Groep 1	Groep 2
Selenium	-	1.6	3.2
Sink	-	48.1	96.2
Koper	-	5	10
Smutsvingerhooi	950	950	950
Growwe sout	<i>Ad lib</i>	<i>Ad lib</i>	<i>Ad lib</i>
Water	<i>Ad lib</i>	<i>Ad lib</i>	<i>Ad lib</i>

2.1.3 Voorbereiding van suplementasie

Die minerale is as 'n oplossing gesupplementeer. Die oplossing is twee maal per dag, in die oggend en in die aand, oraal toegedien deur middel van 'n doseerspuit.

In Tabel 2.2 word die metode van voorbereiding van die suplementasie oplossing uiteengesit.

Tabel 2.2 Opmaak van die supplementasie oplossing

Reagens	Hoeveelheid (g)
Na ₂ SeO ₃ (45.66% Se)	0.88
ZnSO ₄ • H ₂ O (36.45% Zn)	32.98
CuSO ₄ • 5H ₂ O (25.43% Cu)	4.92
H ₂ O	5.0 L

Hierdie oplossing is so saamgestel dat daar in 20 mL 1.6 mg selenium, 48.1 mg sink en 5 mg koper teenwoordig is.

Groep 1 het dus in die oggend en in die aand 10 mL ontvang om 'n totaal van 20 mL/dier/dag in te neem, terwyl groep 2 gedurende dieselfde tye 20 mL ontvang het om 'n totaal van 40 mL/dier/dag in te neem.

2.1.4 Voeding:

Tydens die proefperiode is die skape individueel gevoer om die hooi-innames noukeurig te monitor. Die diere het elke oggend 950 g gemaalde *Digitaria eriantha* (Smutsvinger) ontvang.

Alle diere het elke dag toegang tot skoon drinkwater en growwe sout gehad. Onbenutte voer is weklíks terug geweeg om sodoende die gemiddelde daaglikse innames vir die week te bepaal.

Massas van die diere is soggens voor voeding op dag 0, week 2, 6, 8, 11 en 13 geneem.

2.2 Monsterneming, -preservering en –analiserings:

Lys van laboratoriumanalises:

2.2.1 Ruproteïen van voer

2.2.2 Droë-materiaal van voer

2.2.3 Minerale: Se, Zn en Cu konsentrasies in bloed en weefsels

2.2.4 Kreatien fosfokinase en aspartaat transaminase aktiwiteite in serum.

2.2.5 Superoksied dismutase aktiwiteit in plasma.

2.2.6 Antiliggam titers in plasma.

2.2.7 Hematokritwaardes

2.2.1 Droë materiaal en ruproteïen ontleding van voer

a. Monsterneming

Verteenwoordigende grypmonsters van reeds gemaalde hooi is voor die aanvang van die proef geneem. Die grypmonsters is weer eens goed gemeng om 'n kleiner verteenwoordigende monster te neem.

b. Monsterpreservering

Die monster is fyngemaal in 'n meule en in 'n monster bottel gebêre.

c. Monsteranalisering

Daar is van die Makro Kjeldahl-metode gebruik gemaak om die ruproteïen bepaling op die voer te doen.

Reagense:

1. H_2SO_4 – 98% (SG 1.84)
2. Selenium of HgO (Katalis)
3. Na_2SO – Natriumsulfaat (watervry)
4. Zn-korrels (Reduseermiddel)
5. NaOH – 45% oplossing (5 kg NaOH vlokkies opgelos in 12 L gedistilleerde water)
6. Boorsuur (4%) + indikator oplossing
 - 40 g boorsuur (H_3BO_3) is opgelos in \pm 800 mL kokende gedistilleerde water. Dit is gelaat om af te koel tot \pm 45 °C. Daarna is 10 mL Me-rooi (metiel-rooi) en 25 mL Me-blou (metiel-blou) bygevoeg en opgemaak tot 1000 mL met gedistilleerde water.
 - Metiel-rooi-versadigde oplossing in 96% etanol (dit wil sê 1 g Me-rooi opgemaak tot 200 mL met etanol). Dit is goed geroer en gefiltreer.
 - Metileenblou – 1 g metileenblou is opgelos in 625 mL etanol. Daarby is 575 mL gedistilleerde water gevoeg, deeglik gemeng en gefiltreer.

7. Me-oranje indikator (1 g Me-oranje opgelos in 200 mL Etanol). Dit is gebruik vir die bepaling van die normaliteit van die 0.1 N H_2SO_4 standaard suur.
8. H_2SO_4 – 0.05 M (0.1 N). 27.20 mL 98% H_2SO_4 is versigtig met gedistilleerde water gemeng en opgemaak tot 10 L in 'n volumetriese fles. Die normaliteit van die standard 0.1 N H_2SO_4 is dan akkuraat bepaal deur 20 mL 0.1 N Na_2CO_3 te titreer met die suur. (Twee druppels Me-oranje is by die Na_2CO_3 gevoeg).

Monsteranaliserings:

Die voermonster (0.350 g) is uitgeweeg in 'n 750 mL Kjeldahlfles. Drie glaskrale is in die fles gegooi en daarna die verteringsmengsel wat bestaan uit 10 g Na_2SO_4 en 0.4 g selenium. Laastens is 25 mL gekonsentreerde H_2SO_4 (98%) bygevoeg deur die fles skuins onderkant die buret te hou en stadig in die rondte te draai om sodoende enige voerdeeltjies af te spoel langs die nek van die fles.

Die fles is in 'n skuins posisie op die Kjeldahlverteringsrak geplaas en die oonde en die waaier is aangeskakel (die waaier suig alle giftige suurdampe weg). Die oplossing is gekook totdat dit helderkleurig was en vir nog mistens 'n half uur later gekook (vertering was dus \pm een uur). Daarna is die oond afgeskakel om die flesse te laat afkoel terwyl die waaier aan was. Nadat die flesse afgekoel het, is 35 mL boorsuur + indikator in 500 mL Erlenmeyerfles gegooi en onder die afleibuis van die distillasie-apparaat geplaas, sodanig dat die opening van die buise onder die vlak van die vloeistof was. Daarna is die oonde op die distilleerrak aangeskakel.

In die Kjeldahlflesse is die volgende bygevoeg:

- 350 mL gedistilleerde water
- 2 Zn-korrels
- \pm 100 mL 45% NaOH. Die oplossing moes sterk alkalies wees.
- Die verkoelingswater van die apparaat is aangeskakel.
- En die inhoud van die Kjeldahlflesse is gekook totdat daar 200 mL distillaat in die Erlenmeyerfles was.

Belangrik om te onthou was dat die NaOH baie stadig by die fles bygevoeg is terwyl die fles skuins gehou is, sodat die NaOH 'n laag onderin die fles kon vorm. Die fles is onmiddelik aan die spatkop van die distillasie-apparaat verbind en die fles is met 'n swaaibeweging geskud. Daarna is die Erlenmeyerflas verwyder en 'n beker met gedistilleerde water is onder die afleibuis geplaas waarna die oond afgeskakel is.

Die inhou van die Erlenmeyerfles is getitreer met die gestandaardiseerde 0.1 N H₂SO₄. Die titrasiesyfer is met 'n blanko gekorrigeer. Die % N is met die volgende formule bereken:

$$\% N = \frac{(\text{Titrasiesyfer} - B1) \times 0.1 \times 14 \times 100}{1000 \times \text{massa van monster (g)}}$$

2.2.2 Minerale ontleding

a. Monsterneming

Voermonsterneming het geskied soos verduidelik by 2.2.1a.

Bloedmonsters is in heparienbuisse vanuit die eksterne *jugular* aar van die dier versamel. Elke buis is direk na monsterneming horisontaal en vertikaal geswaai met stadige bewegings sodat die bloed volledig met die heparien kon meng.

Twee monsters is per dier is in die oggend voor voeding geneem (sien later vir die spesifieke dae waarop monsters geneem is). Een is vir volbloed ontledings gehou, en die ander een is binne een uur na monsterneming afgeswaai en die plasma is afgepipeteer.

Die bloed is so gou moontlik na die laboratoriums geneem vir preserving. Die volbloed is dadelik in die vrieskas (-20°C) geplaas terwyl die plasma gemerkte buise in teen 4000 g vir 20 minute afgeswaai is in 'n "Hettich-bench" sentrifugeerder .

Die plasma monsters is in suurgewaste buise (sien later vir metode) gevries teen -20 °C.

Weefselmonsters is geneem nadat die diere na afloop van die proefperiode geslag is. Lewers, niere, spierweefsel vanaf die *Longissimus dorsi*, aan die bokant van die laaste en tweede laaste rib asook die harte is versamel. Die niere en lewers is direk na verwydering uit die dier se karkas geweeg.

b. Monsterpreservering

Lewer: Vier verskillende gedeeltes van ongeveer 30 g elk en van ongeveer dieselfde lokaliteit is van elke lewer versamel.

Hartspier: Die onderste punt van die hartspier met alle sigbare vet verwyder, is geneem.

Nierkorteks. Die korteksgedeeltes is van die medulla geskei deur van 'n skerp lemmetjie gebruik te maak.

Alle weefselmonsters is in blokkies gesny en in 'n droogoond teen 100 °C vir 24 uur gedroog. Die monsters is daarna fyngemaal en in suurgewaste monsterbotteltjie gestoor.

c. Monstervoorbereiding

Voer- en weefselmonsters is deur middel van die **natverassings metode** voorberei vir mineraal ontledings van koper en sink.

Die blok is een uur voor die tyd aangeskakel om op te warm. Intussen is 1 tot 1.2 g van die monster in 'n suurgewaste buis afgeweeg. Verder is daar in die dampkas gewerk. 25 mL salpetersuur is by die monsters gevoeg waarna dit vir 10 minute op die verteringsblok geplaas is. Daar is noukeurig opgelet dat die monster nie skuim nie. Daarna is die buise vir 5 minute afgekoel en 'n verdere 10 mL perchloorsuur is bygevoeg. Die buise is weer op die verteringsblok vir 'n verdere 20 minute geplaas totdat die vloeistof strooikleurig was. Die buise is van die blok afgehaal om af te koel totdat geen dampe meer sigbaar was nie. Die buise is opgemaak met gedistilleerde water tot 50 mL, en in suurgewaste botteltjies geberg.

c. Monsteranalisering

Selenium

Seleniumvlakke in voer-, bloed- en weefselmonsters is volgens die hidriedgenerator metode (The Perkin-Elmer Corporation, 1980) bepaal. Die proses om een stel monsters van 40 buise te ontleed het oor 'n periode van twee dae verloop.

Hantering van glasware

Alle glasware wat gebruik is, is vooraf en na afloop van elke ontledingssessie deeglik gewas en oornag in 'n suurbad laat lê. Die suurbad bestaan uit 'n 5% HNO_3 - oplossing. Daarna is die glasware in gedistilleerde water afgespoel en in 'n droër geplaas om droog te word.

Dag1

Reagense wat gebruik is:

- a. 20% HCl oplossing
- b. 10% HCl oplossing
- c. Verteringsuur: $1\text{HClO}_4:4\text{HNO}_3$
- d. 0.5% NaOH-oplossing
- e. $\text{Na}(\text{BH}_4)$ -oplossing met *Sigma-Aldrich* se $\text{Na}(\text{BH}_4)$ 99%

Alle reagense behalwe waar anders aangedui is van *Merck* se *pro analysi* GR-graad.

Opmaak van standaarde

- a. Selenium "Stock Solution" (1 000 mg/L): Presies 0.1 g selenium poeier (AR Graad) is afgeweeg en met 10 mL 1:1 verdunde HNO_3 afgespoel na 'n skoon suurgewaste 100 mL volumetriese flessie. Dit is effens verhit om die selenium op te los. Daarna is dit opgemaak tot 100 mL met 20% HCl (6.4 m).
- b. 10 mg/L "Working Standard": 1.0 mL van die 1 000 mg/L standaard (by kamertemperatuur) is met 'n skoon A-Graad volumetriese pipet na 'n suurgewaste 100 mL volumetriese flessie oorgedra en opgemaak tot 100 mL

20% HCl. Dit is goed gemeng en in die yskas in 'n suurgewasde plastiese reagensbottel gestoor.

- c. 1 mg/L "Working Standard": 5 mL van die 10 mg/L standaard (by kamertemperatuur) is met 'n skoon A-Graad volumetriese pipet na 'n suurgewasde 50 mL volumetriese flessie oorgedra en opgemaak tot 50 mL met 20% HCl. Dit is goed gemeng en in die yskas in 'n suurgewasde plastiek reagensbottel gestoor. Hierdie standaard is weekliks opgemaak.
- d. Standaard wat saam met die monsters verteer word: Die 1 mg/L "Working Standard" is hiervoor gebruik. Dus is 2.0 mL van die opgemaakte standaard soos 'n monster verteer, en daarna tot 20 mL opgemaak.
 - 0.5 mL van die 1 mg/L tot 20 mL met 20% HCl (20 ng/mL) ► 2 ng wanneer na vertering opgemaak is tot 20 mL met 20% HCl.
 - 1.0 mL van die 1 mg/L tot 20 mL met 20% HCl (50 ng/mL) ► 5 ng wanneer na vertering opgemaak is tot 20 mL met 20% HCl.
 - 2.0 mL van die 1 mg/L tot 20 mL met 20% HCl (100 ng/mL) ► 10 ng wanneer na vertering opgemaak is tot 20 mL met 20% HCl.

Van elk van die drie standarde is presies 2.0 mL met 'n suurgewasde volumetriese pipet na 'n verteringsbuis oorgedra. Alle standarde en monsters is in duplikaat verteer.

Monstervoorbereiding

- a. Bloedmonsters: Die verteringsbuis is eers gemerk en geweeg voordat 0.2 – 0.5 mL bloed of plasma (beide by kamertemperatuur) na die buise oorgedra is met 'n verstelbare pipet. Daarna is die buise met bloed weer geweeg om die massa van die monster te bepaal.
- b. Weefsel- en voermonsters: 1.0 g weefsel- en 2.0 g voermonsters is in die verteringsbuis afgeweeg nadat elke monster goed gemeng is.
- c. Kontroles: In elke rak met monsters wat verteer is, is twee buise met 'n kontrole monster waarvan die seleniumwaarde bekend is, geplaas. Beeslewer (1.0 g)

(National Institute of Standards and Technology, 1577b; Gaithersburg, MD) is gebruik.

Natverassing

Nadat al die monsters ingeweeg is tesame met die standaarde en die kontroles, is 5 mL van die verteringsuurmengsel by elke buis gevoeg en op die verteringsblok, wat in 'n perchloorsuur dampkas staan, geplaas. Die blok is geprogrammeer sodat die verteringsproses oor 'n periode van 16 uur strek: 4 ure teen kamertemperatuur; 1 uur vanaf kamertemperatuur tot 100 °C; 1 uur by 100 °C; 1 uur vanaf 100 °C tot 180 °C; 6 ure by 180 °C; 2 ure vanaf 180 °C na 130 °C en 1 uur by 130 °C.

Dag 2

Omskakeling van Se VI na Se IV

Nadat die 16 ure verstreke was, is die rak met monsters van die verteringsblok verwyder om af te koel vir ongeveer 10 minute. Daarna is 2.5 mL 20% HCl by elke buis gevoeg en die rak is weer vir 'n verdere 40 minute terug op die verteringsblok geplaas. Tydens die 40 minute het die omskakeling van Se VI na Se IV plaasgevind.

Die aanskakeling van die atoom-absorpsie-spektrofotometer, en die lees van die seleniumwaardes.

Tydens die 40 minute waarin die selenium-omskakeling plaasvind, is die Perkin- Elmer (Norwalk, Connecticut, VSA) Atoom Absorpsie Spektrofotometer (AA) (model I2380) volgens die gebruikershandleiding opgestel, spesifiek vir die ontleding van selenium.

Nadat die selenium-omskakeling voltooi was, is die rak met monsters vanaf die verteringsblok verwyder om tot by kamertemperatuur af te koel.

Die buise se volume is opgemaak tot 20 mL met 20% HCl vir die standaarde en 10% HCl vir die monsters en kontroles.

Die glassel van die AA is aangeskakel om op te warm terwyl die buise op 'n vortex geskud is om goed te meng.

Die houers van die Varian dampstelsel (Mulgrave, Australië) (model VGA-77) van die AA is met 20% HCl en NaBH₄ gevul. Die dampstelsel is gekalibreer om 'n vloeï van 1.0 mL/min vir die reagense en 7.0 mL/min vir die monsterpypies te lewer.

Die absorpsies van die blanko, standaard en monsters is op die AA gelees en 'n kurwe is bepaal waarna die lesings van die monsters geneem is.

Berekening :

$$\frac{\text{Lesing}(\text{ng}) \times \text{Verdunning} (20)}{\text{Monstermassa} (\text{g})} = \text{Aantal Se} (\text{ng/g})$$

Koper en sink

Die weefsels is eers voorberei deur van die natverassings metode gebruik te maak wat onder 2.2.2 c "monstervoorbereiding" bespreek is. Daarna is die monsters direk met die atoom absorpsie spektrofotometer model GBC 905 AA ontleed volgens die gebruikshandleiding (Shaw, 1990).

2.2.3 Antilliggaamtiter

Bloed is vanuit die eksterne *jugular* aar van 'n melkkoei in heparienbuis versamel en as die "uitdaagproteïen" gebruik. Die skape is almal op dag 75 van die proef met 0.5 mL van die voorbereide beesbloed, binne-aars, ingeënt.

Voorbereiding van die beesbloed: Die eritrosiete en die plasma is deur sentrifugering teen 1200 g in 'n Beckman sentrifuge (model TJ6) geskei. Die eritrosiete is versamel en drie keer in 'n 40 mL fosfaatgebufferde saline (PBS) met pH van 7.4 gewas. Die gewaste eritrosiete is opgemaak tot 'n 30% hematokrit met die PBS. Daar is deurentyd steriel te werk gegaan.

a. Monsterneming

Op dag 74 en dag 90 is bloed vanuit die eksterne *jugular* aar van die skape in stolbuis versamel. Die monsters geneem op dag 74 is gebruik as 'n basislyn.

b. Monsterpreservering

Die serum is verkry deur die gestolde bloed te sentrifugeer in 'n Hettich-bench sentrifugeerder, die serum af te trek deur middel van 'n plastiese suigpipet en te vries by -20 °C.

c. Monstervoorbereiding

Die serum is ontdooi en vir 30 minute teen 56 °C geïnkubeer om die komplement te inaktiveer.

d. Monsterontleding

Plasmatiters van anti-bees eritrosiet antiliggame is deur passiewe hemagglutinasie bepaal deur van bees eritrosiete gebruik te maak. Daar is deurentyd van dieselfde bees gebruik gemaak.

'n 96 Put U – bodem titerplaat is gebruik en 125 µL PBS is in elke putjie gevoeg. In kolom 2 van die titerplaat is onverdunde skaapserum monsters (wat vooraf by 56 °C vir 30 minute geïnkubeer is) in duplikaat rye gevoeg. Daarna is die serummonsters van kolom 2 opeenvolgend verdun deur elke keer 125 µL van die serum na deeglike vermenging met die PBS na die volgende kolom oor te dra. In kolom 12 is die serum en PBS gemeng en 125 µL hiervan verwyder.

Bees-eritrosiete is gewas en opgemaak na 'n hematokrit van 2% en 25 µL van die suspensie is in elke putjie oor die plaat ingevoeg. Die plate is liggies geskud en na 2 ure op 'n ligbron gelees. Die antiliggaamtiter is geneem as die hoogste verdunning waar hemagglutinasie plaasgevind het. Die 1:1 verdunning is 'n waarde van 1 toegeken, terwyl die 1:2 verdunning 'n waarde van 2, 1:4 verdunning 'n waarde van 3 ensovoorts, toegeken is. Kolom 1 wat slegs PBS en bees eritrosiete bevat het, het as negatiewe kontrole gedien (Nicholson *et al.*, 1993).

2.2.3 Superoksied dismutase

a. Monsterneming

Bloedmonsters is vanuit die eksterne *jugular* aar op dag 1, 45 en 90 van die toetsperiode in heparienbuisie versamel.

b. Monstervoorbereiding

Drie eparandorbuisies met elk 0.5 mL volbloed is per monster geneem en in 'n "Hettigh bench" (model EBA 12/12R) sentrifugeerder afgeswaai teen 3000 g vir 10 minute. Die plasma is afgepipetteer en die selle is drie maal met 'n 0.9% saline oplossing gewas terwyl tussen elke wasproses weer vir 10 minute teen 3000 g gesentrifugeer is. Daarna is 2 mL yskoue gedistilleerde water bygevoeg en die eparandorbuisie heftig geskud om die eritrosietselle te breek .

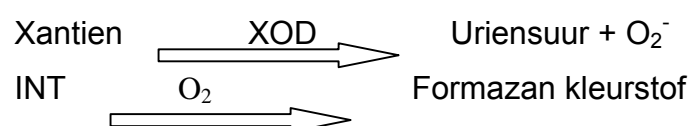
c. Monsterpreservering

Die monsters is by -20°C gestoor. Dit kan tot 5 maande gestoor word.

d. Monsterontleding

Die RANSOD-ontwikkelde metode van Radox-laboratoriums is gebruik vir die analise en die produk nommer is SD 125.

Die rol van superoksied dismutase (SOD) is om die dismutasie van die toksiese superoksied radikaal (O_2^-), wat gedurende die oksidatiewe energie proses geproduseer word, na waterstof peroksied en molekulêre suurstof te versenel. Die metode vereis xantien en xantien oksidase (XOD) om superoksied radikale te genereer wat dan met 2-(4-iodofeniel)-3-(4-nitrofenol)-5-fenieltetrazonium chloried (INT) reageer om 'n rooi formazan kleurstof te vorm. Die SOD aktiwiteit word dan gemeet deur die mate waarin die reaksie geïnhibeer word.



Of



Nadat die bloedmonsters uit die vrieskas gehaal en ontdooi is, is dit vir 15 minute by +4 °C gehou. Die "lysate" is verdun met 0.01 mmol/L fosfaat buffer (pH 7.0) 'n 25voudige verdunning is aanbeveel vir die finale verdunningsfaktorwat gelyk is aan eenhonderd.

Tabel 2.3 Reagense wat gebruik word

INHOUD	BEGIN KONSENTRASIE VAN OPLOSSINGS
1. Gemengde substraat	
Xanthine	0.05 mmol/L
INT	0.025 mmol/L
2. Buffer	
CAPS	40 mmol/L, pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/L
3. Xanthine oksidase	80 U/L
4. Standaard	Kyk aangetekende waarde op houer.

Die addisionele reagens met produk nommer SD124 (0.01 mol/L fosfaatbuffer pH 7.0) is ook gebruik.

Vorbereiding van die oplossings

- i. Gemengde substraat: Die inhoud van een houertjie van gemengde substraat 1 is met 20 mL van buffer 2 gemeng. Dit is stabiel vir 10 dae by +2 °C tot +8 °C
- ii. Buffer: Die inhoud is gereed vir gebruik, en is stabiel tot die aangeduide vervaldatum by +2 °C tot +8 °C.

- iii. Xantien oksidase: Die inhoud van een houertjie xantien oksidase 3 is met 10 mL gedistilleerde water gemeng. Dit is stabiel vir 2 weke by +2°C tot +8 °C.

Standaard: Die inhoud van een houertjie van standaard 4 is gemeng met 10 mL gedistilleerde water. Opvolgende verdunnings van die standaard is voorberei met RANSEL monsterverdunner (SD124). Die aanbevole verdunnings van standaard 4 of S6 is gevolg om die volgende standaard kurwe te verkry:

Tabel 2.4 Standaard se verdunnings vir die standard kurwe

	Volume van standaard	Volume van monster verdunner
S6	ONVERDUND	---
S5	5 ml van S6	5 mL
S4	5 mL van S5	5 mL
S3	5 mL van S4	5 mL
S2	3 mL van S3	6 mL
S1	Monsterverdunner	

Alle verdunde standaard is stabiel vir 2 weke by +2 °C tot +8 °C.

Prosedure

Golflengte: 505 nm

Cuvette: 1 cm padlengte

Temperatuur 37 °C

Meting: Teen lug

Tabel 2.5 Die volgende is in die cuvette gepipeteer:

	Monsterverdunner	Standaard S2-6	Verdunde monster
Verdunde monster	---	---	0.05 mL
Standaard	---	0.05 mL	---
Ransod monsterverdunner	0.05 mL	---	---
Gemengde substraat	1.7 mL	1.7 mL	1.7 mL
Goedgemeng			
Xanthine oksidase	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL

Weer is dit goed gemeng. Die begin absorpsie A1 is na 30 sekondes geneem terwyl die tydhouer gelyktydig aangeskakel is. Die finale absorpsie A2 is na 3 minute gelees.

Berekening:

$$\frac{A2 - A1}{3} = \Delta A / \text{min van standaard of monster}$$

Monsterverdunnertempo (S1-tempo) = tempo van die ongeïnhibeerde reaksie = 100%

Alle standarde se tempo's is omgeskakel na 'n persentasie van die monsterverdunnings tempo en afgetrek van 100% om die persentasie inhibisie aan te toon.

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ std/min} \times 100)}{(\Delta A \text{ s1/min})} = \% \text{ inhibisie}$$

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ monster/min} \times 100)}{(\Delta A \text{ s1/min})} = \% \text{ inhibisie}$$

Die persentasie inhibisie vir elke standaard is geplot teen Log₁₀ ([Standaard] in SOD eenhede/mL)

Die persentasie inhibisie van die monsters is verkry om die eenhede SOD vanaf die standaard kurwe te verkry.

SOD eenhede/mL volbloed = SOD eenhede/mL vanaf die standaardkurwe vermenigvuldig met die verdunningsfaktor.

Omskakeling van SOD eenhede/g hemoglobien:

$$\frac{\text{SOD eenhede/mL}}{\text{g hemoglobien}} = \text{SOD eenhede/g hemoglobien}$$

2.2.5 Kreatien fosfokinase

Kreatien fosfokinase is een van die mees orgaanspesifieke serum ensieme in kliniese gebruik. Dit kataliseer die omkeerbare fosforilasie van kreatien deur ATP om kreatienfosfaat en ADP te vorm. Kreatienfosfaat is die hoof stoor van hoë energie fosfaat wat benodig word deur die spier vir sametrekingsfunksies (Kaneko, 1980).

Monsterneming

Bloedmonsters is vanuit die eksterne *jugular* aar van die proefdiere in stolbuise, op dag 90 van die toetsperiode, versamel.

Monstervoorbereiding

Die bloed is afgeswaai teen 1500 g vir 20 minute in 'n "Hettich bench" sentrifuge waarna die serum afgetrek is.

Monsterpreservering

Die monsterbuisies is by -20 °C bewaar. Die monsters is binne 30 dae na monsterneming ontleed.

Monsteranalisering.

Die Technicon RA-1000 ® sisteem van Alsatech is gebruik om die kreatien kinase aktiwiteit in die serum te bepaal.

N-asetielsisteïen, wat kreatienaktiwiteit herstel en heraktiveer in die serum monster, kom in die reagense wat gebruik word voor.

Kreatien kinase reageer met kreatien fosfaat en ADP om sodoende ATP te vorm, wat weer gekoppel is aan die heksokinase/GDP reaksie om sodoende NADPH te vorm.

Die kreatien kinase aktiwiteit word dus bepaal deur die tempo van NADPH – produksie wat teen 340 nm absorbeer, aangesien die KT en NADPH direk proporsioneel tot mekaar is. (Reagens BAYER produk no T11-1880-02 en kontrole Humatrol P van Boehringer-Mannheim).

2.2.6 Aspartaat transaminase

Aspartaat transaminase en glutamaat oksaloasetaat transaminase (GOT) kataliseer die transaminasie van L-aspartaat en α -oksalogluteraat na oksaloasetaat en glutamaat. AST is teenwoordig in die mitochondria en sitosol van byna alle selle in die spier en lewer (Kaneko, 1980).

Monsterneming

Bloedmonsters is vanuit die eksterne *jugular* aar van die proefdiere in stolbuise, op dag 90 van die toetsperiode, versamel.

Monstervoorbereiding

Die bloed is afgeswaai teen 1500 g vir 20 minute in 'n "Hettich bench" sentrifuge waarna die serum afgetrek is.

Monsterpreservering

Die monsterbuisies is by $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bewaar. Die monsters is binne 30 dae na monsterneming ontleed.

Monsteranalisering

Die Technicon RA-1000® sisteem van Alsateck is volgens metode nommer SM4-0137E94 gebruik om die aspartaat aminotransferase aktiwiteit in die serum te bepaal. Die reaksie word geïnisieer deur die toevoeging van 'n "patient sample" by die reagens: L-Aspartaat + α -ketogluteraat $\xrightarrow{\text{AST}}$ Oksaalasetaat + L-Glutamaat



Die konsentrasie NADH word gemeet deur die verlaging in absorpsie by 340 nm. Die tempo waarteen die absorpsie verlaag is, is proporsioneel tot die AST aktiwiteit. Piridoksaal 5-fosfaat (produk no. T11-1513-56) is die ko-ensiem in die aspartaat aminotransferase reaksie. Die teenwoordigheid van hierdie ko-ensiem in die reagens,

aktiveer enige onbeskikbare onversadigde apo-ensiem (ensiem sonder ko-ensiem) en verhoog die gemete AST aktiwiteit (Reagensnommers: T11-1747 en T11-1749 is gebruik. Die kontroles: TECHNICON TEST point Assayed Chemistry Controls 1 en 2 T03-1220-62 en T03-1221-62 onderskeidelik is gebruik).

2.2.7 Hematokrit

Twee oop-einde glas kappilêre buisies (diameter 1.2-2.4 mm, lengte 75 mm) is gevul met $\frac{3}{4}$ bloed. Om dit te doen is die buisies so horisontaal as moontlik gehou met een end in die monster sodat die buisie met behulp van kappilêre aksie gevul kon word. Die ander oop end is gevul met behulp van 'n spesiale gom, maar kan ook gesmelt word deur van 'n bunsenvlam gebruik te maak. Die buisies is dan in die mikro-hematokrit bank sentrifugeerder vir vyf minute teen 10000-12000 rpm gesentrifugeer. Daar moet seker gemaak word dat die twee kappilêre buisies reg oor mekaar is sodat die sentrifugeerder gebalanseerd is met die geseelde endpunte na buite. Nadat die buisies gesentrifugeer is, is die hematokrit waarde bepaal deur dit van 'n skaal af te lees. Die onderkant van die bloed kolom is op die nul geplaas en die boonste end van die plasma kolom is op 100% = 1.0 geplaas. Die hematokrit is dan vanaf die boonste end van die eritrosiet kolom gelees (Diagnostica Merck, 1984).

2.2.8 Statistiese ontledings

'n Variansie analise met die GLM model (Statistical Analysis Systems, 1994) is gebruik om betekenisvolle verskille tussen behandelings te bepaal. Gemiddeldes en standard foute (SF) is bereken. Betekenisvolle verskille (5%) tussen gemiddeldes is bepaal met die Fisher toets (Samuels, 1989).

Chi-kwadraat toetse met die NPAR1WAY model en Kruskal-Wallis toets (Statistical Analysis Systems, 1994) is gebruik om betekenisvolle verskille tussen behandelings vir die massaverskille en teenliggaampies te verkry

Log transformasie toetse (Sattistical Analysis Systems, 1994) is gebruik om betekenisvolle verskille tussen behandelings vir die lewer koper en lewer selenium te verkry.

HOOFSTUK 3

RESULTATE

3.1 Resultate van die voorafgaande slaggroep

Die resultate van die mineraalvlakke in die lewers van die lammers wat tydens die voorafgaande slagproef ontleed is, word in Tabel 3.1 aangegee.

Tabel 3.1 Koper (Cu), mangaan (Mn), kobalt (Co), sink (Zn) en selenium (Se) ontledings van die lewers van vyf ewekansig verkose diere

	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Co (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Se (ng/g)
Lewer 1	149.2	9.8	2.5	111.9	360.0
Lewer 2	245.0	9.6	2.5	103.0	480.0
Lewer 3	344.2	8.3	2.5	95.0	460.0
Lewer 4	195.0	11.0	2.1	96.3	440.0
Lewer 5	155.0	8.3	2.1	106.9	356.4
Gemiddeld	217.7 ± 80.5	9.4 ± 1.1	2.34 ± 0.2	102.6 ± 7.1	419.3 ± 57.5

3.2 Ruproteïen-, mineraal- en droëmateriaalbepaling op die voer.

Die resultate word in Tabel 3.2 op 'n droëmateriaalbasis weergegee.

Tabel 3.2 Resultate van die hooi-ontleding op droëmateriaalbasis

Nutriënt	Konsentrasie	Nutriënt	Konsentrasie
Ruproteïen (%)	10.8	Co (mg/kg)	3.15
Zn (mg/kg)	33.5	Cu (mg/kg)	10.8
Mn (mg/kg)	201.6	Ca (g/kg)	3.8
Se (mg/kg)	0.0073	DM (%)	92.0

3.3 Daaglikse voerinnames

Die daaglikse voerinnames (soos gevoer) word in Tabel 3.3 weergegee en word in Figuur 3.1 grafies voorgestel.

Tabel 3.3 Die gemiddelde daaglikse hooi-innames van die lammers per week gedurende die proefperiode (g/dier/dag)

Week	Kontrole	Groep 1	Groep 2
1	781 ± 108	762 ± 91	787 ± 58
2	810 ± 68	778 ± 89	844 ± 73
3	784 ± 72	761 ± 79	815 ± 72
7	868 ± 71	869 ± 70	895 ± 60
8	852 ± 86	842 ± 78	887 ± 59
9	851 ± 88	846 ± 94	868 ± 74
10	871 ± 61	861 ± 88	860 ± 80
11	857 ± 53	843 ± 86	877 ± 71
12	863 ± 49	848 ± 81	849 ± 78
Gemiddeld	837 ± 39	823 ± 41	853 ± 35

3.4 Massas

Die volledige uiteensetting van die massas gedurende die verloop van die proef word in Tabel 3.5 weergegee en in Figuur 3.2 grafies voorgestel. Die verskil tussen die begin massa en die eindmassa van die drie behandelingsgroepe is statisties, met gebruik van ko-variensie, ontleed en word in Tabel 3.4 weergegee.

Tabel 3.4 Die verskil tussen gemiddelde begin en eindmassas binne behandelings, (kg/dier)

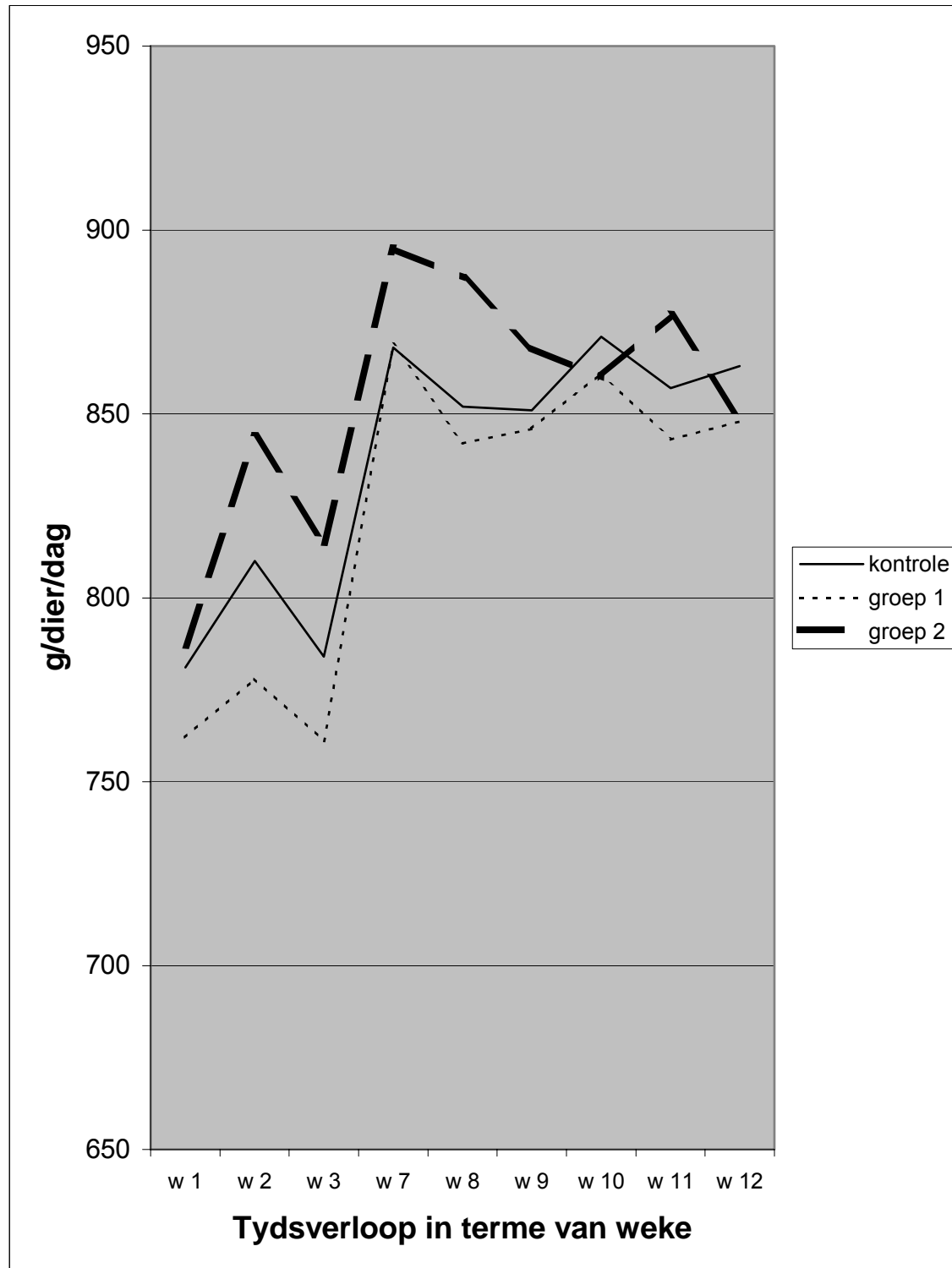
Kontrole	Groep 1	Groep 2
- 0.07 ± 0.53	0.23 ± 0.53	0.74 ± 0.56

Verskille tussen groepe is statisties nie betekenisvol nie $P > 0.005$

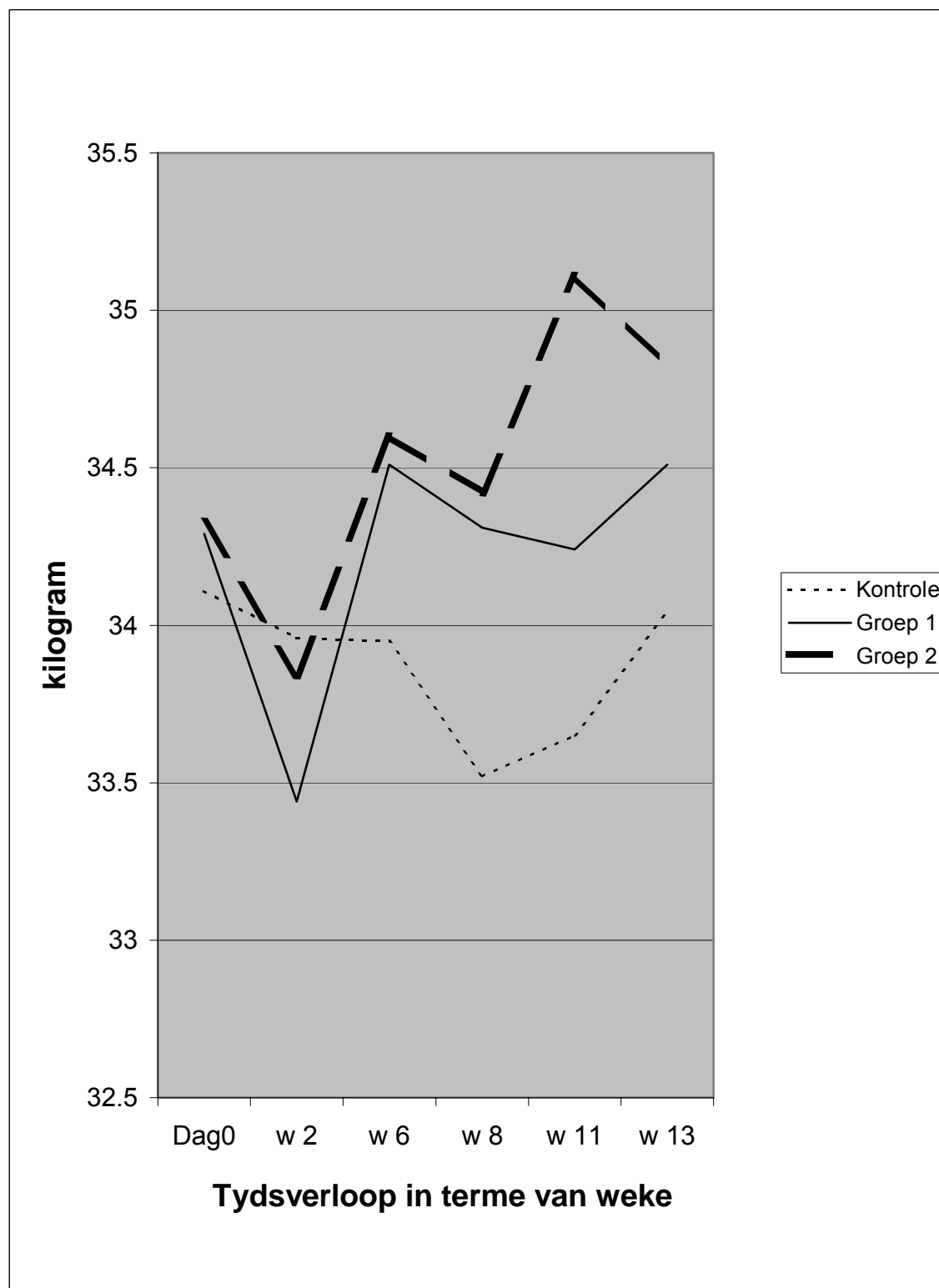
Tabel 3.5 Die gemiddelde massas van die proefdiere (kg) per week gedurende die proefperiode

Week	Kontrole	Groep 1	Groep 2
0 (Dag)	34.11	34.29	34.33
2	33.96	33.44	33.84
6	33.95	34.51	34.60
8	33.52	34.31	34.42
11	33.65	34.24	35.11
13	34.04 ± 0.48	34.51 ± 0.48	34.82 ± 0.50

Verskille tussen groepe is nie statisties betekenisvol nie ($P > 0.05$)



Figuur 3.1 Gemiddelde daaglikse hooi-innames van die lammers binne behandelings vanaf week 1 tot 11



Figuur 3.2 Die gemiddelde massas van die lammers op dag 0 en week (w) 2 , 6, 8, 11 en 13

3.5 Seleniumvlakke in volbloed, plasma en weefsels

Seleniumvlakke in die bloed is op dae 0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 en 90 bepaal. Hierdie resultate word in Tabel 3.6 (vir volbloed) en Tabel 3.7 (vir plasma) opgesom en in Figuur 3.3 (vir volbloed) en Figuur 3.4 (vir plasma) grafies voorgestel. In Tabel 3.8 word die gemiddelde selenium vlakke in die hartspier, niere, lewer en *L. dorsi* spier weergegee.

Tabel 3.6 Die gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die lammers op verskillende dae gedurende die proefperiode (ng/g)

Dag	Kontrole	Groep 1	Groep 2
0 ^a	48 ± 6.2	61 ± 5.9	59 ± 5.9
1 ^b	48 ± 8.2	90 ± 7.8	106 ± 7.8
2 ^c	47 ± 8.7	112 ± 8.2	132 ± 8.2
4 ^d	38 ± 7.8	123 ± 7.4	159 ± 7.4
8 ^e	43 ± 6.8	171 ± 6.4	216 ± 6.4
15	40 ± 9.1	203 ± 8.6	258 ± 8.6
30	38 ± 8.3	272 ± 7.9	333 ± 7.9
60	33 ± 10.7	347 ± 10.1	429 ± 10.1
90	26 ± 11.0	337 ± 11.6	435 ± 11.0

a: Op dag nul is daar geen betekenisvolle verskille tussen die verskillende behandelingsgroepe nie ($P > 0.05$)

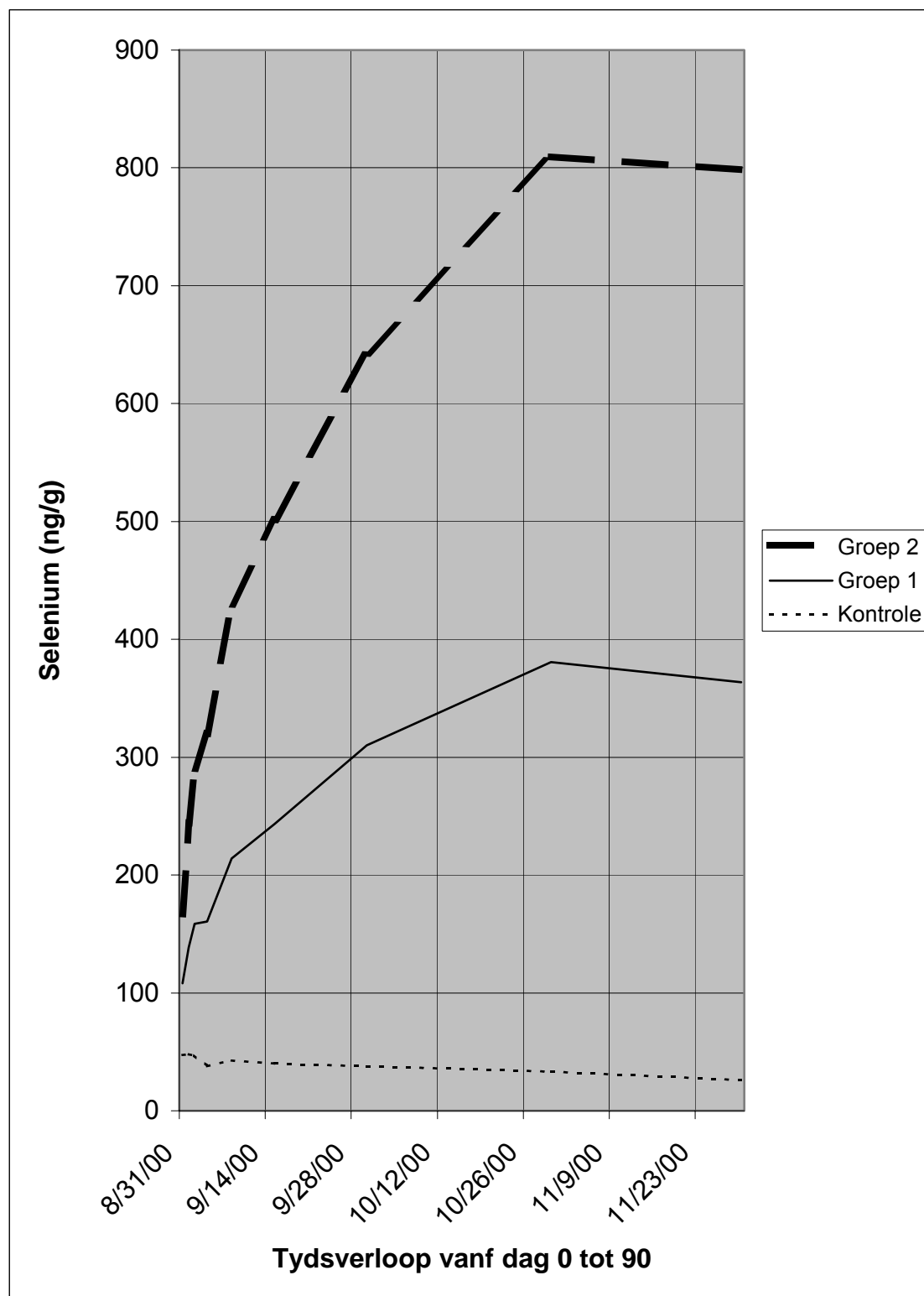
b: Op dag 1 is die verskille tussen die kontrolegroep en groep 1 betekenisvol ($p < 0.05$), tussen die kontrolegroep en groep 2 hoogs betekenisvol ($P < 0.001$) maar geen verskil tussen groep 1 en groep 2 nie ($P > 0.05$)

c: Op dag 2 is die verskille tussen die kontrolegroep en groep 1 en 2 hoogs betekenisvol ($P < 0.01$), maar steeds geen verskil tussen groep 1 en groep 2 nie ($P > 0.05$)

d: Op dag 4 is die verskille tussen die kontrole groep en groep 1 en 2 hoogs betekenisvol ($P < 0.01$) en die verskille tussen groep 1 en groep 2 is betekenisvol ($P < 0.05$)

e: Vanaf dag 8 is die verskille tussen al drie die behandelingsgroepe hoogs betekenisvol ($P < 0.01$)

Die wyse waarop seleniumvlakke in die volbloed tussen die drie behandelingsgroepe gestyg het vanaf dag 0 tot 90 kan duidelik in Figuur 3.3 waargeneem word.



Figuur 3.3 Die gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed (op die x-as is die datum aangegee byvoorbeeld 8/31/00 is 31 Augustus 2000)

Die plasmamonsters van dag 0 het ongelukkig verlore geraak en die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma vanaf dag 1 tot dag 90 word in die volgende tabel weergegee.

Tabel 3.7 Die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma op verskillende dae gedurende die proefperiode (ng/g)

Dag	Kontrole	Groep 1	Groep 2
1 ^a	28 ± 7.5	63 ± 7.5	88 ± 8.0
2 ^b	8 ± 3.7	107 ± 3.7	151 ± 4.0
4	4 ± 5.7	141 ± 5.7	196 ± 6.1
8	13 ± 7.7	165 ± 7.7	225 ± 8.0
15	14 ± 6.1	162 ± 6.1	227 ± 6.4
30	9 ± 5.9	167 ± 5.9	222 ± 6.3
60	8 ± 7.0	181 ± 7.0	233 ± 7.4
90	14 ± 7.7	172 ± 7.7	242 ± 8.2

a: Op dag 1 is die verskille tussen die kontrolegroep en groep 1, en tussen groep 1 en groep 2 betekenisvol ($P < 0.05$), terwyl die verskille tussen die kontrolegroep en groep 2 hoogs betekenisvol is ($P < 0.01$)

b: Vanaf dag twee is die verskille tussen al drie die behandelingsgroepe hoogsbetekenisvol ($P < 0.01$)

In Figuur 3.4 word die wyse waarop die seleniumvlakke in die plasma gestyg het grafies voorgestel.

Tabel 3.8 Die gemiddelde selenium vlakke in die hartspier, niere, lewer en *L. dorsi* spier (ng/gDM)

	Hartspier	Nierkorteks	Lewer	<i>L. dorsi</i> spier
Kontrole	113 ± 31.7 ^a	3521 ± 457.3 ^d	165 ± 1483.1 ^g	43 ± 23.2 ^j
Groep 1	1413 ± 28.4 ^b	6933 ± 457.3 ^e	10873 ± 1483 ^h	427 ± 21. ^k
Groep 2	1699 ± 29.9 ^c	7516 ± 479.7 ^f	27919 ± 555.5 ⁱ	501 ± 25.1 ^l

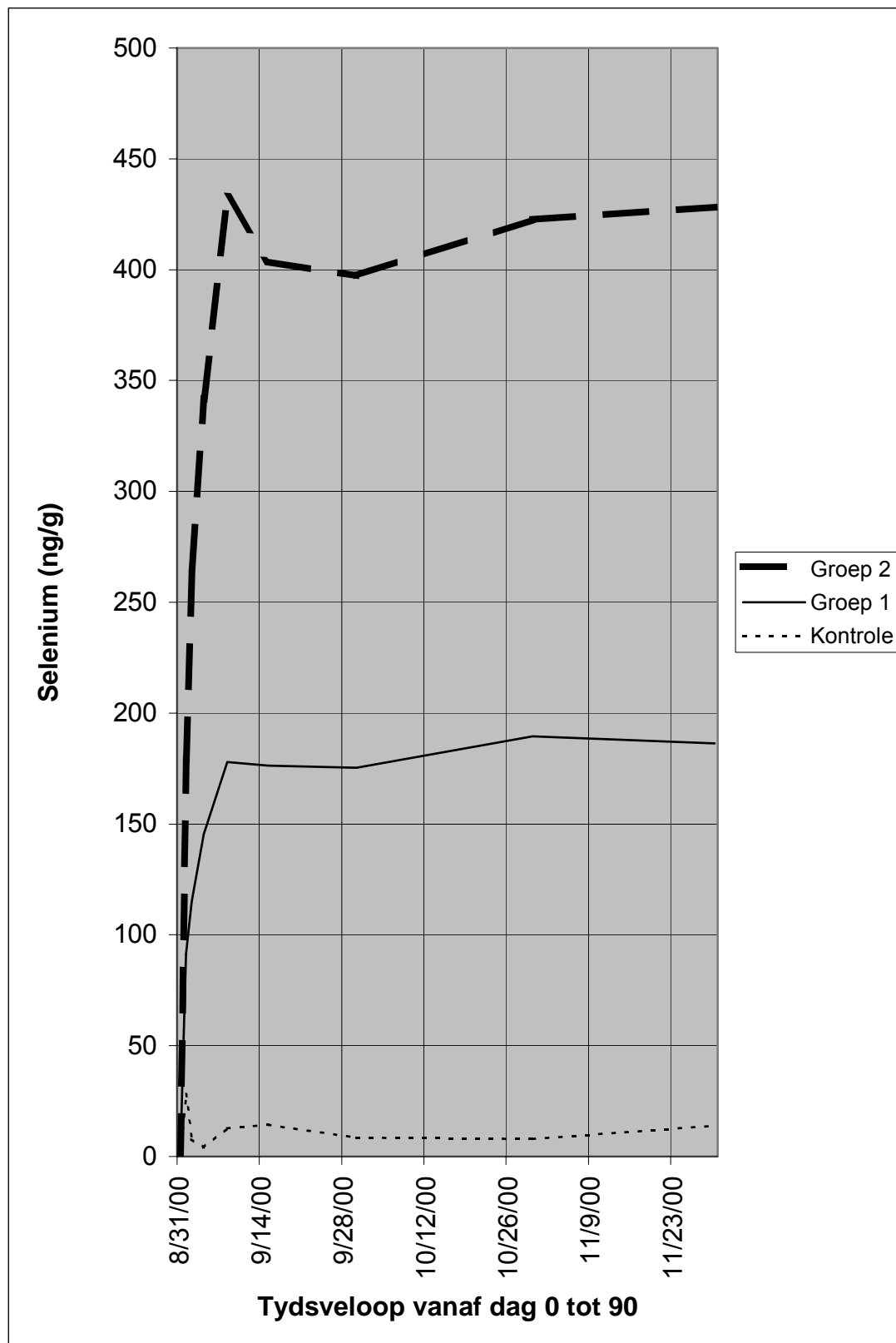
Verskille tussen:

a – b; a – c; b – c is hoogs betekenisvol ($P < 0.01$)

d – e; d – f is hoogs betekenisvol ($P < 0.01$), e – f is nie betekenisvol nie ($P > 0.05$)

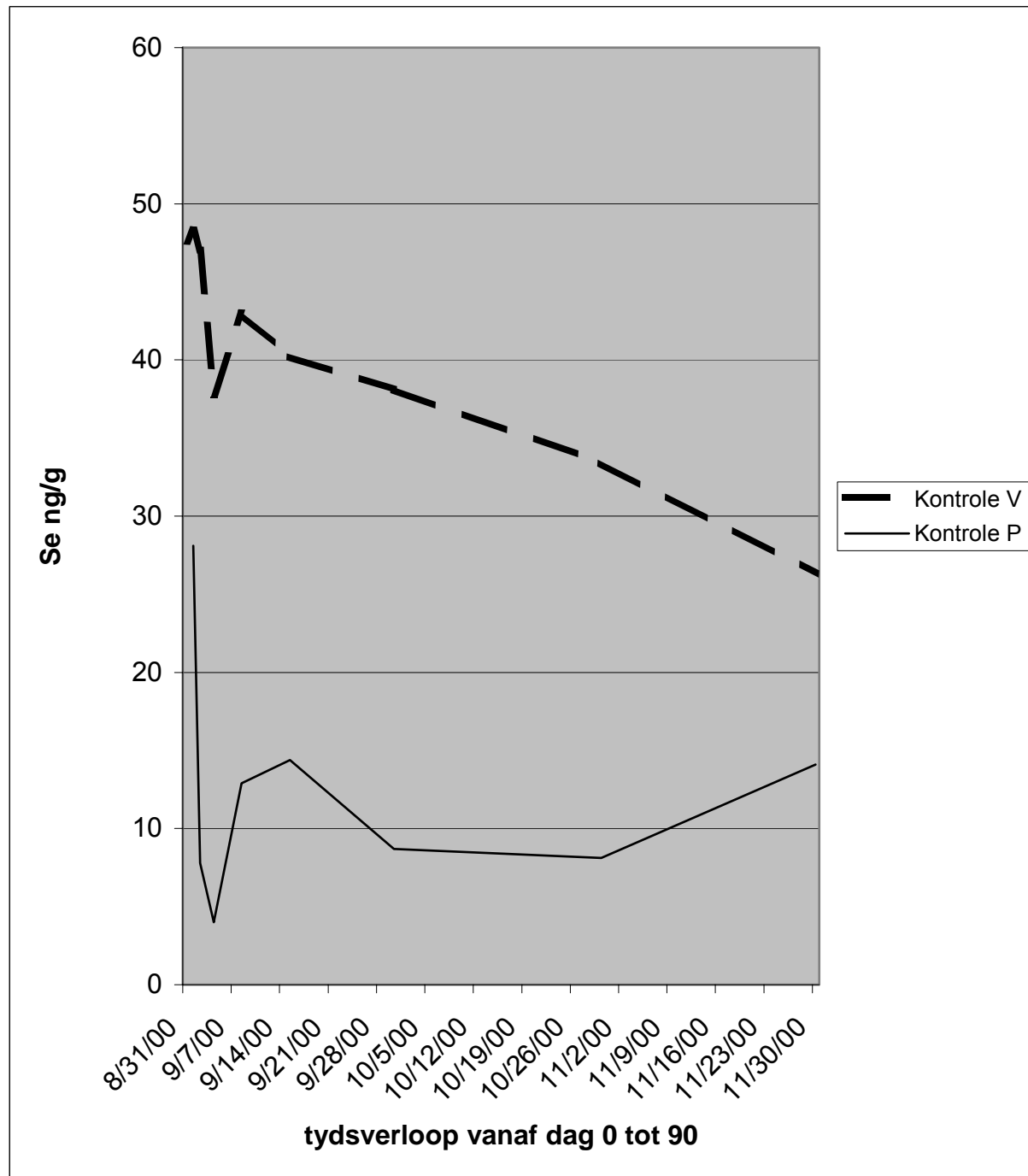
g – h – i is hoogs betekenisvol ($P < 0.01$)

J – k; J – L is hoogs betekenisvol ($P < 0.01$); k – L is betekenisvol ($P < 0.05$)

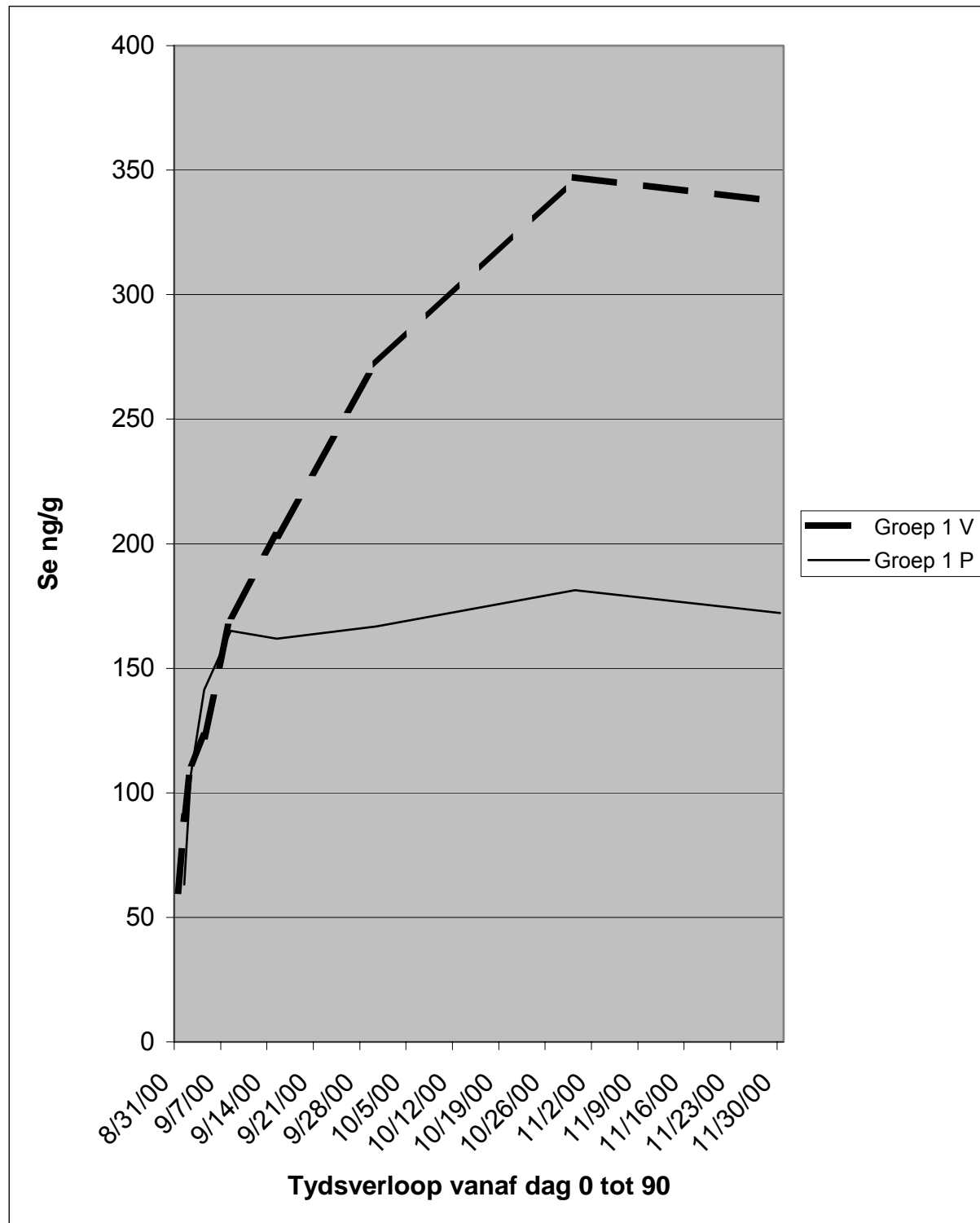


Figuur 3.4 Die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma van die lammers vanaf dag 0 tot 90

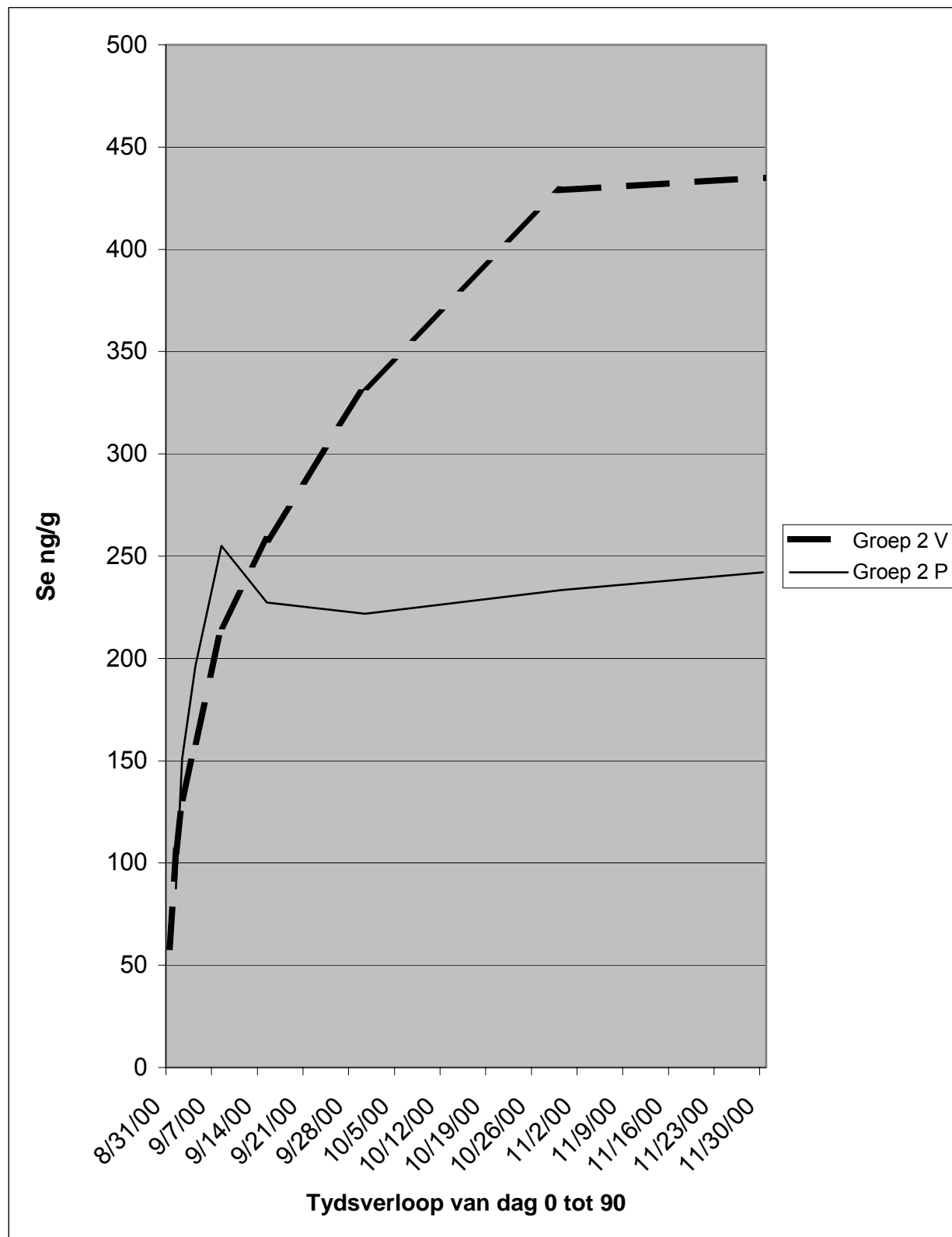
In die onderstaande drie figure (Figure 3.5,3.6 en 3.7) kan 'n vergelyking tussen die wyse waarop die selenium in die volbloed en in die plasma styg getref word.



Figuur 3.5 Die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma en volbloed van die kontrole groep vanaf dag 0 tot dag 90

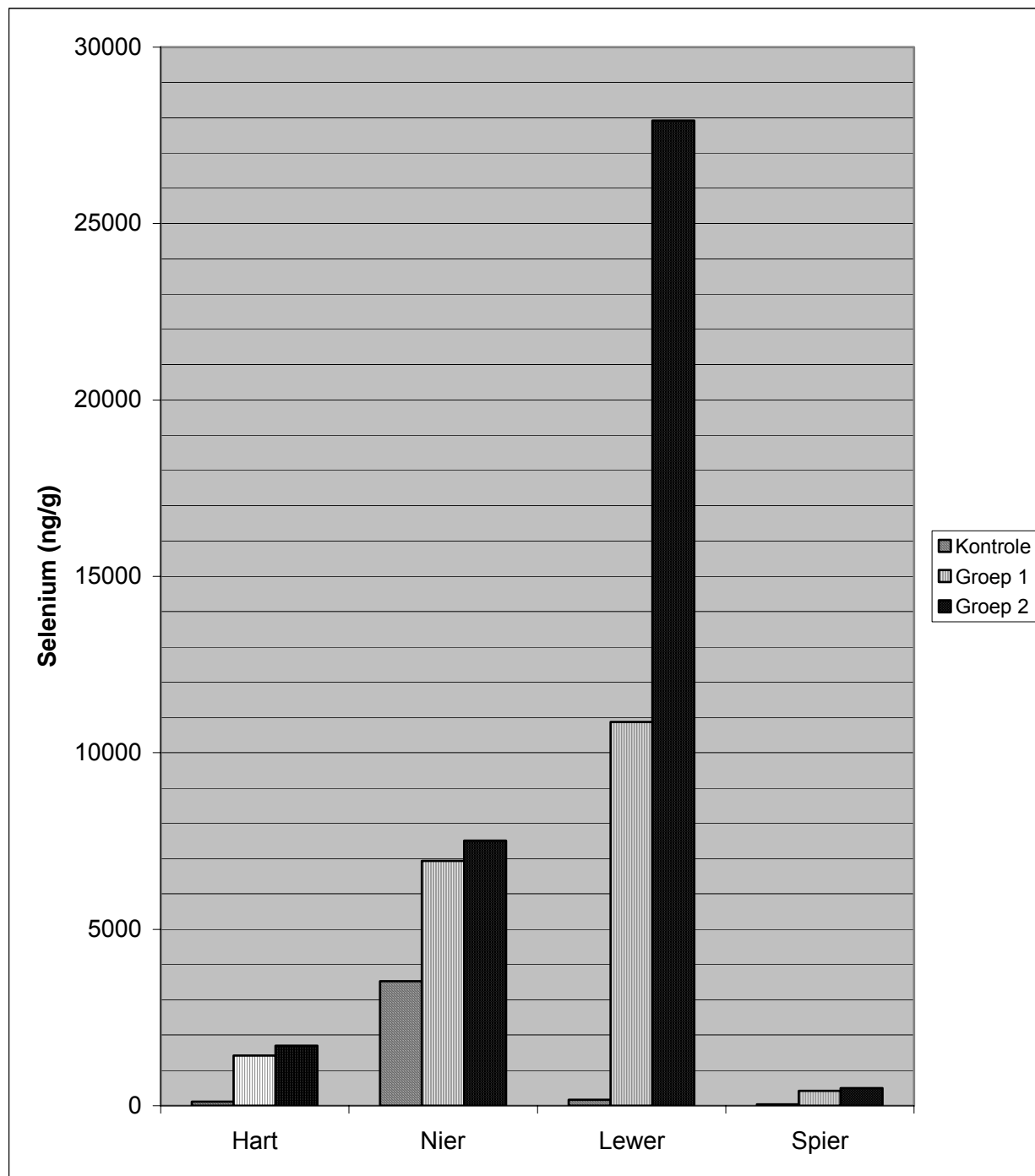


Figuur 3.6 Gemiddelde seleniumvlakke in die plasma (groep 1 P) en volbloed (groep 1 V) van groep 1 vanaf dag 0 tot 90



Figuur 3.7 Die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma en volbloed van groep 2

Die seleniumvlakke in die hart, spier, nier en lewer word in Figuur 3.8 grafies voorgestel



Figuur 3.8 Die gemiddelde seleniumvlakke (ng/gDM) in die hart, spier, nier en lewer van die proefdiere

3.6 Kopervlakke in die lewer

Die gemiddelde kopervlakke in die lewers van die drie behandelingsgroepe word in Tabel 3.9 weergegee en grafies in Figuur 3.9 uitgebeeld.

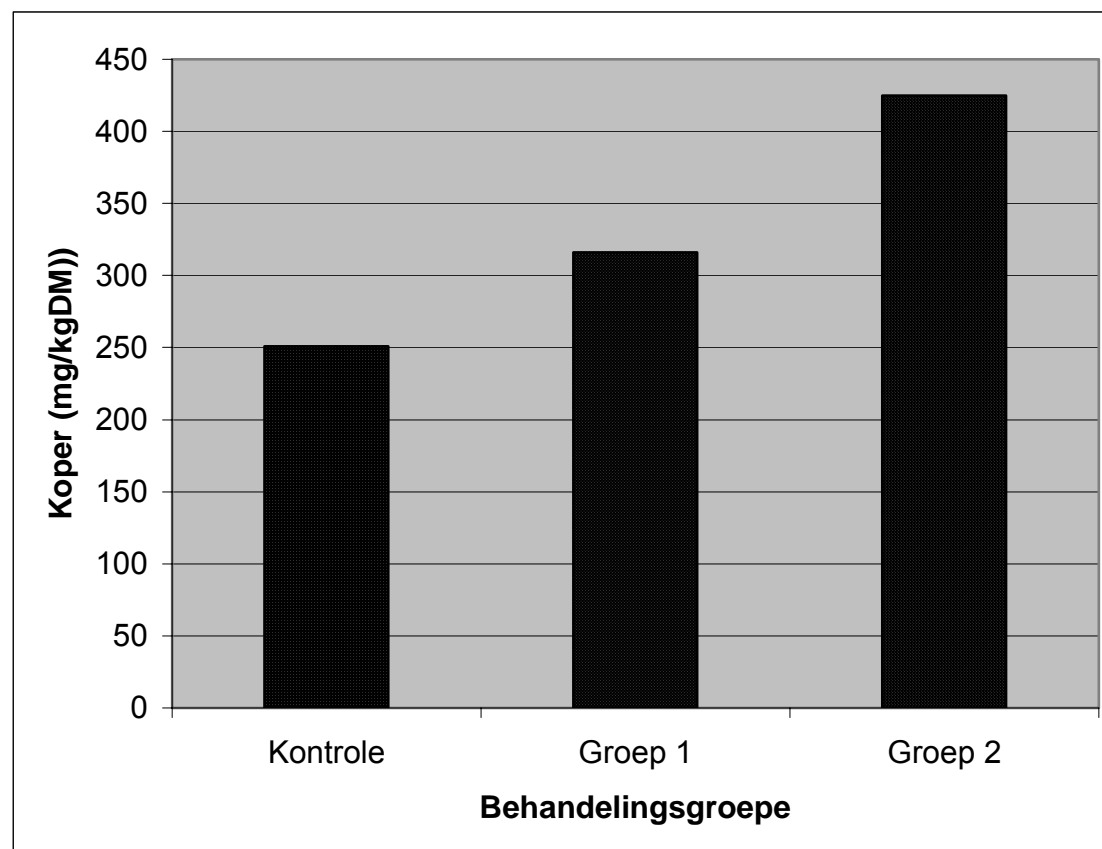
Tabel 3.9 Die gemiddelde kopervlakke in die lewer (mg/kgDM)

	Koper
Kontrole	251 ± 37.5 ^a
Groep 1	316 ± 37.5 ^b
Groep 2	425 ± 39.4 ^c

Verskille tussen:

a – b, b – c is nie betekenisvol nie ($P > 0.05$),

a – c is betekenisvol ($P < 0.05$)



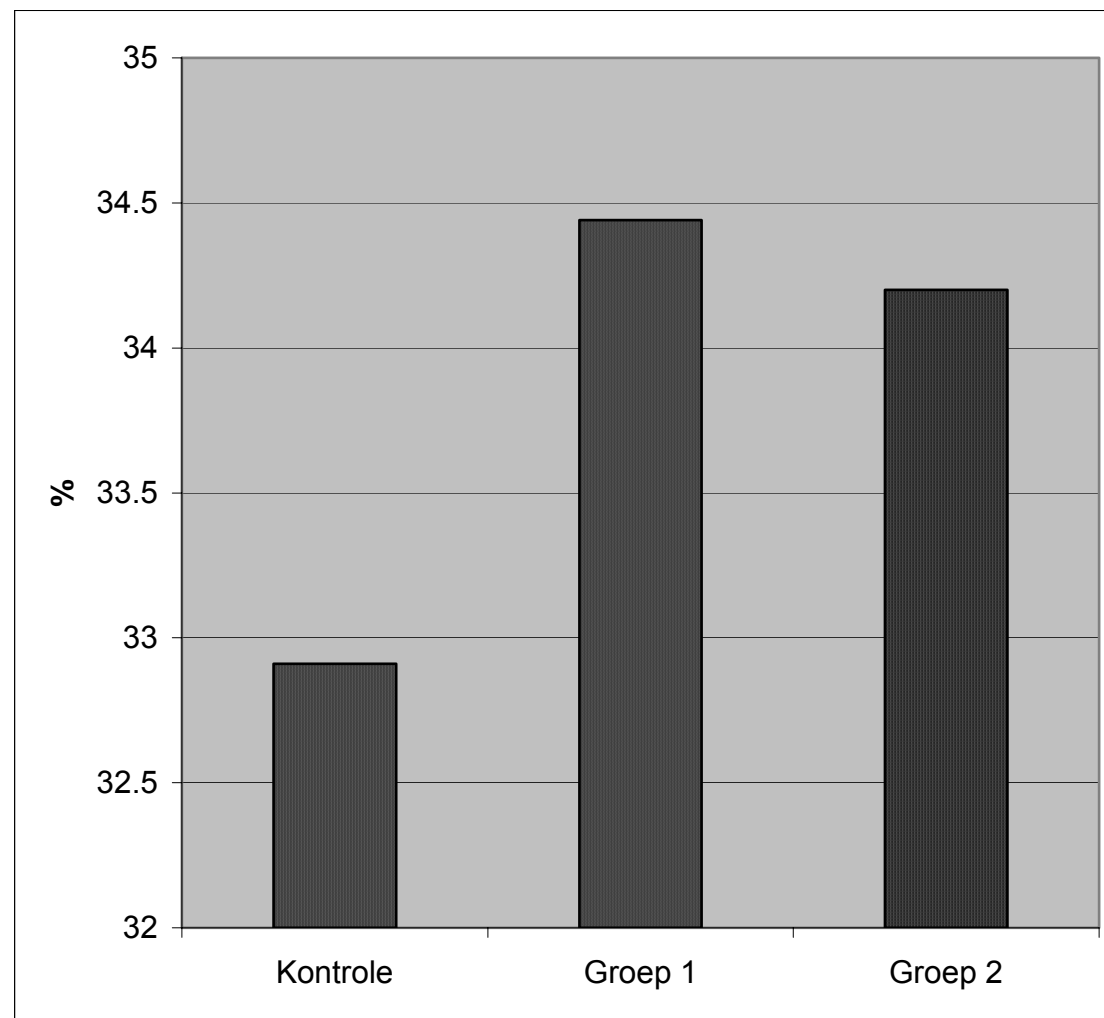
Figuur 3.9 Die gemiddelde kopervlakke in die lewers van die lammers (mg/kgDM)

3.7 Hematokrit waardes

Die hematokritwaardes van die onderskeie proefdiere is op dag 36 van die proef bepaal en word in Tabel 3.10 en die grafiese voorstelling in Figuur 3.10 weergegee.

Tabel 3.10 Gemiddelde hematokritwaardes

%	
Kontrole	32.91
Groep 1	34.44
Groep 2	34.2



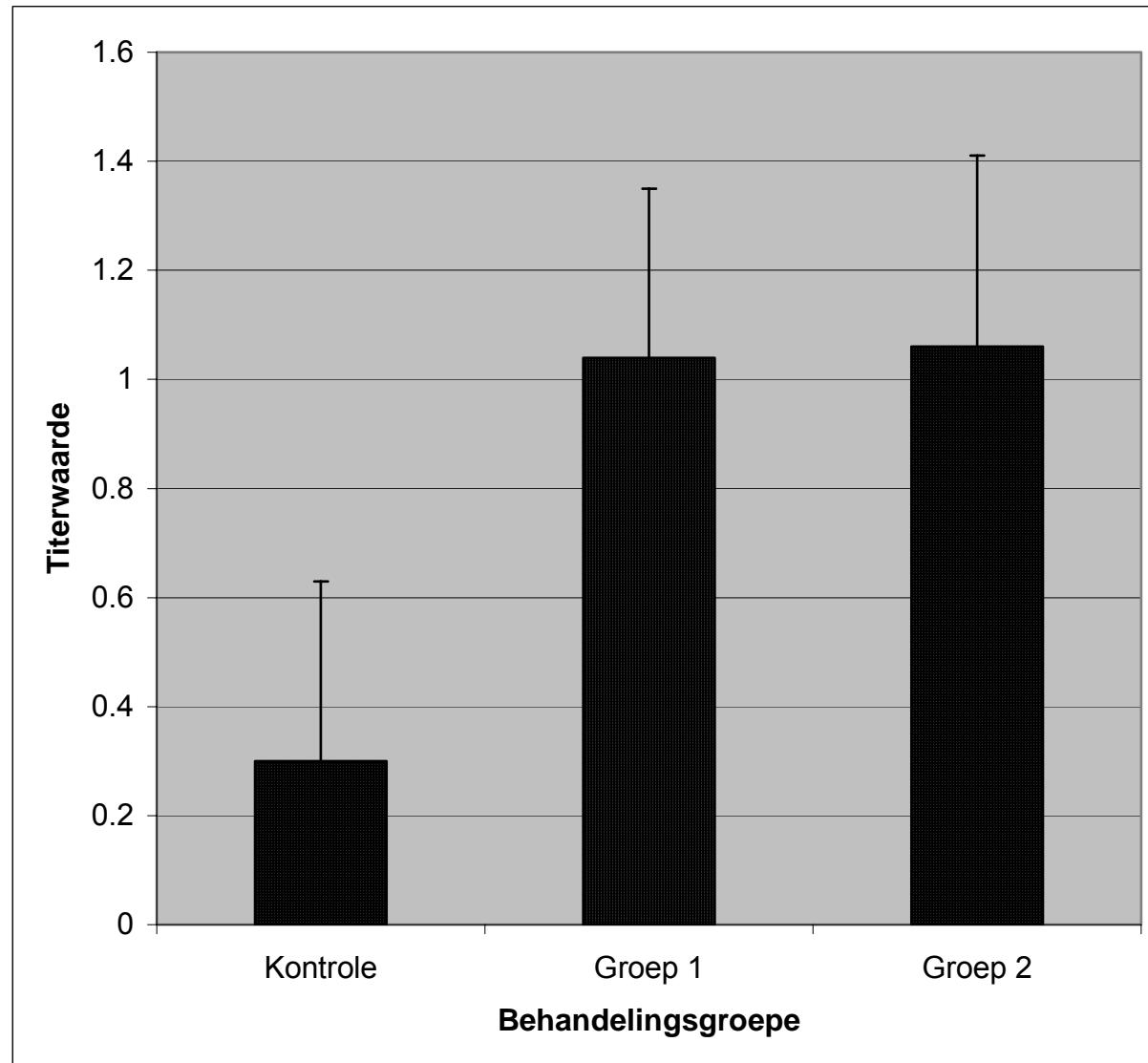
Figuur 3.10 Gemiddelde hematokritwaardes met bloedmonsters geneem op dag 36

3.8 Antiligaam produksie

Tabel 3.11 Die gemiddelde primêre antiligaamproduksie teen bees eritosiete twee weke na uitdaging (uitgedruk as 'n verdunningsfaktor)

Kontrole	Groep 1	Groep 2
0.30 ± 0.33	1.04 ± 0.31	1.06 ± 0.35

Die verskille tussen groepe is nie statisties betekenisvol nie ($P > 0.05$)



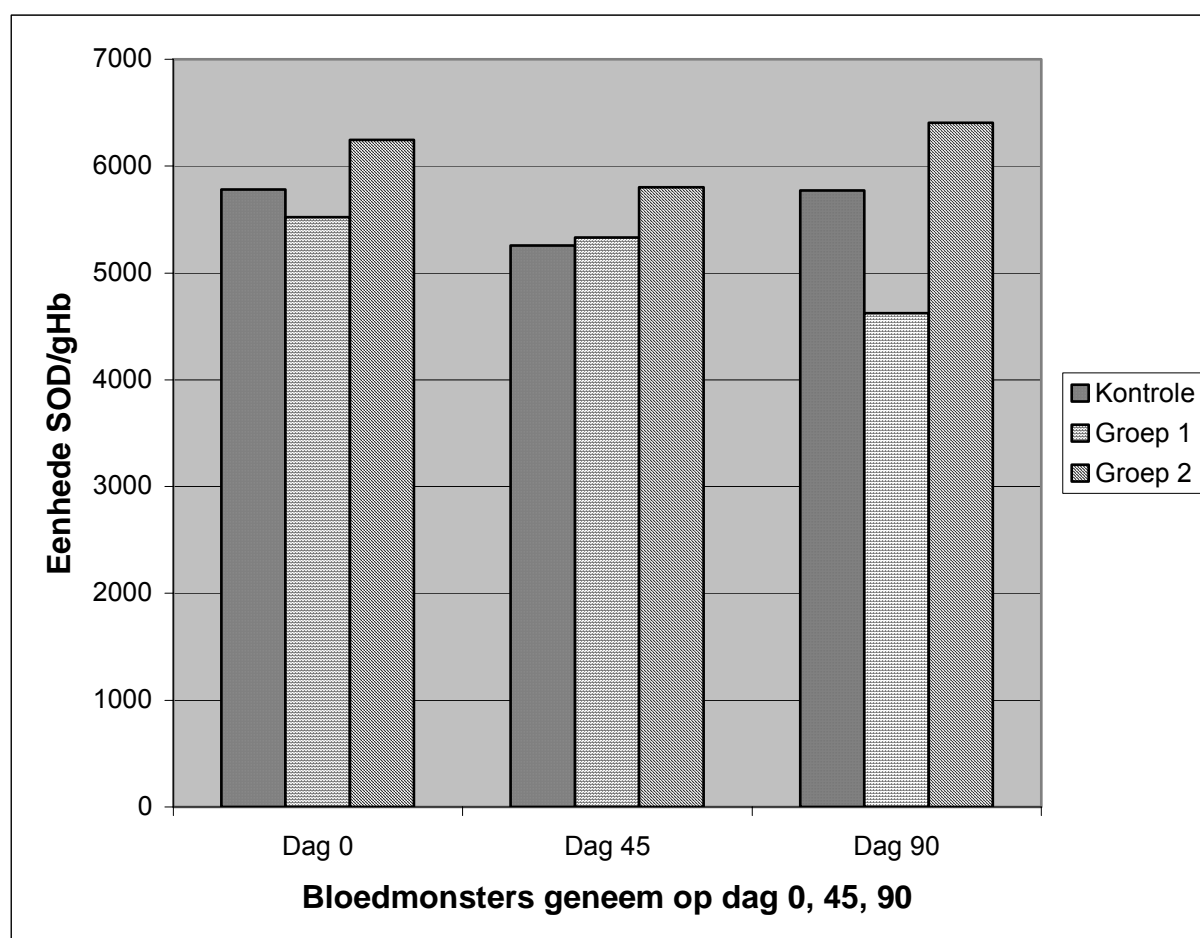
Figuur 3.11 Die primêre antiligaamproduksie teen bees eritosiete. Die balkies toon die standaard fout aan

3.9 Superoksied dismutase

Tabel 3.12 Die gemiddelde superoksied dismutase in eritosiete uitgedruk as eenhede SOD/gHb

	Dag 0	Dag 45	Dag 90
Kontrole	5750 ± 537.8	6683 ± 971.5	5770 ± 620.6
Groep 1	5520 ± 486.5	5332 ± 921.7	4625 ± 529.3
Groep 2	6245 ± 486.5	6355 ± 921.7	6405 ± 716.6

Die verkillie is nie statisties betekenisvol nie, P > 0.05



Figuur 3.12 Superoksied dismutase produksie (SOD/gHb) in eritosiete van bloedmonsters geneem op dag 0, 45 en 90

3.10 Kreatiefosfokinase en aspartaat transaminase

Tabel 3.13 Die gemiddelde kreatiefosfokinase in serum aan die einde van die proefperiode

Eenheid	Kontrole	Groep 1	Groep 2
μ/L	87 ± 11.1 ^a	40 ± 11.7 ^b	35 ± 11.1 ^b

Verskille tussen:
a – b is hoogs betekenisvol (P < 0.01)

Tabel 3.14 Die gemiddelde aspartaattransaminase in serum aan die einde van die proefperiode

Eenheid	Kontrole	Groep 1	Groep 2
μ/L	96 ± 13.8 ^a	48 ± 14.5 ^b	45.1 ± 13.8 ^b

Verskille tussen:
a – b is betekenisvol (P < 0.05)

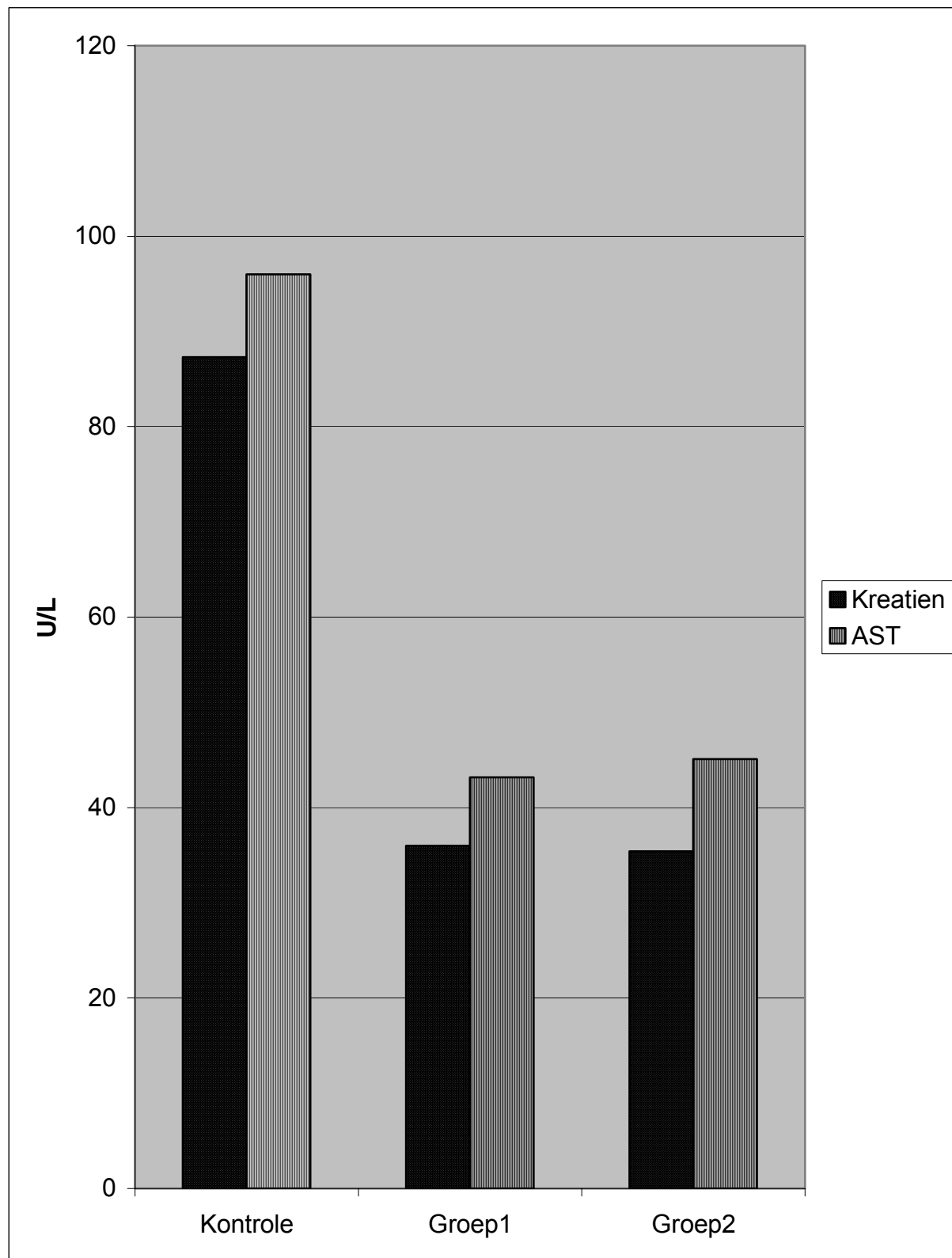
3.11 Lewermassa

Die lewermassa van die verskillende groepe, uitgedruk as 'n persentasie van die karkasmassa word in Tabel 3.15 opgesom.

Tabel 3.15 Die gemiddelde vars lewermassa met slag, uitgedruk as 'n persentasie van die karkasmassa

	%
Kontrole	3.4
Groep 1	3.1
Groep 2	3.4

Die verskille is nie betekenisvol nie



Figuur 3.13 'n Gekombineerde grafiek van kreatienfosfokinase- en aspartaattransaminase aktiwiteit in die serum (bloedmonsters geneem op dag 90)

HOOFSTUK 4

BESPREKING

In hierdie studie is gepoog om vas te stel of die mikro-elemente, sink, selenium en koper 'n positiewe invloed op sekere fisiologiese aspekte van ooilammers sal hê wat op 'n subonderhoudsrantsoen geplaas is. Ons wou dus vasstel of dit wel die moeite werd sou wees om hierdie elemente te supplementeer tydens droogtetoestande of gedurende strawwe winters.

Die proefdiere het hooi ontvang van gemiddelde kwaliteit (ru-proteïen 108.3 g/kg DM). 'n Gemiddeld van beskikbare waardes is deur Kears (1982) verkry om die DMI (droë materiaal inname) van jong skape en nie lakterende ooie in ontwikkelende lande te verkry. Die diere is verskillende diëte met of sonder suplementasie van energie en proteïen bronne gevoer. Die waardes wissel van 22-98 g DM/d/W_{kg}^{0.75}. Die DMI hang dus af van die dieet wat aangebied word asook die fisiese vorm daarvan. Die gemiddeld van 32 waardes is geneem en bereken op 54.7 g DM/W_{kg}^{0.75} (Kears, 1982).

Die ooilammers in die kontrole groep van hierdie proef het 'n DMI van 54.66 g/W_{kg}^{0.75} gehad met 'n gevolglike 83.44 g RP inname per dier per dag. Groep 1 het 53.21g DM/W_{kg}^{0.75} met 82.05 g RP/dier/dag en groep 2 het 54.76 g DM/W_{kg}^{0.75} met 85.01 g RP inname/dier/dag gehad. Die gemiddelde DMI van die drie groepe was 54.21 g DM/W_{kg}^{0.75} wat goed vergelyk met die gemiddelde waarde deur Kears (1982) uitgewerk. Hiervan kan afgelei word dat die lammers wel genoeg proteïen ingeneem het. Die vraag ontstaan nou waarom die lammers so 'n uiters swak massatoename getoon het, terwyl die innames eintlik heeltemal volgens die aanbevole waardes geskied het. Die antwoord kan moontlik lê in die feit dat die innames van die diere nie korrek gemeet is nie omdat die vermorste voer slegs een maal per week gekollekteer is. Daar kon dus groter voervermorsing plaasgevind het as wat aanvanklik opgelet is. Die swak massatoename dui duidelik op 'n lae energievoedingstatus.

Wanneer die massas van die proefdiere met meer aandag beskou word, kan waargeneem word dat daar op die oog af 'n verskil in die begin- en eindmassas tussen die drie behandelingsgroepe kan wees. Die kontrolegroep, wat slegs hooi ontvang het, het inderdaad 'n gewigsverlies van 70 g getoon. Groep een, wat 1.6 mg selenium/dier/dag, 48.1 mg sink/dier/dag en 5 mg koper/dier/dag ontvang het, het met 230 g gemiddeld per dier oor die proeftydperk in massa toegeneem. Groep twee wat 3.2 mg selenium/dier/dag, 96.2 mg sink/dier/dag en 10 mg koper/dier/dag ontvang het, het 750 g gemiddeld per dier oor die proeftydperk in massa toegeneem. (Die oorspronklike idee was dat groep 1 slegs 0.2 mg selenium/dag en 30mg sink/dag, groep 2 0.4 mg selenium en 60 mg sink/dag gesupplementeer moes word. Ongelukkig het daar fout by die berekening ingesluit wat eers heelwat later opgemerk is.) Wanneer die verskille tussen die begin- en eindmassas egter statisties ontleed word, is die verskille nie betekenisvol nie ($P > 0.05$) (Tabel 3.4). Dit is egter interessant om te vermeld dat ander outeurs (wat hieronder bespreek word) wat soortgelyke suplementasie proewe onderneem het, dieselfde resultate met massatoename verkry het as in hierdie proef alhoewel daardie resultate ook nie betekenisvol van mekaar verskil het nie. Oh *et al.* (1976) het 'n agt week eksperiment met 16 pasgebore lammers uitgevoer. Die lammers is 'n "Torule"-gis gebaseerde vloeibare dieet gevoer met 'n lae (< 0.01 mg/kg) selenium inhoud. Die lammers is dan gesupplementeer met 0, 0.05, 0.10 en 0.50 mg/kg natriumseleniet. Die massa toename van die kontrole groep was laer as enige van die gesupplementeerde groepe ($P < 0.05$) alhoewel nie betekenisvol nie, terwyl die massa toename van die groep wat met 0.1 mg/kg gesupplementeer is, die hoogste was. Zachara *et al.* (1993) het ook 'n soortgelyke proef onderneem en het die metabolisme van selenium in die weefsels bestudeer van lammers wat selenium suplementasie teen verskeie vlakke ontvang het (0.25, 0.41 en 0.58 mg Se/kg). Die kontrole groep is slegs die basale dieet gevoer met geen selenium suplementasie nie. Die kontrole groep het 'n gemiddelde daaglikse toename van 98 g/kop getoon, terwyl die gesupplementeerde groepe 'n gemiddelde massatoename van tussen 103 en 130 g/kop/dag getoon het ($P > 0.05$).

Die slagproef bewys dat die diere se sink-, koper- en seleniumreserwes tot lae vlakke gedaal het nadat die proefdiere vir drie maande op 'n lae kwaliteit hooi geplaas is (Tabel 3.1). Die voerontleding toon ook aan dat die eksperimentele hooi wel 'n goeie ruproteïen inhoud gehad het, maar dat koper-, sink- en seleniumvlakke in die hooi laag was (Tabel 3.2). Die minimum vereistes van selenium word deur Underwood & Suttle (1999) vasgestel op 0.03 – 0.05 mg/kg DM. Die kontrolegroep het slegs 0.0073 mg Se/kg DM ingeneem en het dus wel aan 'n marginale seleniumtekort gelei. Die minimum vereistes van sink vir die skape word deur Underwood & Suttle (1999) vasgestel tussen 9.7 – 16.2 mg/kg DM. Die kontrolegroep (slegs hooi en geen supplement) het 33 mg Zn/kg DM ingeneem. Die kontrolegroep het dus voldoende sink deur die hooi ontvang. Die minimum vereistes van koper vir die skape is ook deur Underwood & Suttle (1999) bepaal op 8.6 mg/kg DM. Die kontrolegroep (slegs hooi en geen supplement) het 10.8 mg Cu/kg DM ingeneem wat wel voldoen het aan hul daaglikse behoeftes. Groep 1 en groep 2 het hierdie elemente deur suplementasie ontvang en het dus nie aan sink-, koper- of seleniumtekorte gely nie.

Seleniumvlakke in die volbloed, plasma en weefsels is bepaal en as 'n maatstaf gebruik. Die selenium in die volbloed het duidelik stadiger gestyg as die seleniumvlakke in die plasma. Die seleniumvlakke in die volbloed (van die proef onder bespreking) bereik 'n hoogtepunt op dag 60 waarna dit afplat, terwyl die seleniumvlakke in die plasma alreeds op dag agt 'n hoogtepunt bereik en daarna afplat. Daar is 'n duidelike verskil in seleniumvlakke tussen die drie behandelingsgroepe wat statisties betekenisvol is. Op dag 60 is die seleniuminhoud in die volbloed van die kontrolegroep 33 ng/g, groep 1 is 347 ng/g en groep 2 is 429 ng/g. Die statistiese ontleding toon dat die verskille hoogs betekenisvol is ($P < 0.01$). Op dag agt is die seleniumvlakke in die plasma van die kontrolegroep 13 ng/g, groep 1 is 165 ng/g en groep 2 is 225 ng/g. Die statistiese ontleding toon dat die verskille ook hoogs betekenisvol is ($P < 0.01$).

Volbloed selenium korreleer goed met seleniuminname want dit meet beide die serum selenium en selenium in glutatioon peroksidase in die roibloedselle. Die volbloed

selenium reageer egter baie stadiger as die serum (of plasma) selenium met verandering in seleniuminname oor tyd. Die rede hiervoor is dat die oorgrote meerderheid van die GSH-Px in die volbloed geïnkorporeer is in die rooibloedselle wanneer eritropoëse plaasvind. Die verhouding van volbloed selenium tot serum selenium is 1:4 in skape (Stowe *et al.*, 1992). Volbloed selenium het ook 'n 10-50% hoër selenium konsentrasie as gevolg van die groter konsentrasie van eritrosiete in die volbloed (Ullrey, 1987).

Die gemiddelde leeftyd van skaap eritrosiete is al op verskeie metodes bepaal wat *in vitro* Cr⁵¹ merkers, ferrokinetiese studies en die omskakelingstempo van C¹⁴ wat *in vivo* by heem geïnkorporeer is nadat glisien 2-C¹⁴ toegedien is. Die resultate wissel van af 37 dae tot 157 dae (Wright, 1965).

'n Volledige reaksie in volbloed selenium tot 'n seleniumplesiment sal dus dieselfde tyd benodig wat gelyk is aan die lewensduurte van 'n rooibloedsel. Volgens Knowles *et al.* (1999) is die seleniumkonsentrasie in die bloed van koeie soms nou gekorreleer met die GSH-Px aktiwiteit en met ander tye weer minder. Die GSH-Px aktiwiteit is sensitief vir die vorm en duurte van die selenium supplementasie. Metings van GSH-Px as 'n diagnostiese kriteria van die seleniumstatus van die dier kan dalk slegs gepas wees in die geval waar koeie nie seleniumplesimentasie ontvang het nie, of in gevalle waar die selenium konsentrasies in die bloed 'n stabiele vlak bereik het.

Knowles *et al.* (1999) het in 'n studie met melkkoeie gevind dat die langtermyn supplementasie van beide die organiese en anorganiese vorm van selenium tot 'n stelselmatige verhoging in seleniumkonsentrasies in die bloed gelei het en steeds nie 'n plato bereik het na 133 dae van behandeling nie. 'n Analise van die eksponensiële kurwe van die proef het getoon dat die seleniumkonsentrasie nie 'n plato sou bereik voor 275 ± 40 dae nie (Knowles *et al.*, 1999).

By die mens word serum vlakke gewoonlik gebruik as 'n indikator van die seleniuminname. Die metode is slegs bruikbaar as die daaglikse innames laer as 100

$\mu\text{g}/\text{dag}$ is. Wanneer die innames meer as $100 \mu\text{g}/\text{dag}$ styg blyk dit dat die volbloed selenium vlakke meer liniêr verwant is aan die hoeveelheid selenium wat ingeneem is. Teen dosisse van meer as $600 \mu\text{g}/\text{dag}$ oor agt maande het die serum selenium 'n plato by $500 \mu\text{g}/\text{L}$ bereik terwyl die volbloed selenium gestyg het tot by vlakke van $680 \mu\text{g}/\text{L}$ (Beilstein & Whanger, 1983).

Oor die algemeen sal serum en plasma seleniumkonsentrasies huidige suplementasie vlakke meer akkuraat reflekteer en is meer sensitief vir korttermyn veranderinge in selenium suplementasie. Volbloed selenium konsentrasies verteenwoordig vorige selenium suplementasies weer meer akkuraat omdat die selenium (in glutatioon peroksidase) in die rooibloedselle geïnkorporeer word. Volbloed seleniumvlakke sal daarom stadiger verhoog tydens suplementasie en daarom ook stadiger afneem indien die suplementasie gestaak word as serum of plasma selenium (Gerlof, 1992).

'n Vroeëre studie waar natriumseleniet tot die basiese dieet van melkbeeste teen drie konsentrasies gesupplementeer is uitgevoer. Selenium is teen 0.1, 0.2 en 0.5 mg/kg DM bygevoeg. Die totale selenium konsentrasies in die dieet het gewissel van 0.3 tot 0.77 mg/kg tussen die kontrole en gesupplementeerde groepe. Die totale selenium inname van 2 tot 6 mg/dier/dag het tot 'n liniêre verhoging in plasma seleniumvlakke van ongeveer 80 tot 120 ng/mL gelei. Verdere innames van 6 tot 14 mg/dier/dag het geen verdere verhogings in plasma seleniumvlakke tot gevolg gehad nie, wat aantoon dat 6 mg van die totale inname, die plasma seleniumvlakke geoptimaliseer het (Gerlof, 1992).

Die akkumulاسie van selenium in die hartspier, lewer, nierkorteks en *L. dorsi* spier kan duidelik waargeneem word, met die grootste akkumulاسie in die lewer. Die kontrolegroep het 'n seleniuminname van slegs 0.0073 mg/kgDM gehad, nogtans was daar 'n hoë akkumulاسie van selenium in die niere wat met 'n faktor van 21 van die konsentrasie in die lewer verskil. Hierdie waardes word met ander navorsers se resultate in Tabel 4.1 vergelyk.

Tabel 4.1 'n Vergelyking van die akkumulاسie van selenium in die nierkorteks en lewer van verskeie outeurs

Proef	Seleniumvlakke in nierkorteks ng/g DM	Seleniumvlakke in lewer ng/g DM	Selenium inname/dier (mg)	Faktor
A	3521	165	0.0073	21
B	163	1783	0.034 mg/kgDM ^e	10.94
C	6795	975.5	0.38	6.97
D	7290	1280	0.318	5.69

A: Resultate van proef onder bespreking

B: Van Ryssen *et al.* (1999)

C: Janse van Rensburg (2000)

D: Hartman & Van Ryssen (1997)

e: Innames op weidings

Meer as 99 % van selenium in die niere word in die nierkorteks gevind met slegs 'n klein fraksie wat in die medulla voorkom (Aspilla, 1991). Selenium in die niere word vinnig in proteïene geïnkorporeer (Aspilla, 1991). Daar is ten minste vier verskillende selenoproteïene in die niere. Benewens glutatioon peroksidase en selenoproteïen-P1, is daar nog twee kleiner selenoproteïene in die niere. Hierdie twee kleiner selenoproteïene kan wel 'n spesifieke funksie hê, aangesien die selenoproteïene nie in die lewer of testis voorkom nie. Dit is duidelik dat daar 'n ander spesifieke funksie vir selenium in die niere moet wees, omdat daar 'n groter akkumulاسie van selenium in die niere is in diere wat aan 'n seleniumtekort ly (Mostenbocker & Tappel, 1982). Die verskynsel kan duidelik in die resultate van die kontrolegroep waargeneem word wat sonder twyfel wel aan 'n seleniumtekort gely het. Daar kan duidelik waargeneem word dat die kontrole groep 'n groter akkumulاسie van selenium in die niere as in die ander weefsel getoon het. Die seleniumvlakke in die niere van die kontrole groep is 3521 ng/g DM, in die lewer 165 ng/g DM, in die hartspier 113 ng/gDM en in die *Longissimus dorsi* spier slegs 43 ng/g DM.

Die verskille in seleniumvlakke in die lewer tussen die drie behandelingsgroepe was ook hoogs betekenisvol ($P < 0.01$) Die groot reaksie in toename van seleniumvlakke in die lewer staaf ook die bevindings van Van Ryssen *et al.* (1998) dat die lewer die grootste reaksie op 'n verhoging in seleniuminname getoon het van al die weefsels wat

ondersoek is (volbloed, plasma, hart, niere en skeletspier), en beweer daarom dat die veranderinge in die biobeskikbaarheid van selenium die beste in die lewers van diere gereflekteer sal word.

Die verskille in seleniumvlakke in die hartspier tussen die drie behandelingsgroepe was ook hoogs betekenisvol ($P < 0.01$). Die bevinding toon ook aan dat die hartspier naas die lewer en niere 'n beter aanduiding van seleniumstatus van die dier is as die *Longissimus dorsi* spier wat die laagste vlakke van selenium tussen die weefselgroepe aangetoon het.

Die verskil in vlakke van selenium in die *Longissimus dorsi* spier tussen die kontrole groep en groep een (0.2 mg selenium/dier/dag) was wel betekenisvol ($P < 0.05$), terwyl die verskil tussen die kontrole groep en groep twee (0.4 mg selenium/dier/dag) hoogs betekenisvol was ($P < 0.01$). Jansen van Rensburg (2000) het aangetoon dat die akkumulering van selenium in die *Longissimus dorsi* spier afhanklik is van die bron van selenium naamlik organiese teenoor anorganiese selenium, en toon aan dat organiese selenium 'n groter akkumulering in die spier tot gevolg het as die anorganiese vorm. Alhoewel die resultate van die proef van Jansen van Rensburg nie betekenisvolle verskille tussen die kontrolegroep en die groepe wat anorganiese selenium ontvang het nie, toon die resultate van dié proef onder bespreking wel betekenisvolle verskille aan.

Die resultate van die seleniumvlakke in die plasma, volbloed en weefsels toon dus duidelik dat die seleniumplesentasie suksesvol was.

Die kopervlakke in die lewer is ontleed en geen betekenisvolle verskille tussen die kontrole groep en groep een en tussen groep een en groep twee is aangetoon nie ($P > 0.05$). Daar was wel 'n betekenisvolle verskil tussen die kontrole groep (geen koper supplementasie) en groep twee wat 10 mg koper/dier/dag ontvang het ($P < 0.05$).

Die resultate van verskeie outeurs toon aan dat skape 'n ander koper metabolisme patroon volg as ander spesies. Die konsentrasie koper in die lewer is hoër as die meeste ander spesies en sal tot toksiese vlakke verhoog met slegs matige verhogings van koper in die dieet, wat min of geen effek op ander spesies sal hê nie. Daar is ook

baie min verskil in kopervlakke in lewer tussen pasgebore lammers en volwasse skape (Beck, 1962). Die skaap met 'n normale dieet het 'n lewer kopervlak van 100-400 mg/kg DM. Die vlakke sal relatief styg tot klein verhogings in koper in die dieet. Indien die lewerkoper verhoog word deur dit of oraal of deur binnespiersse toediening toe te dien, word die oortollige koper baie stadig vanaf die lewer vrygestel (Beck, 1962)

Die verandering van sink konsentrasies in die weefsels (met die uitsondering van been pankreas en plasma) wat net voor die aanvang van vertraagde groei, apytsverliese en ander indikatore van sinktekort plaasvind is so klein dat dit nie werklik as 'n diagnostiese kriteria gebruik kan word nie. Alhoewel 'n redelike verlaging in die sinkinhoud van hare uiteindelik voorkom, is die aanvangstadium van die verandering baie stadig. Die ontleding van sinkvlakke in hare is eintlik slegs geskik wanneer chroniese sinktekort vermoed word (Mills, 1978). Navorsing met rotte het getoon dat selfs in diere met 'n sinktekort die sinkinhoud van die plasma na een dag van lae voedsel inname sal styg. Van hierdie werk is daar aanvaar dat die sink inhoud van plasma in herkouers ook relatief labiel is, maar die mate en snelheid van hierdie veranderinge is wel onderskat. Daar was byvoorbeeld gevalle waar navorsers die werkklas op 'n Sondag wou verminder deur die diere op die Saterdag 'n dubbele dosis van die sinkaanvulling toe te dien. Die gevolg hiervan was dat daar 'n merkbare verlaging van sink konsentrasies in die plasma na 48 uur was. Hierdie respons wat selfs waarneembaar was in diere wat voldoende sink aanvulling ontvang het, was die eerste van baie indikasies dat anders as ander essensiële spoorelemente, sink inhoud in plasma nie so vinnig 'n ewilibrum bereik met die hoeveelhede van die element wat op ander plekke in die liggaam gestoor word nie (Mills, 1978).

Die hematokritwaardes (*Packed cell volume*, PCV) is ook op dag 50 van die proef geneem om te bepaal of dit ook gebruik kan word as 'n maatstaf of die diere aan 'n koper- of ystertekort ly. Volgens die NRC (1985) is bloedarmoede ook 'n teken dat skape aan 'n kopertekort kan ly. Die kontrolegroep se hematokrit waarde was 32.91% met groep 1 op 34.4% en groep 2 op 34.2%. Volgens Puls (1994) kan die normale hematokrit van skape egter varieer van 23 – 48%. Echevarria *et al.* (1988) verwys na

proefnemings waar geen effek van seleniumsupplementasie op hemoglobien of hematokrit waargeneem is by varke wat tot 20 mg/kg natriumseleniet vir vyf weke gesupplementeer is nie. Daar was egter 'n verlaging in PCV by rotte wat selenium as natriumseleniet tot 8 mg/kg vir vier weke en varke wat 8.4 mg/kg selenium as natriumseleniet vir 17 weke gesupplementeer is. Ook is daar verwysings na verlaagde PCV by kalwers wat 10 mg/kg selenium as natriumseleniet gesupplementeer is, maar nie by die wat tot 5 mg/kg gesupplementeer is nie.

Die gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen bees eritrosiete twee weke na uitdaging het geen betekenisvolle verskille opgelewer nie ($P > 0.05$). Dit kan moontlik te wyte wees aan die feit dat dit ongeveer 10 dae neem na die toediening van 'n antigeen, wat die dier nog nooit vantevore ontvang het nie, vir die antigeenliggaam respons om die maksimum vlak te bereik. Die antiliggam respons wat as 'n titer gemeet word, bereik nie hoë vlakke nie en duur slegs vir twee tot drie weke. Die eerste respons tot die antigeen is die primêre immuun respons. Indien dieselfde antigeen vir 'n tweede maal toegedien word, sal die sekondêre immuun respons baie vinniger wees – wat 'n hoër teenliggaam titer gee en vir maande sal aanhou (Nockels, 1996). Die kort bespreking vooraf kan dus moontlik daarop dui dat indien die bees eritrosiete vir 'n tweede maal toegedien sou wees, die sekondêre antiliggamproduksie dalk betekenisvol tussen die drie behandelingsgroepe kon verskil het. Die vlakke van toediening van selenium kon moontlik ook 'n invloed hê op die produksie van die antiliggame. Jansen van Rensburg (2000) het wel betekenisvolle verskille tydens die primêre immuunrespons in behandelingsgroepe gekry waar die supplementering van 1.5 mg natriumseleniet/dag die immuunsisteem meer bevorder het as 'n supplementering van 0.75 mg natriumseleniet. Seleniumsupplementasie kan 'n dier se prestasie indirek verbeter, moontlik deur die versterking van die "immunocompetence" van die dier, en sodoende is die dier in staat om strestoestande te weerstaan. 'n Voorstel word gemaak dat die seleniumkonstrasie in die bloed ten minste 100 µg/L moet wees vir optimale teenliggaamproduksie (Nicholson *et al.*, 1991)

Die kreatiefosfokinase (CK) en aspartaat transaminase (AST) aktiwiteit in die serum is bepaal om vas te stel of weefsel degenerasie plaasgevind het en tot watter mate, indien wel, die suplementasie van die mikro-elemente die degenerasie kon beperk. Die CK en AST aktiwiteit sal ook aantoon of die diere aan 'n selenium tekort gelei het al dan nie. Puls (1994) toon aan dat die normale vlakke van kreatiefosfokinase in die serum in skape tussen agt tot 13 IU/L is. El-Newehy *et al.* (2000), toon aan dat die vlakke van CK aktiwiteit > 300 IU/L en die AST aktiwiteit > 150 IU/L vir 'n aanduiding van witspiersiekte. In die proefneming was die kontrolegroep se CK aktiwiteit gemiddeld 87 IU/L, groep 1 was 40 IU/L en groep 2 was 35 IU/L. Die verskille tussen die kontrole groep en die twee behandelingsgroepe was hoogs betekenisvol ($P < 0.001$). Aangesien dit onmoontlik is dat die gesupplementeerde groepe aan 'n seleniumtekort gelei het kan die resultate die gevolg wees dat die vlakke van poli-onversadigde vetsure (PUFAs) in die dieet te laag was (Van Metre & Callan, 2001).

Die vlakke is egter nog steeds baie laer as die gespesifiseerde vlakke wat hierbo aangetoon is wat sal dui op witspiersiekte. In die proef onder bespreking was die AST aktiwiteit van die kontrole groep 96 IU/L, groep 1 was 48 IU/L en groep 2 was 45.1 IU/L. Die verskille tussen die kontrole groep en groep 1 en 2 was hoogs betekenisvol ($P < 0.01$). Dieselfde resultate is deur ander outeurs wat soortgelyke suplementasie proewe gedoen het verkry (El-Newehy *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 1976)

Algemene bespreking

'n Verdere maatstaf wat geneem kan word om die hipotese van die proef te ondersteun is om die vitamien A en E status van die diere deur die loop van die proef te bepaal. In hierdie proef was die vitamienstatus van die diere heel waarskynlik laag aangesien daar van slegs 'n gemiddelde kwaliteit hooi gebruik gemaak is. Die totale antioksidant status kan ook help om die invloed van die mikro-elemente op die dierlike liggaam te onderstreep. Die diere kan ook twee maal in plaas van een maal met die beesrooibloedselle uitgedaag word om 'n beter reaksie van antiliggaamproduksie te verseker, en sodoende 'n beter beeld van die invloed van die suplementasie van sink, selenium en koper op die dier se immuunstelsel te verkry. Dit sal ook interessant wees

om die seleniumvlakke van die serum met die vlakke in die plasma en die volbloed te vergelyk. Verder kan die konsentrasie van die immunoglobulene (Ig) in die serum die aktiwiteit van die tiroïed hormone insig gee in die invloed wat die mikro-elemente en die suplementasie daarvan op die immuunstelsel van die dier het.

Die resultate van hierdie proef toon aan dat elke boer wat vandag 'n wetenskaplike benadering by sy boerdery volg dit nie kan wegredeneer dat spoor-elemente tydens die winter en gedurende droogtetoestande aangevul behoort te word nie. Dit kan selfs aantoon dat hierdie elemente as 'n reël teen die aanbevole vlakke regdeur die jaar gesupplementeer behoort te word. Nie net was die kreatienfosfokinase en aspartaat transaminase aktiwiteit van die gesupplementeerde groepe laer (met hoogsbetekenisvolle verskille) as die kontrole groep nie, maar daar was ook 'n suggestie van beter massatoename wanneer na die massaverskille tussen die drie behandelingsgroepe gekyk word. Die aanduidings van verhoogde immuniteit van die gesupplementeerde groepe dui ook aan dat hierdie elemente 'n plek het in die praktiese voeding van vee gedurende droogtetoestande en tydens winters of nie-reën seisoene. 'n Veeboer moet die raad van 'n gekwalifiseerde voedingkundige inwin om te bepaal van watter elemente daar 'n moontlike tekort kan wees op sy spesifieke plaas, want die respons op byvoeding sal afhang van waaraan die diere 'n tekort het. In die geval van hierdie proef het die basiese dieet naamlik die hooi wel 'n tekort aan koper, sink en selenium gehad, daarom was die respons op die suplementasie positief. Indien die boer nie die hulp van 'n voedingkundige kan inwin nie, kan die "shotgun" metode van suplementasie ook gevolg word, met selfs die insluiting van vitamien E. Die sogenaamde "shotgun" metode is ontwerp om 'n wye reeks van omgewings en voedings sisteme te dek en bevat 'n veiligheidsfaktor as versekering teen tekorte. Die "shotgun" metode moet egter met omsigtigheid benader word aangesien sulke mengsels soms as ekonomiese verliese beskou word en dit kan ook skadelik wees vir die dier (McDowell & Conrad, 1986). Die bykomende koste van die suplementasie mengsel moet egter afgespeel word teen die hoë waarskynlikheid van beter oorlewing van die vee wat die volledige vrye keuse minerale mengsel ontvang. Sink, mangaan, koper en kobalt is bekend om tekorte te toon in weidings wat in sekere

areas van Suid-Afrika voorkom (McDowell & Conrad, 1986). Dit is daarom voordelig om in 100% van die behoeftes van die diere te voorsien. Ander minerale kan dan ingesluit word indien daar bewyse is dat tekorte in die spesifieke areas voorkom. Die meeste van die spoor-elemente insluitende sink, mangaan, yster en selfs kobalt en jodium word as relatief veilige elemente beskou selfs teen hoër vlakke van inname (McDowell & Conrad, 1986). Enige werklike gevaar van toksisiteit as gevolg van 'n oorinnome kan wees in die geval van koper in skaaprantsoene. 'n Ernstige tekortkoming van so 'n vrye keuse sisteem, waarvan die "shotgun" metode deel uitmaak is dat baie diere vir onbekende redes omtrent nooit van die minerale inneem nie en dit kan tot grensgeval tekorte lei. Ander diere neem weer te veel van die minerale in, maar in die meeste gevalle sal dit nie die prestasie beïnvloed nie, nogtans is dit duur (McDowell & Conrad, 1986).

Die vraag ontstaan wat die vertraagde effek van swak voeding ses maande later op die diere sal hê. Wanneer mens alleen na vrugbaarheid kyk, wat een van die belangrikste produksie komponente van 'n veeproduksiestelsel is, kan dit 'n groot inpak op die ekonomiese aspekte van so 'n veeboerdery tot gevolg hê. Al drie die spoor-elemente wat in die proef ondersoek is en waaraan die kontrolegroep 'n tekort gehad het, speel 'n belangrike rol by reproduksie van diere. 'n Kopertekort kan lei tot onvrugbaarheid. Sink het weer 'n groot rol by die manlike reproduksie stelsel en kan lei tot verswakte testis ontwikkeling, en defektiewe spermatogenese. By die vroulike dier sal 'n sinktekort alle fases van die reproduksieproses, vanaf estrus tot parturisie en laktasie negatief beïnvloed. Seleniumtekorte kan lei tot vroeë embrioniese afsterwe, en kan ook lei tot onvrugbaarheid (NRC, 1985).

- **Hoër seleniumvlakke in die lewers teenoor die niere**

Die lewers van die gesupplementeerde proefdiere toon baie hoër seleniumvlakke as in die niere. Dit is heeltemal ongewoon aangesien ander outeurs wat ongeveer dieselfde supplementasievlakke gebruik het as 'n reël hoër selenium vlakke in die niere as in die lewers gekry het. Eerstens, as gekyk word na die kontrole groep is die seleniumvlakke in die niere 3521 ng/g en in die lewer 165 ng/g. Die hoër seleniumvlakke hier in die

niere is alreeds bespreek en kan moontlik die gevolg wees van 'n selenium tekort by die kontrole groep. In die twee gesupplementeerde groepe is die seleniumvlakke in die lewer tot vier maal hoër as in die niere. Ander navorsers het getoon dat wanneer selenium gesupplementeer word sal die selenium konsentrasie in die niere hoër wees as die konsentrasie in die lewer (Hartman *et al.*, 1996). Ullrey (1987) het 'n studie met rotte gedoen wat 'n kommersiële dieet gevolg het met 'n seleniuminhoud van 0.3 mg/kg. Hy het gevind dat die selenium konsentrasie (nat basis) in die weefsel van die rotte afgeneem het vanaf die niere na die lewer, testis, adrenale kliere, eritrosiete, milt, pankreas, plasma, longe, harte, timusklier, skeletspier en dan die brein. Scott & Thompson (1971) toon aan dat anorganiese selenium byvoeging tot lae selenium diëte by hoenders die seleniumneerlegging in bloed, spier, lewer, niere en vel verhoog. Verdere verhogings in anorganiese selenium van 0.8 mg/kg het gelei tot hoër seleniumvlakke in die lewer en niere. Knowles *et al.* (1999) beweer dat die seleniumkonsentrasie in die lewer op seleniuminname deur die dier reageer en kan as 'n aanduiding van die seleniumstatus van die dier gebruik word, en in 'n proef wat deur die outeurs onderneem is was die bloed en lewer konsentrasie verhouding op dag 133 betekenisvol ($P < 0.01$). Die verhouding was nie beïnvloed deur die vorm waarin selenium aangebied is nie.

Alhoewel rumenbakterië instaat is om beide Seleno-metionien en Seleno-sisteïen van anorganiese seleniumbronne te sintetiseer, kan die kondisies in die rumen SeO_3^{2-} na die selenium metaal reduceer. Dit is dan onbeskikbaar vir die rumen organismes en vir die dier (Knowles *et al.*, 1999). In monogastriese diere is die hoof seleniumbevattende proteïen in die lewer GSH-Px. Hierdie proteïen verhoog soos wat die aktiwiteit van die GSH-Px in die lewer verhoog en is tot 100 maal die hoeveelheid van ander selenoproteïene. Die proporsie mag minder wees in die geval van herkouters (Knowles *et al.*, 1999). Is dit dalk moontlik dat die proporsie kan verhoog indien die selenium die rumendegradasie ontsnap?

- **Die verandering van selenium konsentrasie met tyd na suplementasie in volbloed teenoor plasma**

Soos alreeds bespreek het die seleniumvlakke in die volbloed duidelik stadiger gestyg as die seleniumvlakke in die plasma. Die seleniumvlakke in die volbloed bereik eers 'n hoogtepunt op dag 60 waarna dit afplat, terwyl die seleniumvlakke in die plasma alreeds op dag agt 'n hoogtepunt bereik en daarna afplat.

Die konsentrasie van selenium in beide plasma/serum en volbloed kan gebruik word om die selenium status van diere te voorspel. Dit is egter soms noodsaaklik om die konsentrasie van die een om te skakel na die konsentrasie van die ander, en 'n faktor van twee word dikwels vir die omskakeling gebruik (beskou die grafieke in Figure 3.6 en 3.7 om te sien dat die konsentrasie in die volbloed ongeveer twee maal so hoog is as in die plasma). Baie faktore kan egter die verhouding beïnvloed soos byvoorbeeld die proporsie eritrosiete in die bloed, hemolise in plasma/serum, fluktuasies in selenium inname ensovoorts. 'n Belangrike faktor is die tydsverloop na die verandering in vlak van selenium inname. Die konsentrasie in die plasma/serum verander baie vinnig na 'n verandering in die vlak van selenium inname voorgekom het, terwyl die van volbloed geleidelik verander. Daarom word die plasma/serum konsentrasie as 'n korttermyn voorspeller van die seleniumstatus van diere beskou, en volbloed konsentrasies word as 'n langtermyn voorspeller beskou. Daar kan egter geen bewyse in die literatuur gevind word om aan te dui hoe vinnig hierdie verandering van konsentrasies in die plasma/serum en volbloed plaasvind nie, en die algemene prosedure in seleniumsuplementasie eksperimente is om die selenium konsentrasie met die aanvang van die proef te meet en dan weer eers na drie tot ses weke.

Van Ryssen *et al.* (1999) het die seleniumstatus van lammers bestudeer wat op kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) of raaigras (*Lolium multiflorum*) wei. Hier is bloedmonsters slegs op maandelikse intervalle geneem. Van Ryssen *et al.* (1989) het die selenium en glutatioon peroksidase aktiwiteit in weefsels van skape wat hoë selenium diëte met of seleniet of seleniumkoring gevoer is bestudeer. Hier is bloedmonster op dag 0 en dan eers weer op dag 20 geneem. Ivacic & Weiss (2001) wat die effek van swael en

seleniumkonsentrasies op die selenium status van lakterende Holstein koeie bestudeer het, het hul bloedmonsters op dag 0, 28, 56, 84 en 112 geneem. Die eerste ongeveer 10 dae waar die seleniumvlakke in die plasma gelyk is aan of selfs hoër is as die seleniumvlakke in die volbloed word nie waargeneem nie.

In hierdie proef waar verskillende vlakke van selenium in die anorganiese vorm (wat baie naby aan toksiese vlakke was) aan skape met 'n selenium tekort gevoer is, is plasma en volbloedmonsters voor die aanvang van die proef en weer op dag 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 en 90 geneem. Die selenium konsentrasie van die monsters is bepaal. Die selenium konsentrasie van die plasma was tussen dag 2 en 8 gelyk aan en selfs effens hoër as die selenium konsentrasies in die volbloed. Daarna het die konsentrasie in die plasma konstant gebly tot aan die einde van die proef op 90 dae. Die selenium konsentrasie van die volbloed het 'n styging getoon tot dit 'n plato bereik het na 60 dae. Die selenium konsentrasie in die volbloed van die een behandeling was teen dag 60 1.92 keer hoër as die konsentrasie in die plasma en in die ander behandeling was dit 1.84 keer hoër. Teen dag 90 was hierdie verhoudings 1.96 en 1.80 vir die onderskeie behandelings. Hierdie resultate benadruk die probleme wat ondervind kan word indien slegs een bloedmonster of plasma monster geneem word om die seleniumstatus van diere te bepaal (met 'n onbekende voedingsgeskiedenis) deur byvoorbeeld bloedkonsentrasie waardes om te skakel na plasma en omgekeerd. Dit bevraagteken ook die betekenisvolheid van seleniumkonsentrasie in plasma as 'n korttermyn voorspeller van selenium, indien die aktiewe vorme van selenium (bv. glutatioon peroksidase in eritrosiete) nog nie optimale vlakke bereik het nie.

HOOFSTUK 5

GEVOLGTREKKING

Hierdie studie kan saamgevat word deur die resultate in oënskou te neem. Die resultate van die kreatiefosfokinase en aspartaat transaminase toon duidelik aan dat die diere in die gesupplementeerde groepe wel statisties hoogs betekenisvol verskil van die kontrole groep. Dus het die suplementasie van die spoorelemente sink, selenium en koper die mate van weefseldegenerasie beperk. Die antiliggamproduksie van die gesupplementeerde groepe het ook 'n neiging getoon om hoër te wees as die kontrole groep, alhoewel die verskille nie betekenisvol was nie. Die massastoeename van die gesupplementeerde groepe het ook 'n neiging getoon om hoër te wees as die kontrole groepe, maar ook hier was die verskille nie betekenisvol nie. Dit is dus wel in belang van die dier se gesondheid asook voordelig uit 'n ekonomiese oogpunt om spoorelemente wat betrokke is by die antioksidant funksies in die liggaam te supplementeer tydens droogtes of strawwe winters. 'n Bykomstige feit wat ook waargeneem is in hierdie proef is dat seleniumvlakke in die plasma gedurende die eerste 10 dae na verandering in die vlak van selenium inname wel gelyk aan of selfs hoër kan wees as die seleniumvlakke in die volbloed.

Toekomstige studies

1. Die invloed van selenium, koper en sink op die immuunstelsel van diere sou beter verstaan word indien die konsentrasie immunoglobuliene (Ig) in die serum en die konsentrasie tiroïed hormone ook bepaal is. Rock *et al.* (2000) het die effek van hoeveelheid en chemiese vorm van selenium, wat aan dragtige ooie gevoer is, op die konsentrasie van tiroïed hormone, selenium in weefsels en Ig in die serum, bepaal. Die bepaling is op die ooie en hul pasgebore lammers gedoen. 'n Groep dragtige ooie het 'n dieet met 'n selenium tekort (< 0.02 mg/kg) ontvang terwyl twee ander groepe gesupplementeer is met natriumseleniet of 'n gisvorm om 0.3 mg/kg te verskaf. Dragtige ooie wat gesupplementeer is het verhoogde volbloed en serum seleniumvlakke getoon en

hoër konsentrasies van tri-iodotironien (T_3) en tiroksien (T_4) gehad ($P < 0.05$). Die lammers van gesupplementeerde ooie het op 12 ure na geboorte hoër konsentrasies selenium in bloed en lewer gehad, groter GSH-Px aktiwiteite getoon ($P < 0.05$) en het geneig om hoër T_3 vlakke te hê ($P < 0.1$).

2. Die antiliggaamproduksie kon dalk ook beter gewees het indien die diere 'n langer periode gegun was om teenliggaampies teen die ingeënte beesrooibloedselle te produseer. Nicholson *et al.*, (1993), het die vermoë van beeste om teenliggaampies te produseer in 'n respons tot antigeenuitdagings met skaaprooibloedselle (SRBS) en ovalbumien (OA) in 'n tweefase eksperiment met jaaroue vleisbeeste bestudeer, met en sonder selenium suplementasie. Teenliggaamtiter wat die gevolg was van die uitdaging met SRBS in week vier van die eksperiment, het eers in die derde week na die aanvanklike uitdaging gepiek, waarna dit afgeneem het.
3. Hematokrit waardes kon meer gereeld bepaal word veral aan die begin van die proef. Sodoende kon daar vasgestel word of die diere nie dalk aan bloedarmoede gelei het met die aanvang van die proef nie. Dit sou dalk die feit verduidelik waarom die volbloed selenium alreeds op dag 60 'n hoogtepunt bereik het.
4. Die totale anti-oksidant status van die diere kon ook bepaal geword het om sodoende 'n beter begrip van die diere se algemene gesondheidstatus te hê.
5. Die verskil in effek tussen "slow-release" bolusse en die metode van suplementering wat in die huidige proef gebruik is, naamlik orale dosering met vloeistof kan ook teen mekaar afgespeel word. Die moontlikheid bestaan dat die orale suplementasie in hierdie proef dalk direk na die abomasum kon deurgaans deurdat die slukdermgroef gesluit het wanneer die diere gedoseer is. De Wet & Bath (1994) wys daarop dat koper sulfaat (10 %) in die negentiendertiger jare vir vooraf dosering (teen wurms) gebruik is sodat die slukdermgroef kon sluit en die

middels wat dan onmiddelik daarna toegedien is, direk na die abomasum kon gaan om die wurms te dood. In so 'n geval sal die tussenkoms van reaksies in die rumen ontsnap word en die biobeskikbaarheid van die elemente drasties verhoog. Dit kan ook 'n moontlike verklaring wees vir die hoë seleniumkonsentrasies wat in die lewers van lammers in hierdie proef verkry is.

6. Hoë (normale) en lae (soos tydens droogte voeding) energie diëte kan ook in die toekoms teenoor mekaar afgespeel word. Sodoende kan daar vasgestel word wat die werklike impak van lae energie diëte op die diere se liggaamsfunksies het. Dit is dalk moontlik dat 'n lae energie dieet (soos wat diere tydens droogtevoeding ontvang) die diere se spoorelement behoeftes kan verhoog. Met ander woorde dat die diere 'n hoër behoefte aan sekere spoorelemente sou hê op 'n lae energie vlak om dieselfde resultate te verkry as diere op 'n normale energievlak wat die aanbevole vlakke van spoorelemente ontvang.

HOOFSTUK 6

VERWYSINGS

ARTHUR, J.R., BOYNE, R., HILL, H.A.O. & OKOLOW – ZUBKOWSKA, M.J., 1981. The production of oxygen-derived radicals by neutrophils from selenium-deficient cattle. *Febs Letters*. 135: 187-190.

ASPILLA P., 1991. Metabolism of selenium, selenomethionine and feed-incorporated selenium in lactating goats and dairy cows. *J. Agric. Sci. Finland*. 63(1), 3-73.

BECK A.B., 1962. The copper metabolism of warmblooded animals with special reference to the rabbit and the sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 14, 129-141.

BEILSTEIN, M.A. & WHANGER, P.D., 1983. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in bloodfractions from humans, rhesus and squirrel monkeys, rats and sheep. *J. Nutr.* 113, 2138-2146.

BOYNE, R., ARTHUR, J.R., 1981. Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle. *J. Comp. Path.* 91, 271-276.

CAPLE I.W. & McDONALD J.W., 1983. Trace mineral nutrition. Proceedings: Sheep production and preventative medicine symposium. University of Sydney. Australia 67, 235.

CASTALDO, D. J., 1989. Nutrition and immunity. Large Animal Veterinarian. Afia Nutrition Symposium. 38-39.

CLARK C.K., AROTEGUI R.P. & PATERSON J.A *et al.*, 1995. Effects of chemical form of mineral supplementation on cellular and humoral immune response of yearling heifers. *Proc. West. Sec. Am. Soc. Anim. Sci.* 46, 495.

Cited by Marston, 1999.

CHESTERS J.K., 1978. Biochemical functions of zinc in animals. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 32, 135-164.

DAVIS C.H., 1976. Hooftuk 11: Nutrition – Drought, production and supplementary feeding. Sheep production guide. The Livestock and grain producers' association of New South Wales. McArthur press. Australia.

DE WET J. & BATH G., 1994. Kleinveesiektes. Tafelberg uitgewers Bpk. Kaapstad. Suid-Afrika.

EL-NEWEEHY, T. K., ABDEL-RAHMAN, H. A. & AL-QARAWI, A. A., 2001. Some studies on nutritional muscular dystrophy in Qassim region in Saudi-Arabia. Effects of administration of vitamine E-Selenium preparation to pregnant ewes on serum-muscle-specific enzymes in their lambs. *Small Rum. Res.* 41, 87-89.

EL-NEWEEHY, T. K., ABDEL-RAHMAN, H. A. & AL-QARAWI, A. A., 2000. Some studies on nutritional muscular dystrophy in Qassim region in Saudi-Arabia 1: Enzymatic profile in free, subclinical and clinically affected lambs both before and after treatment with vitamine E and selenium preparation. *Small Rum. Res.* 35, 219-223.

ECHEVARRIA M.G., HENRY C.B., AMMERMAN C.B. & RAO P.V., 1988. Effects of time and dietary selenium oncentration as sodium selenite on tissue selenium uptake by sheep. *J. Anim. Sci.* 66, 2299-2305.

FRIDOVICH, I., 1986. Superoxide Dismutases. *Advances in Zink-Enzymology.* 61-91.

- GERLOFF B.J., 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3934-3940.
- HAKKARAINEN, J., 1993. Bioavailability of selenium. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.* 11, 21-35.
- HALLIWELL, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.* 52(8), 523-265.
- HARTMAN F. & VAN RYSSEN J.B.J., 1997. Metabolism of selenium and copper in sheep with and without sodium bicarbonate supplementation. *J. Agric. Sci., Camb.* 128, 357-364.
- IVANCIC Jr J. & WEISS W.P., 2001. Effect of dietary sulphur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84, 225-232.
- JANSEN VAN RENSBURG C., 2000. Die effek van organiese en anorganiese selenium op die immuunsisteem van skape. MSc. (Agric) tesis, Universiteit van Pretoria, Suid-Afrika.
- JØRGEN, H. & LARSEN, S., 1993. Relations between selenium and immunity. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.* 11, 105-119.
- KANEKO J.J., 1980. Clinical biochemistry of domestic animals (3rd ed.). Academic Press, New-York.
- KARLMARK, B., 1993. Relation of selenium to other antioxidants, with special reference to free radicals. *Norw. J. Agric. Sci. Suppl.* no, 11.

KEARL, L.C., 1982. Nutrient requirements of ruminants in developing countries. International Feedstuffs Institute, Utah. Agricultural Experiment Station, Utah State University, Logan, Utah 84322, USA.

KNOWLES S.O., GRACE N.D., WURMS K. & LEE J., 1999. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.* 82: 429-437.

LARSEN, H.J., 1988. Effect of selenium on sheep lymphocyte responses to mytogens. *Res. Vet. Sci.* 45, 11-15.

LEE, J., MASTERS, D.G., WHITE, C.L., GRACE, N.D. & JUDSON G.J., 1999. Current issues in trace element nutrition of grazing livestock in Australia and New-Zealand. *Austr. J. Agric. Res.* 50, 1341-1364.

MARSTON, T., 1999. Tracemineral supplementation in beef cattle. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.* 21,521-527.

McDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D. & MORGAN, C.A., 1996. *Animal Nutritiona* (5th ed). Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. Singapore.

McDOWELL L.R. & CONRAD J.H., 1986. Mineral supplementation for cattle in the tropics. *Agric. It.* February.

MILLS C.F., 1978. Zinc in ruminant nutrition. Annual report of studies in animal nutrition and applied sciences. The Rowett Research Institute. 34, 105-111.

MOSTENBOCKER, M.A. & TAPPEL, A.L., 1982. Selenocystein-containing proteins from rat and monkey plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 704, 253-260.
Cited by Aspilla (1991).

NICHOLSON J.W.G., McQUEEN R.E. & BUSH R.S., 1991. Response of growing cattle to supplementation with organically bound or inorganic sources of selenium or yeast cultures. *Can. J. Anim. Sci.* 71, 803-811.

NICHOLSON, J. W. G., BUSH, R. S. & ALLEN, J. G., 1993. Antibody responses of growing beef cattle fed silage diets with and without selenium supplementation. *Can. J. Anim. Sci.* 73, 355-365.

NOCKELS, C. F., 1996. Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62, 59-68.

NRC, 1983. National Research Council. Subcommittee on selenium. Selenium in Nutrition. Revised Ed. National Academy Press. Washington, DC. Cited by Pehrson B.G. (1993)

NRC, 1985. Nutrient requirements of sheep. (6th ed). National Academy Press, Washington D.C.

OH, S.H., SUNDE, R.A., POPE, A.L. & HOEKSTRA, W.G. 1976. Glutathione peroxidase response to selenium intake in lambs fed a torula yeast-based, artificial milk. *J. Anim. Sci.* 42, 977-982.

PETER, D. W., BOARD, P. G. & PALMER, M. J., 1980. Selenium supplementantion of grazing sheep. Effects of selenium drenching and other factors on plasma and erythrocyte glutathione peroxidase activities and blood selenium concentrations of lambs and ewes. *Aust. J. Agric. Res.* 31, 991-1004.

PEHRSON B.G., 1993. Selenium in nutrition with special reference to the biopotency of organic and inorganic selenium compounds. In: Biotechnology in the Feed Industry. Ed. Lyons T.P. Alltech Technical Publication, Nicholasville KY.

- PERSON, B. O., 1993. Diseases and diffuse disorders related to selenium deficiencies in ruminants. *Norw. J. Agric. Sci.* Supplement 11, 80-93.
- PULS, R., 1994. Mineral Levels in Animal Health: Diagnostic Data, Trinity Western University Press, Clearbook, British Columbia, Canada, pp. 302-303.
- REFFETT, J.K., SPEARS, J.W. & BROWN, T.T., Jr., 1988. Effect of dietary selenium and vitamin-E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza₃ virus. *J. Anim. Sci.* 66, 1520-1528.
- ROCK M.J., KINCAID R.L. & CARSTENS G. E., 2000. Effects of prenatal source and level of dietary selenium on passive immunity and thermometabolism of newborn lambs. *Small Rum. Res.* 40, 129-138.
- ROTRUCK, J.T., POPE, A.L., GANTHER, H.E., SWANSON, A.B., HAFEMAN, D.G. & HOEKSTRA, W.G., 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Sci.* 179, 585. Cited by Reffett *et al.*, 1988.
- SAMUELS, M.L., 1989. Statistics for the life sciences. Collier MacMillan Publishers, London.
- SCOTT, M.L. & THOMPSON, J.N., 1971. Selenium content of feedstuffs and effects of dietary selenium levels upon tissue selenium in chicks and poults. *Poult. Sci.* 50, 1742. Cited by Ullrey, 1987.
- SHAW S., 1990. GBC 904 and 905 atomic absorption spectrophotometers operation manual. GBC Scientific Equipment Pty. Ltd. Australia.
- SINGH, A., FAILLA, M. L. & DEUSTER, P. A., 1994. Exercise induced changes in immune function: effects of zinc supplementation. *J. Appl. Physiol.* 76, 2298-2303.

STABEL, J.R., SPEARS, J.W., BROWN Jr., T.T. & BRAKE, J. 1989. Selenium effects on glutathione peroxidase and the immune response of stressed calves challenged with *Pasteurella hemolitica*. *J. Anim. Sci.* 67, 557-564.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS, 1994. SAS User's Guide: Statistics Version 6 SAS Institute Inc. Cary, NC., USA.

STEENKAMP, C. W. P. & HAYWARD, F. C., 1975. Feeding during droughts. Farming in South Africa. D.3.2

STOWE, H.D. & HERDT, 1992. Clinical assessment of selenium status of livestock. *J. Anim. Sci.* 70, 3928-3933.

SUTTLE, N.F., 1994. Copper deficiency in ruminants, recent developments. *Vet. Rec.* 119, 519-522.

ULLREY, D. E., 1987. Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. *J. Anim. Sci.* 65, 1712-1726.

ULLREY, D. E., 1992. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets. *J. Anim. Sci.* 70, 3922-3927.

UNDERWOOD, E.J. & SUTTLE N.F., 1999. The Mineral Nutrition of Livestock (3rd ed.). CABI Publishing.

VAN METRE, D. C., CALLAN, R. J., 2001. Selenium and vitamin-E. *The Veterinary Clinics of North-America Food and Animal Practice.* 17, 373-402.

VAN NIEKERK B.D.H., 1971. Drought feeding of sheep. Dept. Zootechnology Fac of Vet. Sci. O.P.

VAN RYSSSEN J.B.J., DEAGEN J.T., BEILSTEIN M.A. & WHANGER P.D., 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1358-1363.

VAN RYSSSEN, J.B.J., VAN MALSEN, P.S.M. & HARTMAN, F. 1998. Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep. *J. Agric Sci.* 130, 107-114.

VAN RYSSSEN J.B.J., COERTZE R.J. & DE VILLIERS J.F., 1999. Supplementation of selenium to sheep grazing kikuyu or ryegrass: I. Selenium status of unsupplemented sheep and animal performance upon supplementation. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29, 137-144.

VAN RYSSSEN J.B.J., COERTZE R.J. & DE VILLIERS J.F., 1999. Supplementation of selenium to sheep grazing kikuyu or ryegrass: II Effect on selenium concentration in the grass and body tissues. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 29, 145-153.

WARD, J.D., SPEARS, J.W. & KEGLEY, E.B., 1993. Effect of copper level and source (copper lysate vs copper sulphate) on copper status, performance and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulphur. *J. Anim. Sci.* 71, 2748-2755.

WRIGHT P.L., 1965. Lifespan of ovine erythrocytes as estimated from selenium-75 kinetics. *J. Anim. Sci.* 24, 546-550.

ZACHARA B.A., MIKOLAJCZAR J. & TRAFIKOWSKA U., 1993. Effect of various dietary selenium (Se) intakes on tissue Se levels and glutathione peroxidase activity in lambs. *J. Vet. Med. A.* 40, 310-318.