

DIE EFFEK VAN ORGANIESE EN ANORGANIESE SELENIUM OP DIE IMMUUNSISTEEM VAN SKAPE

deur

Christine Jansen van Rensburg
B.Sc. (Agric.) Hons. (Veekunde) (UP)

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

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

Promotor: Prof J.B.J. van Ryssen

UNIVERSITY OF PRETORIA
LIBRARY
1000

Januarie 2000

Ek verklaar dat die verhandeling wat ek hiermee vir die graad Magister Scientiae (Agriculturae) aan die Universiteit van Pretoria indien, my eie werk is en nie voorheen deur my vir 'n graad aan 'n ander universiteit ingedien is nie.

BEDANKINGS

*“Ek kyk op na die berge:
Waarvandaan sal daar
vir my hulp kom?
My hulp kom van die Here
Wat hemel en aarde gemaak het”
Psalm 121: 1,2*

Ek wil graag my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone betuig:

My promotor, *Prof. J. van Ryssen*, vir sy hulp en leiding;

My ma, *Prof. C.E. Medlen*, vir haar raad en aanmoediging;

Dr. A. Theron vir haar hulp met die chemiluminessensie, die laat aande sal nooit vergeet word nie;

Chrisna Durandt vir haar hulp met die vloeisitometrie;

Nico Günther vir die skenking van die mononukleêre antiligggame en sy hulp met die voorbereiding van die monsters vir vloeisitometrie;

Mev. E. Snyman vir haar hulp en oneindige geduld met die bepaling van die seleniumvlakke;

Prof. Groeneveld en in die besonder *Mnr. R. Coertze* vir sy raad en hulp met die statistiese analise;

Die personeel van die Departement Vee-en Wilkonde, UP, vir hul opregte belangstelling en aanmoediging.

INHOUDSOPGAWE

OPSOMMING	1
SUMMARY	3
LYS VAN FIGURE	5
LYS VAN TABELLE	7
HOOFSTUK 1: LITERATUUROORSIG	10
1.1 DIE IMMUUNSISTEEM	11
1.1.1 Selle van die Immuunsisteem	11
1.1.2 Organe van die Immuunsisteem	13
1.1.3 Tipe Immunititeit	13
1.1.4 Komplement	14
1.1.5 Ander Faktore in Humorale Immunititeit	15
1.1.6 Sellulêre Meganismes van Aangebore Immunititeit	15
1.1.7 Verworwe Immunititeit	19
1.2 DIE INVLOED VAN OKSIDANTE EN ANTIOKSIDANTE OP DIE IMMUUNSISTEEM	26
1.2.1 Vrye Radikale	26
1.2.2 Antioksidante	31
1.2.3 Immuunfunksies, Vrye Radikaal Reaksies en Antioksidante	33
1.2.4 Koper en die Immuunsisteem	38
1.2.5 Die Effek van Sink op die Immuunsisteem	41
1.3 SELENIUM	43
1.3.1 Organiese vs. Anorganiese Selenium	43
1.3.2 Selenium as Antioksidant	50
1.3.3 Die Invloed van Selenium op die Immuunsisteem	51

1.4	SELENIUM TOKSISITEIT	60
1.4.1	Meganismes van Seleniumvergiftiging	61
1.4.2	Akute en Kroniese Vergiftiging	63
1.4.3	Anorganiese vs. Organiese Seleniumvergiftiging	66
1.5	MOTIVERING VIR STUDIE	69
HOOFSTUK 2: PROSEDURE		71
2.1	DIERE	72
2.1.1	Behuising	72
2.1.2	Voeding	72
2.1.3	Groepindeling	73
2.2	MONSTERNEMING EN LABORATORIUMANALISES	74
2.2.1	Bepaling van seleniumvlakke	74
2.2.2	Chemiluminessensie	75
2.2.3	Antiliggaamtiter	76
2.2.4	Vloeisitometrie	77
2.2.5	Kreatien Fosfokinase	78
2.2.6	Statistiese analise	79
HOOFSTUK 3: RESULTATE		80
3.1	SELENIUMVLAKKE IN DIE VOER	81
3.2	SELENIUMVLAKKE IN VOLBLOED, PLASMA EN WEEFSELS	82
3.2.1	Gemiddelde seleniumvlakke in volbloed	85
3.2.2	Gemiddelde seleniumvlakke in die plasma	87
3.2.3	Gemiddelde seleniumvlakke in die hartspier	89
3.2.4	Gemiddelde seleniumvlakke in die lewer	91
3.2.5	Gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks	93
3.2.6	Gemiddelde seleniumvlakke in die <i>Longissimus dorsi</i> spier	95

3.3	ANTILIGGAAMPRODUKSIE	97
3.3.1	Primêre antiliggaamproduksie, 2 weke na uitdaging	98
3.3.2	Primêre antiliggaamproduksie, 3 weke na uitdaging	100
3.3.3	Sekondêre antiliggaamproduksie, 1 week na uitdaging	102
3.4	SUPEROKSIEDPRODUKSIE DEUR GESTIMULEERDE NEUTROFIELE	104
3.4.1	Superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele	105
3.4.2	Superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele, gekorregeer vir leukosietelling	107
3.5	LIMFOSIETPOPULASIES AS PERSENTASIE VAN TOTALE LEUKOSIETE	109
3.5.1	T limfosiete	110
3.6	KREATIEN FOSFOKINASE	112
3.6.1	Kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum, 1 maand na aanvang van seleniumsupplementering	113
3.6.2	Kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum, 3 maande na aanvang van seleniumsupplementering	115
3.7	LEWERMASSA	117
	HOOFSTUK 4: BESPREKING	119
	HOOFSTUK 5: VERWYSINGS	133

OPSOMMING

Die effek van die organiese en anorganiese vorme van selenium op sekere parameters van die immuunsisteem van skape, is ondersoek. Die potensiële gevaar wat die suplementering van hierdie twee seleniumbronne teen hoë vlakke in die dieet, op die immuunstelsel van skape inhou, is ook bestudeer. Daar is verder ook gekyk na die mate van akkumulering van selenium wat in verskillende weefsels in die liggaam, na suplementering van organiese en anorganiese selenium teen verskillende konsentrasies, plaasvind.

‘n Seleniumryke gis is as bron van organiese selenium gebruik en aan drie groepe Vleismerino skape gesupplementeer teen vlakke van 6 mg/skaap/dag, 1.5 mg/skaap/dag en 0.75 mg/skaap/dag. Natriumseleniet is as bron van anorganiese selenium gebruik om drie ander groepe diere teen dieselfde vlakke te supplementeer. ‘n Sewende groep, wat geen seleniumsuplementering ontvang het nie, het as kontrole gedien.

Die suplementering van organiese selenium teen vlakke van 6 mg/skaap/dag, 1.5 mg/skaap/dag en 0.75 mg/skaap/dag, het, in vergelyking met anorganiese selenium, tot ‘n betekenisvolle hoër akkumulering van selenium in die skelet- en hartspier gelei. Selenium wat in ‘n organiese vorm teen vlakke van 6 mg/skaap/dag en 1.5 mg/skaap/dag gesupplementeer is, het ‘n betekenisvolle hoër akkumulering van selenium in die volbloed, plasma, nierkorteks en lewer, veroorsaak. Geen betekenisvolle verskille tussen organiese en anorganiese selenium is, in terme van seleniumakkumulering in die volbloed, plasma, nierkorteks en lewer, by ‘n supplementeringsvlak van 0.75 mg/dag waargeneem nie. Daar is ook gevind dat die seleniumvlakke in die volbloed nie betekenisvol van mekaar verskil het wanneer die diere met 0.75 en 1.5 mg/dag anorganiese selenium gesupplementeer is nie. Dit dui daarop dat seleniumkonsentrasie in die volbloed moontlik nie ‘n akkurate voorspeller van seleniuminname, wanneer diere anorganiese selenium in die dieet ontvang, is nie.

Die gemiddelde superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiële was betekenisvol laer vir die groep met ‘n 0.75 mg/dag anorganiese seleniumsuplementering. Hierdie resultate stel voor dat selenium, wat as natriumseleniet teen ‘n vlak van 0.75 mg/dag aan skape gesupplementeer word, as antioksidant optree. Die antioksidatiewe eienskappe veroorsaak ‘n opruiming van superoksied, wat deur die gestimuleerde neutrofiële geproduseer word. Die hoër T

limfosiëttellings en laer kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum van hierdie groep dui op 'n beter membraanbeskerming van die T limfosiëtmembrane en spierselmembrane en steun die hipotese dat 'n inname van 0.75 mg/dag anorganiese selenium, bo-op die selenium wat natuurlik in die dieet teenwoordig is, as antioksidant in die liggaam optree.

Die skape wat 1.5 mg/dag natriumseleniet as supplement ontvang het, het die hoogste primêre en sekondêre antiliggaamproduksie teen per dier getoon. Die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie teen per dier van die groep diere wat 6 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, was betekenisvol laer as die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie van die ander groepe gewees. Hierdie onderdrukking van antiliggaamproduksie kan toegeskryf word aan 'n vergiftigingseffek van 'n hoë anorganiese seleniuminname, wat nie by organiese selenium waargeneem is nie. Dit is moontlik as gevolg van die pro-oksidant eienskappe van 'n hoë vlak van seleniet. Hierdie pro-oksidant eienskappe van hoë vlakke van natriumseleniet inname word ondersteun deur die definitiewe spierskade wat 'n suplementering van 6 mg/dag natriumseleniet veroorsaak het. 'n Inname van 6 mg/dag selenium, in beide organiese en anorganiese vorm, asook 1.5 mg selenium in anorganiese vorm, het tot 'n vergroting van die lewer gelei. Aangesien hierdie effek reeds by 'n veel laer vlak van aanvulling van anorganiese selenium gevind word, kan aangeneem word dat die inname anorganiese selenium 'n groter stremming op die lewer plaas.

Daar word, na aanleiding van hierdie projek, aanvaar dat anorganiese selenium teen 'n supplementeringsvlak van 0.75 mg/dag/skaap, bo-op die selenium wat natuurlik in die dieet voorkom, voordelig vir die immuunsisteem is en membraanskade doeltreffend beperk. Hierdie vlak is ongeveer ekwivalent aan 'n totale seleniuminname van 0.44 mg selenium/kg gewig/dag, waarvan minstens 75% uit 'n anorganiese selenium bestaan. Geen toksiese effekte is by hierdie vlak waargeneem, soos in die geval by die hoër vlakke van anorganiese selenium, nie. Alhoewel die supplementering met hoër vlakke van organiese selenium nie werklik toksiese effekte, buiten die vergroting van die lewer, getoon het nie, is daar ook geen positiewe effekte op die immuunsisteem en beskerming van selmembrane, by laer vlakke gevind nie. Organiese selenium blyk slegs doeltreffend te wees as voersupplement waar die doel is om dierlike produkte, vir mensgebruik, met selenium te verryk. Hierdie supplementering kan dan ook met 'n hoër mate van veiligheid uitgevoer word as wat die geval met anorganiese selenium is.

SUMMARY

The effects of organic and inorganic forms of selenium on the immune system of sheep have been investigated and the potential danger of high dietary levels has also been studied. The extent by which the accumulation of selenium in various tissues occurs, after supplementation of either organic or inorganic selenium at differing concentrations was also investigated.

Selenium rich yeast as a source of organic selenium was used as a supplement at, respectively, 6mg/sheep/day, 1.5mg/sheep/day and 0.75mg/sheep/day to three groups of Mutton Merino sheep. Sodium selenite as source of inorganic selenium was used to supplement another three groups of animals at the same levels. A seventh group who did not receive any selenium supplementation served as a control.

Supplementation of organic selenium in a yeast form led to significantly higher levels of selenium in the skeletal muscles and heart compared to sodium selenite in all three groups whereas supplementation of organic selenium at 6mg and 1.5mg/sheep/day led to significantly higher selenium levels in whole blood, plasma and kidney cortex compared to the groups supplemented with inorganic selenium at the same concentrations. It was also found that the selenium levels in whole blood did not differ significantly between the animals on 0.75 and 1.5mg/day inorganic selenium indicating that the selenium concentration in whole blood is possibly not an accurate indicator of selenium intake in the case of animals receiving inorganic selenium in their diet.

The mean superoxide production by stimulated neutrophils was significantly lower in the group supplemented with inorganic selenium at 0.75mg/day suggesting that selenium, at that concentration, can act as an antioxidant. The anti-oxidative properties of selenium caused a scavenging of neutrophil-derived superoxide. This group of sheep also had a higher T-lymphocyte count and lower creatinine phosphokinase activity in serum indicating a protection of T-lymphocyte membranes and support the hypothesis that 0.75mg/day inorganic selenium can act as an anti-oxidant in the body.

The sheep on 1.5mg/day sodium selenite supplementation produced the highest primary and secondary antibodies against horse erythrocytes. On the other hand, animals receiving inorganic sodium selenite at 6mg/day produced significantly lower levels of primary antibodies than any of

the other groups indicating the poisonous effect of high inorganic selenium supplementation that was not observed with the animals on organic selenium supplementation. This is possible because of the pro-oxidative properties of high selenium levels. These pro-oxidative properties of high selenium levels produced by the high intake of sodium selenite are supported by specific muscle damage caused by the supplementation of 6mg/day sodium selenite. An intake of 6mg/day of selenium in both forms, as well as 1.5mg selenium in inorganic form, led to enlargement of the liver. Because this effect was found at a much lower level with inorganic selenium supplementation, it can be concluded that inorganic selenium places a greater stress on the liver.

With these results in mind, the conclusion can be drawn that inorganic selenium supplemented at a level of 0.75 mg/day/sheep, together with the natural occurring feed selenium, can be advantageous for the immune system by effectively protecting cell membranes against neutrophil mediated oxidative damage. This level is approximately equal to a total selenium intake of 0.44mg/kg live weight/day, of which at least 75% consists of inorganic selenium. No toxic effect was observed at this level, as was the case with higher levels of inorganic selenium.

Supplementation with high levels of organic selenium did not lead to any definitive toxic effects, except enlargement of the liver, but there were also no positive effects on the immune system or protection of the cell membranes found at lower levels. Organic selenium seems to be effective only in the case where it is used as food supplement with the purpose to enrich animal products for human use. Thus it would appear from the results of the study, that organic selenium offers a safer method of dietary supplementation.

LYS VAN FIGURE

Figuur 1.1	Reaksies met suurstof wat lei tot meer reaktiewe spesies as suurstof	27
Figuur 1.2	Reaksies waarby die antioksidant ensieme betrokke is	33
Figuur 3.1	Gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die verskillende groepe, 3 maande, 4 maande en 5 maande na aanvang van seleniumplesmentering	83
Figuur 3.2	Gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die verskillende groepe, met slag	86
Figuur 3.3	Gemiddelde seleniumvlakke in die plasma van die verskillende groepe, met slag	88
Figuur 3.4	Gemiddelde seleniumvlakke in die hartspier van die verskillende groepe, met slag	90
Figuur 3.5	Gemiddelde seleniumvlakke in die lewer van die verskillende groepe, met slag	92
Figuur 3.6	Gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks van die verskillende groepe, met slag	94
Figuur 3.7	Gemiddelde seleniumvlakke in die <i>Longissimus dorsi</i> spier van die verskillende groepe, met slag	97
Figuur 3.8	Gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen per d eritrosiete (2 weke na uitdaging) van die verskillende groepe	99

Figuur 3.9	Gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete (3 weke na uitdaging) van die verskillende groepe	101
Figuur 3.10	Gemiddelde sekondêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete (1 week na uitdaging) van die verskillende groepe	103
Figuur 3.11	Superoksiedproduksie deur PMA gestimuleerde neutrofiele van die verskillende groepe	106
Figuur 3.12	Superoksiedproduksie deur PMA gestimuleerde neutrofiele, gekorrigeer vir leukosiettellings van die verskillende groepe	108
Figuur 3.13	Totale T limfosiete, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete, van die verskillende groepe	111
Figuur 3.14	Kreatien fosfokinase aktiwiteit (μL) in serum, 1 maand na aanvang van seleniumsupplementering, van die verskillende groepe	114
Figuur 3.15	Kreatien fosfokinase aktiwiteit (μL) in serum, 3 maande na aanvang van seleniumsupplementering, van die verskillende groepe	117
Figuur 3.16	Lewermassa met slag, uitgedruk as persentasie van karkasmassa van die verskillende groepe	118

LYS VAN TABELLE

Tabel 1.1	Verspreiding van selenium en selenium-afhanklike glutatioon peroksidase aktiwiteit in rotweefsels	51
Tabel 3.1	Gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed, 3, 4 en 5 maande na aanvang van seleniumsupplementering van die verskillende groepe	82
Tabel 3.2	Gemiddelde seleniumvlakke in volbloed, plasma, hartspier, lewer, nierkorteks en <i>Longissimus dorsi</i> spier, met slag (5 maande na aanvang van seleniumsupplementering)	84
Tabel 3.3	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die verskillende groepe, aan te dui	85
Tabel 3.4	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma van die verskillende groepe, aan te dui	87
Tabel 3.5	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die hartspier van die verskillende groepe, aan te dui	89
Tabel 3.6	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die lewer van die verskillende groepe, aan te dui	91
Tabel 3.7	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks van die verskillende groepe, aan te dui	93

Tabel 3.8	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die <i>Longissimus dorsi</i> spier van die verskillende groepe, aan te dui	95
Tabel 3.9	Gemiddelde antiliggaamproduksie, uitgedruk as 'n verdunningsfaktor	97
Tabel 3.10	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie teen perditritrosiete (2 weke na uitdaging) van die verskillende groepe, aan te dui	98
Tabel 3.11	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie teen perditritrosiete (3 weke na uitdaging) van die verskillende groepe, aan te dui	100
Tabel 3.12	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde sekondêre antiliggaamproduksie teen perditritrosiete (1 week na uitdaging) van die verskillende groepe, aan te dui	102
Tabel 3.13	Gemiddelde superoksiedproduksie deur PMA gestimuleerde neutrofiele	104
Tabel 3.14	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele van die verskillende groepe, aan te dui	105
Tabel 3.15	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele, gekorrigeer vir witbloedselle, van die verskillende groepe, aan te dui	107

Tabel 3.16	Gemiddelde CD4 ⁺ - en CD8 ⁺ T limfosiete, B limfosiete en totale limfosiete van die verskillende groepe, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete	109
Tabel 3.17	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die totale T limfosiete, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete, van die verskillende groepe aan te dui	110
Tabel 3.18	Gemiddelde kreatien fosfokinase, na 1 maand en 3 maande van seleniumsupplementering	112
Tabel 3.19	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die kreatien kinase aktiwiteit in die serum, een maand na aanvang van seleniumsupplementering, van die verskillende groepe, aan te dui	113
Tabel 3.20	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die kreatien kinase aktiwiteit in die serum, drie maande na aanvang van seleniumsupplementering, van die verskillende groepe, aan te dui	115
Tabel 3.21	Gemiddelde lewer massa met slag, uitgedruk as % van karkas massa	117
Tabel 3.22	P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die lewer massa, as % van karkas massa, van die groepe, aan te dui	117

HOOFTUK 1

LITERATUUROORSIG

1.1 DIE IMMUUNSISTEEM

Die volgende gedeelte rakende die immuunsisteem is slegs agtergrond inligting en is bedoel om 'n geheelbeeld van die immuunsisteem aan die leser te skets.

1.1.1 SELLE VAN DIE IMMUUNSISTEEM

Die beenmurg is die bron van die voorloperselle waaruit al die selle van die immuunsisteem voortspruit. Tydens die fetusperiode is die lewer egter ook 'n bron van immuunsel ontwikkeling (Peakman & Verganis, 1997).

(i) Granulosiete

Die granulosiete word in die beenmurg gevorm en in die bloed vrygestel. Die granulosiete maak ongeveer 65% van alle witselle uit en verkry hul naam vanaf die groot aantal granules wat in die sitoplasma gevind word. Granulosiete kan in drie groepe verdeel word, nl. basofiele (0,5 - 1% van die granulosiete), eosinofiele (3 - 5%) en neutrofiële (90 - 95%). Die term, polimorfonukleêre sel, beskryf die multi-gelobde kerne van neutrofiële en eosinofiele. Granulosiete sirkuleer in die bloed en migreer veral in weefsels in tydens inflammatoriese reaksies. 'n Uitsondering hierop is egter die mastselle, wat in baie opsigte ooreenstem met basofiele, maar blywend is in die weefsels (Peakman & Verganis, 1997).

(ii) Monosiete en dendritiese selle

Monosiete vorm tussen 5 en 10% van sirkulerende witbloedselle en het 'n kort halfleeftyd. Na ongeveer 24 uur in die bloed beweeg die monosiete na die ekstravaskulêre poel waarna hulle in die weefsels bly en as makrofage bekend staan. Terwyl daar eers vermoed is dat elke makrofaag vanaf 'n enkele monosiet vorm, is daar nou bewyse dat makrofage ook kan ontstaan na verdeling van onvolwasse vorme van monosiete. Die morfologie van monosiete en makrofage is hoogs variërend, maar is in breë terme groter as neutrofiële en limfosiete, het 'n enkele ongelobde kern en beskik oor volop granulêre sitoplasma. Verskeie gespesialiseerde vorme van die volwasse selle bestaan, insluitend alveolêre makrofage in die long, Kupffer selle in die lewer, mesangiale selle in die niere, mikrogliale selle in die brein, osteoklaste in been en ander makrofage wat die kanale in die milt en limfknope omlin (Peakman & Verganis, 1997).

'n Klein persentasie immuunselle in die perifere bloed, limfknope, beenmurg en weefsels het 'n

kenmerkende voorkoms van 'n groot aantal sitoplasmiese uitsteeksels. Hierdie selle, bekend as dendritiese selle, ontwikkel in die beenmurg en het 'n gespesialiseerde funksie in die aktivering van limfosiete (Peakman & Verganis, 1997).

(iii) Limfosiete

Limfosiete maak die finale 25 - 35% van witbloedselle uit en kry die naam van 'n noue verwantskap met die limfstelsel. Limfosiete word onderverdeel in twee subtypes, nl. B limfosiete en T limfosiete en is in die bloed teenwoordig in 'n verhouding van ongeveer 1:5. Hierdie twee groepe se funksies verskil en kan onderskei word, op grond van die teenwoordigheid van hoogs gespesialiseerde glikoproteïen molekules op hul oppervlakte, met behulp van 'n elektronmikroskoop. Limfosiete word in die bloed, limforgane of weefsels en ook streke van kroniese inflammasie, gevind. Hul voorlopers ontstaan in die beenmurg en volwassewording vind plaas op twee verskillende maniere (Janeway & Travers, 1996).

B-limfosiete differensieer in die beenmurg voordat dit in sirkulasie vrygestel word. Tydens die fetale stadium is die lewer ook 'n belangrike streek van B-sel ontwikkeling. Die primêre rol van hierdie selle is die herkenning van makromolekules (antigene) deur oppervlakreseptore (antiliggame). B limfosiete differensieer uiteindelik tot antiliggaam-produiserende plasmasette (Janeway & Travers, 1996).

Die T limfosiete ontwikkel in die beenmurg, terwyl rypwording in die timus, tydens die vroeë leeftyd van die dier, plaasvind. Tydens hierdie periode ontwikkel hulle die vermoë om vreemde organismes te herken (die vermoë om tussen eie en vreemde proteïene te onderskei). T limfosiete speel 'n belangrike rol by selbemiddelde immuunreaksies en stimuleer die ander selle van die immuunsisteem om veral virus- en opportunistiese infeksies te bekamp. In die afwesigheid van T limfosiete word die beskerming teen infeksies baie beperk. Alhoewel T limfosiete nie self antiliggame kan produseer nie, produseer hulle belangrike groeifaktore wat B limfosiete benodig om antiliggaam-produiserende plasmasette te vorm (Janeway & Travers, 1996).

(iv) Natural Killer Selle

'n Klein populasie limfosiete bestaan wat nie as T-selle of B-selle geklassifiseer kan word nie. Hierdie selle staan as Natural Killer (NK) selle bekend en besit die vermoë om virus-geïnfekteerde selle en tumorselle te liseer. Hierdie NK selle kan, soos limfosiete, ook onderskei word deur die teenwoordigheid van gespesialiseerde oppervlak glikoproteïene. 'n Populasie van

selle wat morfologies as groot granulêre limfosiete gedefinieer word, het ook natuurlike dodingsfunksie. Hierdie term is egter beperk aangesien T limfosiete wat aktief betrokke is in 'n immuunreaksie groot en granulêr mag vertoon. NK selle benodig nie, soos die T limfosiete, die timus vir hul volwassewording nie, alhoewel 'n klein populasie van timus-gederiveerde selle met NK funksie tog geïdentifiseer is (Abbas *et al.*, 1994).

1.1.2 ORGANE VAN DIE IMMUUNSISTEEM

Limfosiete het die onderskeidende funksie van hersirkulasie tussen die bloed, weefsels en limfoïed organe. 'n Limfosiet voltooi een sirkulasieroete binne ongeveer 1 - 2 dae. Organe van die limfoïedsisteem word verdeel in primêre en sekondêre limfoïed organe. Die primêre organe in soogdiere bestaan uit die beenmurg en timus, aangesien dit die streke is van ontwikkeling en volwassewording van die limfosiete (by voëls is die bursa van Fabricius ook ingesluit). Sekondêre limfoïed organe (limfknope en milt) speel 'n sleutelrol in die ontwikkeling van immuniteit (Peakman & Verganis, 1997).

1.1.3 TIPE IMMUNITEIT

(i) Aangebore Immuniteit

Aangebore immuniteit is reeds met geboorte aanwesig en is die hoof verdediging teen indringende organismes. Hierdie immuniteit is teenwoordig oor die hele leeftyd en het geen geheue of spesifisiteit nie, vandaar ook die naam nie-spesifieke immuniteit. Aangebore immuniteit het drie komponente, nl. fisiochemies, humoraal en sellulêr (Janeway & Travers, 1996).

Die fisiochemiese komponent bestaan uit die vel en mukosa, sekresies wat die mukosa membrane gedurig reinig, en silia, wat help om vreemde materiaal te verwyder. Die immunologies aktiewe faktore wat in die mukosale sekresies, bloed en serebro-spinale vloeistof teenwoordig is, maak die humorale komponent uit. Die belangrikste van hierdie faktore is komplement, terwyl die ander faktore addisionele opsonien (help met die vertering van bakterieë deur neutrofiele) en proteolitiese ensieme (soos lisosiem) is. Die sellulêre komponente is die neutrofiele, eosinofiele, mastselle en NK selle (Janeway & Travers, 1996).

(ii) Verworwe Immuniteit

Sommige tipes immuunreaksies is nie met geboorte aanwesig nie, maar word later verkry. Hierdie tipe immuniteit het spesifisiteit en geheue (Janeway & Travers, 1996).

1.1.4 KOMPLEMENT

Komplement is 'n groep hitte-labiele serum proteïene wat antiligggame komplementeer in die vernietiging van organismes. Dit is 'n proteïenkaskade wat bestaan uit meer as 40 proteïene, insluitend regulatoriese faktore. Die komponente word in die lewer geproduseer alhoewel produksie ook tot 'n mate by streke van inflammasie kan plaasvind (Müller-Eberhard, 1988).

Komplement proteïene

Die meeste van die komplement proteïene is oplosbaar, alhoewel sommige membraangebonde is. Die oplosbare proteïene sirkuleer in 'n onaktiewe toestand en elkeen moet opvolgend geaktiveer word vir die reaksie om te vorder. Elke geaktiveerde molekule kan die omskakeling van verskeie molekules van die volgende komponent in die reeks kataliseer. Komplement aktivering het verskeie biologiese aktiwiteite tot gevolg, waarvan sel of bakteriese lise, produksie van pro-inflammatoriese mediatore en oplossing van antigeen-antiliggaam komplekse, die belangrikste is (Müller-Eberhard, 1988).

Volledige komplement aktivering wat op sel oppervlaktes plaasvind, lei tot sel lise. Tipiese teikens sluit bakterieë en virusse in, maar gasheer eritrosiete, plaatjies en limfositete mag ook slagoffers word onder sekere patologiese toestande (Müller-Eberhard, 1988).

Verwydering van immuunkomplekse

Immuunkomplekse van antiligggame en antigene vorm aanhoudend in klein getalle in die sirkulasie, met periodiese toenames tydens infeksies of inflammatoriese reaksies. Hierdie kompleksvorming is potensieel gevaarlik aangesien dit in die bloedvaatwande of weefsels gedeponeer kan word en komplement aktivering kan aanspoor, met al die gepaardgaande pro-inflammatoriese effekte. Groter komplekse, saamgestel uit 'n mat van antiligggame en antigene, kan maklik onoplosbaar raak en in die weefsels deponeer. Komplement het twee sleutel beskermende funksies om sulke skade te verhoed, nl. die vermoë om immuunkomplekse in oplossing te hou en die vermoë om hul verwydering uit die sirkulasie te bespoedig. Die kovalente binding van die voorloper molekule fragment, C3b, aan antiligggame in 'n kompleks, inhibeer die vorming van 'n mat en onderhou oplosbaarheid. Verder heg C3b-oortrekte komplekse aan die reseptore CR-1 van veral eritrosiete. Hierdie selle dien as 'n buffer en herstel gedurig die aantal komplekse na 'n aanvaarbare lae vlak. Wanneer dit eers gebind is, word immuunkomplekse op die rooibloedselle na die lewer en milt vervoer, waar hulle vrygestel word en deur die teenwoordigende makrofage opgeneem word (Müller-Eberhard, 1988).

1.1.5 ANDER FAKTORE IN HUMORALE IMMUNITEIT

Ander proteïene mag ook 'n rol speel in die aangebore immuunreaksie. Een so 'n proteïen is die C-reaktiewe proteïen (CRP), so genoem vanweë sy vermoë om aan die C-polisakkaried van die pneumokokkus te bind. CRP word in die lewer vervaardig en bind aan fosforielcholie gedeeltes, wat 'n groot komponent van bakteriese selwande uitmaak. Na binding kan CRP komplement aktiveer, onafhanklik van antiligggame. Die bloedvlakke van CRP kan 10 - 100 voudig toeneem binne ure na die aanvang van 'n infeksie of inflammatoriese proses. Aangesien dit 'n relatiewe kort half-leeftyd het, kan dit uiters nuttig wees in die bepaling van infektiewe of inflammatoriese prosesse, en veral die reaksie op behandeling (Peakman & Verganis, 1997).

Fibronektien is 'n sirkulerende proteïen met die vermoë om bakterieë, veral staphylococci en streptococci te bind. Aangesien dit ook aan makrofage en monosiete kan bind, verhoog dit die verwydering van hierdie organismes. Fibronektienvlakke neem af tydens infeksie en kan ook, soos CRP, gebruik word in die bepaling van siekte, veral by vroeggebore babas waar die aangebore immuniteit van kardinale belang is (Peakman & Verganis, 1997).

Lisosiem is 'n bakteriese ensiem wat in saliva, transe en ander liggaamsvloeistowwe gesekreer word en ook in neutrofiel granules teenwoordig is. Dit kloof bakteriese selwand proteoglikane by 'n sekere punt en breek die bindings tussen N-asetielglukosamien en N-asetielmuraminiese suur (Peakman & Verganis, 1997).

1.1.6 SELLULÊRE MEGANISMES VAN AANGEBORE IMMUNITEIT

Daar is heelwat elemente van die sellulêre immuunsisteem wat teenwoordig en funksioneel met geboorte is. Die granulose - neutrofiele, eosinofiele en basofiele - is in die bloed teenwoordig en het die vermoë om in die weefsels in te migreer. Die mastselle is in die weefsels teenwoordig, veral by epiteeloppervlaktes, en word gekenmerk deur die teenwoordigheid van 'n groot aantal intra-sellulêre granules. 'n Vyfde sirkulerende sel tipe wat betrokke is in aangebore immuniteit is die NK selle, wat 'n meer gespesialiseerde funksie in beskerming teen virale infeksies en moontlik teen tumorselle het (Janeway & Travers, 1996).

Neutrofiele, eosinofiele en basofiele is betrokke in verskillende areas van die immuunreaksie. Neutrofiele is sleutelselle in die proses van doodmaak en verwydering van bakterieë en fungi, terwyl eosinofiele 'n predominante rol speel in die kontrole van infeksies met multisellulêre

parasiete. Basofiele en mastselle het 'n minder goed-gedefinieerde fisiologiese rol in immuniteit. Mastselle is betrokke in die meganisme van patologiese weefselkade (patogenesis) van die kliniese sindroom, bekend as allergie, 'n algemene immuun-gemedieerde siektetoestand. Terwyl die funksionele aktiwiteit van granulose en mastselle met die sel tipe varieer, kom al vier van hierdie verskillende selle se funksies tot uiting deur degranulasie en die vrystelling van ensieme en oksidante (Janeway & Travers, 1996).

Die volgorde van gebeure wat lei vanaf 'n granulose in die rustende staat na die voltooiing van sy rol in 'n immuunreaksie sluit in seining, aktivering, migrering vanaf die bloed en effektor funksie. Migrering in die weefsels, is 'n gerigte, eerder as 'n willekeurige, proses. Dit behels adhesie tussen reseptore op die granulose oppervlakte en die membrane van endoteelselle. Die adhesie molekules word ook gebruik deur limfoïedselle vir migrering (Janeway & Travers, 1996).

(i) Neutrofiele

Die neutrofiel het 'n polimorfiese kern, wat belangrik is vir die sel om vinnig vanaf die bloed deur nou spasies in die endoteel te beweeg. Die neutrofiel kom volop in die bloed voor en die halfleeftyd van die neutrofiel is 6 ure in die bloed en 1-2 dae in die weefsels. Die neutrofiele word opgeroep na streke van infeksie en inflammasie soos benodig. In die teenwoordigheid van bakteriese of fungiese infeksies word die neutrofiel geaktiveer om die indringende organismes te dood (Klebanoff & Clark, 1978).

Neutrofiele het 2 hoof tipes granules: die eerstes verskyn tydens hul ontwikkeling in die beenmurg (primêre granules) terwyl die tweede groep eers later verskyn (sekondêre granules). Beide primêre en sekondêre granules mag intrasellulêr of ekstrasellulêr vrygestel word na samesmelting met die plasmamembraan. Granules word gemobiliseer in reaksie op verskeie stimuli: die produkte van bakteriese selwande, komplement proteïene, die leukotriengroep van lipied mediatore en klein bio-aktiewe peptiede (sitokiene) (Klebanoff & Clark, 1978).

Die aktivering van neutrofiele vind plaas in reaksie op heelwat verskillende stimuli, waarvan die bekendstes seker die komplement komponent C5a, LTB₄, bakteriële peptiede en interleukien-8 (IL-8), is. Elk van hierdie word gewoonlik vrygestel by streke van infeksie en inflammasie. Neutrofiele moet beweeg na die betrokke streek in die weefsels voordat hulle 'n bydrae kan lewer. Dit benodig 'n mate van organisering aangesien die geaffekteerde orgaan die fokus van besering moet seën en aangesien die neutrofiel aan die spesifieke weefsel moet bind en aanheg

(Klebanoff & Clark, 1978).

Die oppervlakte tussen weefsel en bloed word deur endoteelselle gevorm. Weefselseine word uitgestuur deur die endoteelselle wat die post-kapillêre venules omlin, waar bloedvloei op sy laagste is. Weefselskade, veroorsaak deur infeksie of enige ander besering, lei tot die vrystelling van mediatore, soos histamien vanaf mast selle. Hierdie vrystelling lei tot dilatasie van bloedvate, met verhoogde 'lekking' en verdere verlaging in die bloedvloei tempo, wat die toeganklikheid vir neutrofiele na die streek verhoog. Neutrofiele het die neiging om selfs in rustende toestand liggies aan die endoteel te heg, wat die beweging vertraag. Meer spesifieke meganismes is egter nodig vir die neutrofiele om werklik te stop en uit die bloed uit te beweeg. Sitokiene wat vrygestel word vanaf beskadigde weefsel of geaktiveerde limfosiete veroorsaak dat die endoteelselle taai word sodat neutrofiele stewig aan die endoteelselle kan heg. Hierdie prosesse van stadige beweging oor die endoteel en aanhegting, behels 'n groep molekules waarna verwys word as die adhesie molekules. Taaiheid ontstaan as gevolg van die verhoogde uitdrukking van 'n familie van adhesie molekules op die endoteel. Die interaksie tussen komplementêre molekules op neutrofiele en endoteelselle lei tot adhesie van die neutrofiele en die geleentheid vir hulle om die weefsel binne te gaan (Klebanoff & Clark, 1978).

Die vermoë van neutrofiele om mikroörganismes in te neem (fagositose) en dood te maak, is 'n sleutelkomponent in die verdedigingsmeganisme van die gasheer. Neutrofiele het die vermoë om, tydens die proses van fagositose, meer as een bakterie of fungus op een slag in te neem. Wanneer 'n groot aantal fagosiete betrokke is in 'n infektiewe proses, mag 'n abses vorm wat met etter (dooie neutrofiele) gevul is. Wanneer die proses inflammatories en nie infektief van aard is nie, byvoorbeeld wanneer 'n vreemde liggaam in die weefsels ingeplant word, mag 'n sogenoemde 'steriele' abses vorm (Peakman & Vergani, 1997).

Fagositose is feitlik onmoontlik in die afwesigheid van opsoniëne, die ko-faktore wat mikro-organismes oortrek. Hierdie opsoniëne verhoog die vermoë van neutrofiele om hulle op te neem. Reseptore vir die opsoniëne is teenwoordig op die oppervlakte van die neutrofiel om 'n brug te vorm tussen sel en organisme. Opsoniëne is ook effektiewe aktiveerders van neutrofiele. Die beste opsoniëne is die komplement komponente, C3b en C5a, en antiliggaam. Die rol van antiliggame wat teen 'n spesifieke organisme gevorm word, is 'n goeie voorbeeld van die spesifieke immuunsisteem wat rigting gee aan die verworwe immuunsisteem (Klebanoff & Clark, 1978).

Fagositose word verkry deur die gebruik van pseudopodia. Hierdie strukture word uitgerek om 'n organisme of partikel te omring en uiteindelik te omsluit om 'n vakuool te vorm (fagosoom). Die intrasellulêre fagosoom kan nou saamsmelt met neutrofiel granules wat hul verterende en toksiese inhoud vrystel (fagolisosoom) om die inhoud van die fagosoom aan te val. Soms mag granule inhoud in die eksterne omgewing vrygestel word, byvoorbeeld wanneer 'n partikel te groot is om in te neem. Hierdie vrystelling, wat degranulasie genoem word, lei tot weefselskade (Klebanoff & Clark, 1978).

Die doodmaak van bakterieë en fungi is 'n baie kritieke eindresultaat van 'n kompleks van meganismes in die immuunreaksie. Daar bestaan twee anti-mikrobiese roetes, naamlik 'n suurstof-afhanklike en 'n suurstof-onafhanklike roete. Die suurstof-onafhanklike meganisme behels ensieme soos lisosiem. Twee suurstof-afhanklike meganismes is teenwoordig: die respiratoriese ontploffingsreaksie en die waterstofperoksied-miëloperoksied-halied sisteem. Die meer bekende een van die twee is die respiratoriese ontploffing. Die hoof toksiese metaboliete wat opgewek word om die bakterieë te dood, is (Mandell, 1974):

- * superoksied anioon ($O_2^{\bullet -}$)
- * waterstofperoksied (H_2O_2)
- * enkel suurstof ($^1O_2$)
- * hidroksiel radikaal ($OH^{\bullet}$)

Die hoofbestandele van die respiratoriese ontploffing, gevind in die sekondêre granules, is 'n membraangebonde kompleks van drie komponente: flavien adenien dinukleotied (FAD), quinolon, en 'n unieke sitochroom, sitochroom b_{558} (Peakman & Vergani, 1997).

Die waterstofperoksied-miëloperoksidasie-halied sisteem word deur miëloperoksidasie gekataliseer. Hier word H_2O_2 , wat opgewek word deur die respiratoriese ontploffing, met 'n halied soos Cl^- gekombineer om hipochloorsuur te lewer wat hoogs toksies is vir mikro-organismes (Peakman & Vergani, 1997).

(ii) Eosinofiele

Die eosinofiele maak ongeveer 3-5% van alle granulose in die sirkulasie uit. Daar is egter baie meer eosinofiele in die weefsels teenwoordig, waar hulle op epiteel oppervlaktes versamel en weke lank kan oorleef. Die hoofrol van eosinofiele in gasheer verdediging is in die beskerming teen multisellulêre parasiete soos wurms (helminthe), deur vrystelling van toksiese, kationiese

proteïene. Die eosinofiele lewer egter ook 'n belangrike bydra in allergiese toestande (Gleich & Adolphson, 1986).

Daar is twee hoof tipes granules in die eosinofiel, spesifiek en primêr. Die spesifieke granules domineer en bevat die kationiese proteïene, wat almal potensieel toksies vir helminte is. Die inhoud van die primêre granule is swak beskryf maar daar kan gesê word dat dit 'n belangrike rol speel tydens allergiese reaksies, veral asma toestande (Gleich & Adolphson, 1986).

(iii) **Mastselle en Basofiele**

Mastselle en basofiele het soortgelyke strukture en funksies in die weefsels en bloed. Die twee hoof eienskappe van hierdie selle is die histamien-bevattende granules en die teenwoordigheid van hoë-affiniteit reseptore vir IgE (in teenstelling met die lae-affiniteit tipe op eosinofiele) (Abbas *et al.*, 1994).

Die bekendste mediator van mastselle en basofiel mediatore is histamien, 'n lae-molekulêre-massa amien met 'n bloed halfleeftyd van minder as 5 minute en wat 10% van die sel se gewig uitmaak. Histamien het 'n groot uitwerking op die bloedvate en gladde spiere van die bronchi (Abbas *et al.*, 1994).

1.1.7 **VERWORWE IMMUNITEIT**

Die verworwe immuunreaksie besit die eienskappe van spesifisiteit, geheue en variërende intensiteit. Die verworwe en aangebore immuunreaksies presteer die beste wanneer hulle mekaar komplementeer. Antiligggame wat byvoorbeeld deur verworwe immuniteit gevorm word, het die vermoë om komponente van die aangebore immuunsisteem (neutrofiele, komplement, mastselle) te rig na relevante teikens (Peakman & Verganis, 1997).

(i) **Antigene**

Antigene word deur die immuunsisteem as vreemd beskou en veroorsaak 'n teenreaksie. Daar is drie elemente wat gebruik word in die binding en herkenning van 'n antigeen (Abbas *et al.*, 1994):

- * antiligggame
- * T-sel reseptore
- * Hoofverenigbaarheidskompleks (MHC)

Antiligggame word deur plasma selle opgewek. Dit is groot glikoproteïen strukture met herkenningstreke vir 'n gedeelte van 'n intakte antigeen. Die antiligggame-antigeen interaksie is vorm (konformasie) afhanklik. Antiligggame kan antigene bind wat vry in oplossing voorkom of wat op die oppervlakte van 'n sel of weefsel geheg is. Die gedeelte van die antigeen waarmee die antiligggame bind word 'n epitoot genoem. Hierdie gebied van die antigeen bepaal watter antiligggame sal bind en kan ook as 'n antigeen bepaler bekend staan (Jefferis & Pound, 1992).

T-sel reseptore is die tweede tipe reseptore vir antigene. Hierdie reseptore word op T limfositie gevind en is ook, soos antiligggame, groot glikoproteïene. Daar is egter belangrike verskille tussen die twee. T-sel reseptore bind nie met hele intakte antigene nie, maar met 'n kort segment van aminosure (peptied antigeen), wat deur proteolise vanaf die intakte antigeen afkomstig is. Binne 'n sekere antigeen word dit die T-sel epitoot genoem. 'n Verdere verskil is dat die T-sel reseptor nie met oplosbare peptied antigeen direk kan bind nie. Die antigeen moet deur 'n ander glikoproteïen molekule gehou en aangebied word. Hierdie molekule is die derde element van die immuunsisteem wat antigeen bind, naamlik die MHC molekule. MHC molekules hou die peptied antigene binne in 'n groef. Die T-sel reseptor herken hierdie kombinasie van vorms wat gevorm word deur die peptied antigeen en die wande van die groef in die MHC molekule staan (Jefferis & Pound, 1992).

Antigene, intakt sowel as kort peptiede, bind omkeerbaar met hierdie drie tipes reseptore deur nie-kovalente kragte, soos waterstofbinding, elektrostatiese aantrekking en van der Waals kragte. Antiligggame het die hoogste affiniteit vir antigene terwyl die T-sel reseptor die laagste affiniteit vir antigene besit. Antiligggame het minstens twee bindingstreke om antigene te bind, terwyl sommige tot 10 sulke bindingstreke besit. Daar bestaan 'n buigbare skanier tussen die bindingstreke en kan daarom onder sekere omstandighede meer as een bindingstreke gebruik, byvoorbeeld wanneer 'n antigeen homself herhaal as deel van die omlyning van 'n bakterie. Dit versterk die algehele sterkte van binding, in vergelyking met wanneer 'n enkele streke gebruik word staan (Jefferis & Pound, 1992).

(ii) Antiligggame

Antiligggame behoort tot 'n groep van groot polipeptiede wat immunoglobulene genoem word. Alle antiligggame is immunoglobulene, maar nie alle immunoglobulene het noodwendig antigeen-bindings eienskappe nie. Die biologiese funksies van antigene in die verdediging van die gasheer is as volg (Peakman & Verganis, 1997):

- * identifisering van infektiewe organismes
- * oproep van gasheer effektor meganismes
- * neutralisering van toksiene
- * verwydering van vreemde antigene vanuit sirkulasie

Antiliggame aktiveer 'n hele aantal immuun effektor funksies wat 'n belangrike rol in gasheer se verdediging teen siekte speel (Peakman & Verganis, 1997):

- * komplement aktivering
- * stimulering van fagositose en vernietiging deur polimorfonukleêre selle
- * oproep van NK selle met reseptore vir antiliggame
- * aktivering van mastselle

Primêre en sekondêre antiliggam reaksies

Wanneer antigene vir die eerste keer in 'n dier ingespuut word, kan verskillende waarnemings gemaak word. Die antiliggam reaksie kan 5-10 dae na antigeen uitdaging, waargeneem word, waarna dit toeneem oor die volgende 10-20 dae. Na ongeveer 20 dae na die uitdaging begin die antiliggam vlakke daal, maar dit verdwyn nooit heeltemal nie. Indien dieselfde antigeen verskeie weke later toegedien word, vind die antiliggam reaksie vinniger plaas, bereik 'n hoër piek en daal weer tot 'n hoër basislyn vlak as voorheen. Hierdie twee reaksies verskil dus beide kwalitatief en kwantitatief en staan bekend as primêre en sekondêre antiliggam reaksies. Indien 'n ander antigeen met die tweede uitdaging gegee word, word 'n primêre reaksie tot daardie antigeen waargeneem. Die sekondêre antigeen is daarom antigeen-spesifiek, en demonstreer die verwerwing van geheue in die immuunreaksie (Peakman & Verganis, 1997).

Die kwalitatiewe verskille tussen primêre en sekondêre reaksies strek verder as net die spoed waarmee die antiliggame verskyn. Die primêre reaksie word hoofsaaklik waargeneem as antiliggame van die IgM immunoglobulien klas. IgG antiliggam wat spesifiek is vir dieselfde antigeen begin eers verskyn aan die einde van die primêre reaksie. Die sekondêre antiliggam reaksie bestaan egter hoofsaaklik uit IgG klas antiliggame. Die IgG in die sekondêre reaksie het ook 'n hoër affiniteit vir antigeen as antiliggam in die primêre reaksie (Peakman & Verganis, 1997).

Koloniteit in antiliggamreaksie

Plasmaselle, die eindstadium van B limfosiet differensiasie, produseer en sekreer

immunoglobuliene. 'n Enkele plasmasele produseer 'n enkele antiliggam, met een swaar ketting tipe, en een ligte ketting tipe, en een konformasie van antigeen-bindingstreek. Dit staan as 'n monoklonale antiliggam bekend. Meeste antiliggam reaksies tot makromolekulêre antigene behels die binding aan veelvuldige epitope op die antigeen. Elke epitop mag deur meer as een antiliggam molekules gebind word. Dit word 'n poliklonale antiliggam genoem (Peakman & Verganis, 1997).

(iii) Die CD klassifikasie

Limfositete, monositete, granulositete en ander selle het oppervlakreseptore en molekules wat uiters belangrik is in die hele reeks van immunologiese funksies: sel-sel seining, sel aktivering, hormoon-reseptor seining en baie ander. Die oppervlaktes van immuunselle is letterlik oortrek met sulke proteïene. Verskillende selle met sekere funksies het onderskeidende oppervlakproteïene, terwyl ander molekules algemeen vir verskeie seltepes sal wees. 'n Groot deurbraak in die definiëring van oppervlakmolekules het in die 1970's plaasgevind met die ontwikkeling van monoklonale antiliggam in die laboratorium. Monoklonale antiliggam is proteïene met 'n spesifieke struktuur om aan 'n sekere teiken te bind. Dit word gewoonlik opgewek deur die teikenproteïen in muise in te spuit. Navorsers het gedurende die 1970's en 1980's monoklonale antiliggam opgewek deur muise met ru-ekstrakte in te spuit wat vanaf verskillende tipes immuunselle gemaak is. Sommige van die monoklonale antiliggam wat verkry is, het die vermoë gehad om aan strukture te bind op die oppervlakte van die teikenselle. Dit kan gebruik word as gereedskap om populasies van limfositete met verskillende funksies te identifiseer, sowel as neutrofiel en monositete (Peakman & Verganis, 1997).

Aangesien heelwat verskillende oppervlakproteïen op verskeie selle geïdentifiseer is, is 'n nommer toegeken aan die monoklonale antiliggam volgens die groep van differensiasie waaraan hulle bind. 'n Groep van differensiasie is dus 'n oppervlakmolekule wat gevind word op selle volgens hulle afkoms en differensiasie en identifiseerbaar deur een of meer monoklonale antiliggam (Peakman & Verganis, 1997).

(iv) B limfositete

B limfositete word in die beenmurg gevorm. B limfositete kan van T limfositete onderskei word deur lig en elektronmikroskopie. Dit word die beste geïdentifiseer deur oppervlak proteïenstrukture, veral oppervlak immunoglobulien; CD19, CD20, CD21; klas II MHC molekules; CD40, CD23 (Peakman & Verganis, 1997).

B limfosiete is 'n komponent van die verworwe immuunreaksie, wat die twee kardinale eienskappe van spesifisiteit en geheue het. Die hoof funksies van B limfosiete is:

1. Om antiligaamproduksie teen teiken antigene, met behulp van T-selle, te verseker
2. Om antigene aan T limfosiete aan te bied en seine vir T limfosiet aktivering te verskaf

(Peakman & Verganis, 1997).

(v) T limfosiete

Die T-sel word onderskei deur die teenwoordigheid van 'n reseptor vir 'n spesifieke antigeen (T-sel reseptor). 'n Kompleks van molekules, genoem CD3 is betrokke in die oordrag van antigeen-spesifieke aktiveringseine deur die T-sel reseptor. Die oppervlakmerkers van T-selle speel 'n sleutelrol in die fisiologie van die sel-bemiddelde immuunsisteem. Ongeveer twee-derdes van totale T-selle ($CD4^+$ T-selle) druk 'n oppervlak glikoproteïen nl. CD4 uit, en aangesien hierdie selle jare gelede geïdentifiseer is om immuunreaksies, soos antiligaamproduksie, te bevorder, staan hulle ook as T helper selle bekend. Die oorblywende derde van T-selle druk nie CD4 uit nie, maar 'n verwante glikoproteïen, nl. CD8. T-selle wat CD8 uitdruk (gewoonlik genoem $CD8^+$ T-selle) word met funksies soos die vermoë om immuunreaksies te onderdruk en teikenselle te dood, geassosieer, vandaar die naam T onderdrukker/sitotoksiese selle (Paul, 1992).

T-sel aktivering is 'n belangrike deel van enige sellulêre immuunreaksie. Verskeie seloppervlakte molekules wat nie tipies op rustende selle uitgedruk word nie, word geïnduseer na aktivering deur antigeen of 'n kunsmatige stimulus. Dit sluit onder andere die reseptor vir interleukien-2 (IL-2R), die transferrien reseptor en klas II MHC molekules, in (Paul, 1992).

T limfosiete beïnvloed die meeste aspekte van immuniteit. Die meeste van hierdie invloed word verkry deur die sekresie van sitokiene, alhoewel direkte sel-sel interaksie met B-selle ook belangrik is die volwassewording van antiligaam reaksies. Die belangrikste funksies van T-selle is soos volg (Paul, 1992):

- * Sekresie van sitokiene wat verantwoordelik is vir groei en differensiëring van 'n reeks selteipes, insluitende ander T-selle, makrofage en eosinofiele.
- * Differensiëring van B limfosiete in plasma selle of geheue selle.
- * Oproep en aktivering van mononukleêre fagosiete.
- * Oproep en aktivering van gespesialiseerde sitotoksiese T-selle in antivirale reaksies.
- * Regulering van immuunreaksies.

Bykomend tot die T-sel reseptore wat met spesifieke antigene bind, is daar verskeie ander seloppervlak molekules wat 'n kritiese rol in T limfosiet funksies speel. Sommige van die molekules (byvoorbeeld die CD3 kompleks) is uiters noodsaaklik vir T-sel funksie. Ander molekules is weer nodig in die stabilisering van sel-sel interaksies, terwyl ander belangrik is vir die verskaffing van aktiveringseine. Sommige van hierdie molekules, soos CD4 en CD8, word permanent uitgedruk en ander, soos CD28, verskyn slegs wanneer die T-selle geaktiveer word. In kliniese laboratorium praktyke word daar van monoklonale antiligggame, met die vermoë om die verskillende T-sel-geassosieerde molekules te identifiseer, gebruik gemaak om die totale T-sel populasie onder te verdeel. Dit is veral belangrik in die diagnose van immuungebrek siektes, soos verworwe immuungebrek siekte (VIGS). In hierdie siekte word die CD4-uitdrukkingselle selektief afgebreek teen 'n tempo wat korreleer met die vordering van die siekte (Paul, 1992).

CD4 is 'n transmembraan glikoproteïen van 55 kDa wat as 'n monomeer uitgedruk word en 'n lid van die immunoglobulien supergeen familie is. Die funksie van hierdie molekules is die verskaffing van adhesie kragte tussen bindende selle asook die verskaffing van 'n bykomende aktiveringsein. CD4 het 'n spesifieke affiniteit vir die klas II MHC molekules. Sonder CD4 sal die T-sel reseptor-peptied antigeen-MHC molekules assosiasie, wat 'n relatiewe lae affiniteit het, nie voldoende sekuur kan wees vir T-sel aktivering om plaas te vind nie (Peakman & Verganis, 1997).

In teenstelling met die CD4 molekule is die CD8 molekule 'n disulfied-gebonde dimeer. Die twee komponente mag beide α kettings, van 32 kDa, of 'n α ketting gekombineer met 'n β ketting van 34 kDa, wees. Elke ketting het 'n enkele immunoglobulien-agtige domein. Die CD8 molekules het 'n soortgelyke funksie as CD4 maar bind egter deur die α ketting aan die α_3 domein van die klas I MHC molekules, om T-sel interaksies met selle wat antigeen voorlê deur die klas I MHC molekules, te stabiliseer (Peakman & Verganis, 1997).

(iv) Identifisering en telling van immuunselle deur vloeisitometrie

Dit is dikwels nodig in beide navorsing en kliniese praktyk om sel subklasse te identifiseer en te tel. Identifikasie maak van drie items gebruik, naamlik, 'n differensiasie-spesifieke seloppervlakte molekule (byvoorbeeld CD20 vir B-selle), 'n muis monoklonale antiliggaam wat spesifiek is vir die molekule saam met 'n antiliggaam gerig teen muis globuliene en waaraan daar 'n fluoro-chroom gebind is wat fluoreseer by 'n spesifieke golflengte wanneer dit blootgestel word

aan 'n opwekkende ligbron. Fluorochrome wat algemeen gebruik word is fluoresien, fikoëritrien en Texas rooi, wat onderskeidelik groen, oranje en rooi fluoreseer. Die gemerkte selle moet dan geïdentifiseer en getel word. Hierdie proses is tradisioneel eers deur mikroskopie gedoen, maar word deesdae met behulp van 'n vloeisitometer uitgevoer. In 'n vloeisitometer word die selle geïdentifiseer deur die manier waarop hulle lig in 'n voorwaartse rigting (afhangende van die selgrootte) en teen 90° (afhangende van sitoplasmiese granulariteit), versprei. 'n Groot, granulêre sel, soos 'n neutrofiel, sal 'n hoë graad van ligverspreiding in beide 'n voorwaartse rigting en teen 'n 90° hoek, toon. 'n Klein, agranulêre sel, soos 'n limfosiet, sal weer tot 'n mindere mate ligverspreiding in 'n voorwaartse rigting en teen 'n 90° hoek, veroorsaak. Die vraag kan dan gevra word of die sel ook deur die monoklonale antiliggaam wat gebruik is, gebind is. Drie tot vier verskillende fluorochrome kan gelyktydig gebruik word. Daar kan byvoorbeeld onderskei word of die limfosiet 'n T-sel (deur van monoklonale anti-CD3 antiligggame gebruik te maak), 'n T-helper sel (deur van anti-CD4 antiligggame gebruik te maak) of 'n sitotoksiese T limfosiet (deur van anti-CD8 antiligggame gebruik te maak) is (Peakman & Verganis, 1997).

1.2 DIE INVLOED VAN OKSIDANTE EN ANTIOKSIDANTE OP DIE IMMUUNSISTEEM

1.2.1 VRYE RADIKALE

(i) Die ontstaan en voorkoms van vrye radikale

In die struktuur van atome en molekules bestaan elektrone gewoonlik in pare. Die pare beweeg binne 'n definitiewe spasie rondom die kern. Hierdie spasie staan bekend as 'n atomiese of molekulêre orbitaal (Halliwell, 1994). Chemiese verbindings wat twee of meer elemente bevat, word deur 'n chemiese verbinding gebind. In die meeste gevalle is daar negatief-gelaaide elektrone in die binding betrokke. Die rangskikking van die elektrone bepaal die stabiliteit van die verbinding. 'n Stabiele verbinding het gepaarde elektrone. Wanneer 'n elektron ongepaard is, word die molekules meer reaktief en onstabiel as die oorspronklike verbinding. 'n Ongepaarde elektron is enige elektron wat alleen in 'n orbitaal voorkom (Halliwell, 1994). 'n Verbinding of element met een of meer ongepaarde elektrone, wat onafhanklik kan voortbestaan, word 'n vrye radikaal genoem (Bendich, 1990; Karlmark, 1993; Halliwell, 1994 & Nockels, 1996).

Vrye radikale word onder andere in die mitochondria, lisosome, peroksisome, nukleus, endoplasmiese retikulum en plasma membrane gevorm. Vrye radikale en hul produkte is ook in die sitosol aanwesig (Bendich, 1990).

Die vrye radikaal onttrek 'n elektron vanaf 'n stabiele verbinding met die doel om homself te stabiliseer. 'n Nuwe vrye radikaal word nou in die proses gevorm. Hierdie kettingreaksie sal voortgaan totdat die vrye radikaal wat die ongepaarde elektron bevat, aan 'n ander molekule met 'n ongepaarde elektron, verbind, of gedeaktiveer word deur 'n antioksidant. Daar is ook sekere vrye radikaal ensieme wat die ontbinding van reaktiewe molekules, die voorlopers van vrye radikale, vergemaklik. Hierdie ensieme kan dus die vrye radikaal las verlig voordat 'n kettingreaksie aan die gang gesit word (Bendich, 1990).

Suurstof-bevattende reaktiewe molekules (waarvan sommige vrye radikale is), is krities vir biologiese sisteme. Aangesien suurstof benodig word vir die lewensvatbaarheid van selle, is dit noodsaaklik dat meganismes beskikbaar is om die reaktiewe suurstof intermediêre, wat tydens sellulêre respirasie geproduseer word, te beheer. Soos gesien kan word in 1.1, is daar drie

hoofreaksies wat lei tot die vorming van suurstof spesies wat meer reaktief as molekulêre suurstof is (Bendich, 1990).

1)	$O_2 + \text{energie}$	$\rightarrow$	$O_2^{\bullet}$ (enkelsuurstof)
2)	$O_2 + 4 e^- + 4 H^+$	$\rightarrow$	$2 H_2O$ (mitochondriale elektron vervoersisteem)
3a)	$O_2 + e^-$	$\rightarrow$	$O_2^{\bullet -}$ (superoksied radikale anioon)
3b)	$2 O_2^{\bullet -} + 2 H^+$	$\rightarrow$	$O_2 + H_2O_2$ (waterstof peroksied)
3c)	$O_2 + 2 e^- + 2 H^+$	$\rightarrow$	H_2O_2
3d)	$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 + 4 H^+$	$\rightarrow$	$O_2 + H_2O + OH^{\bullet}$ (hidroksiel radikaal)

Figuur 1.1. Reaksies met suurstof wat lei tot meer reaktiewe spesies as suurstof

(ii) Fisiologiese meganismes vir die produksie van vrye radikale

- * **Homolise** - 'n Kovalante binding word gebreek om een elektron aan beide die dele te lewer.
- * **Radiolise** - Radioaktiewe bestraling, sowel as X-strale, deel water onder die vorming van vrye radikale.
- * **Fotolise** - Fotosensitisering, soos riboflavin, bilirubin, porfiriene en farmaseutiese middels soos sulfoonamiede en diuretiese middels, absorbeer energie wat suurstof opwek tot 'n hoogs reaktiewe radikaal. Ultraviolet, sowel as infrarooi lig, kan ook vrye radikale induseer.
- * **Redoksprosesse** - Hierdie prosesse sluit elektronoordraers in wat vrye radikale kan skep en neutraliseer (Karlmark, 1993).

Eksogene bronne soos bestraling, tabakrook, sekere organiese oplosmiddels, narkose, hiperoksied omgewings, sekere medikasies en plaagdoders kan vrye radikale in die liggaam produseer en oksidatiewe skade aan teikenweefsels soos die lewer en die longe veroorsaak (Bendich, 1990).

Hidroksiel Radikaal

Die chemiese reaktiwiteit van vrye radikale verskil. Een van die mees reaktiewe vrye radikale is hidroksiel radikaal ($\text{OH}^\bullet$). Blootstelling van lewende organismes aan geïoniseerde bestraling veroorsaak deling van O-H bindings in water: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet$.

Hidroksiel radikale reageer teen 'n diffusie-beheerde tempo met byna alle molekules in lewende selle. Wanneer $\text{OH}^\bullet$ *in vivo* gevorm word, beskadig dit slegs alles in sy direkte omgewing, aangesien $\text{OH}^\bullet$ nie betekenisvolle afstande binne die sel kan beweeg nie. Die meeste van die skade wat toegeskryf kan word aan oormatige blootstelling van 'n lewende organisme aan geïoniseerde bestraling, kan veroorsaak word deur die aanval van $\text{OH}^\bullet$ op proteïene, koolhidrate, DNA en lipiede (Halliwell, 1994).

Salpeteroksied

Waar $\text{OH}^\bullet$ feitlik altyd skadelik is, is daar ander minder reaktiewe vrye radikale wat selfs nuttig in die liggaam kan wees. $\text{NO}^\bullet$ word geproduseer vanaf die aminosuur L-arginien deur vaskulêre endoteelselle, fagosiete, sekere breinselle en baie ander sel tipes. $\text{NO}^\bullet$ is 'n vasodilator en moontlik 'n belangrike neurotransmitter. Dit mag ook betrokke wees by die vernietiging van parasiete deur makrofage in sekere soogdierspesies (Halliwell, 1994).

Superoksied

Wanneer suurstof blootgestel word aan 'n bron van hoë energie, byvoorbeeld ultra-violet lig, word die energie oorgedra om 'n enkelsuurstof te vorm (reaksie 1 in Figuur 1.1). Enkelsuurstof bevat steeds 'n elektronpaar en kan daarom nie as 'n vrye radikaal beskou word nie. Hierdie twee elektrone is egter in 'n onstabiele konformasie in die molekule en kan dus deelneem in reaksies wat vrye radikale produseer (byvoorbeeld die superoksied radikaal) (Bendich, 1990).

Superoksied radikale word deur fagositiese selle (neutrofiele, monosiete, makrofage, eosinofiele) geproduseer en help om bakterieë en ander patogeniese organismes te inaktiveer (Bendich, 1990 en Halliwell, 1994). Die proses waar molekulêre suurstof deur die fagosiete (veral neutrofiele) opgeneem word en reaktiewe suurstof-bevattende molekules opwek met stimulasie, word dikwels na verwys as die oksidatiewe of respiratoriese ontploffing (Bendich, 1990). Dit wil nou voorkom asof superoksied ook deur ander sel tipes as fagosiete, soos limfosiete en fibroblaste, geproduseer word. Superoksied kan ook deur "outo-oksidasie" reaksies geproduseer word wanneer verbindinge soos katecholamiene, tetrahydrofolate en gereduseerde flaviene direk met suurstof reageer om $\text{O}_2^{\bullet -}$ te vorm. 'n Klein persentasie superoksied mag verder ook in die mitochondria vorm tydens die elektron transportketting (Halliwell, 1994). Meer as 98% van

suurstof wat deur selle benut word, word doeltreffend gereduseer deur die elektron transportsisteem (reaksie 2 in Figuur 1.1). Die oorblywende suurstof is egter beskikbaar vir elektron reduksie, wat lei tot die vorming van die superoksied radikaal (reaksie 3a in Figuur 1.1) en waterstofperoksied (reaksie 3b of 3c in Figuur 1.1). Hierdie twee produkte kan reageer om water te lewer, maar in die proses word die hoogs reaktiewe hidroksiel radikaal egter gevorm (Bendich, 1990).

Enkelsuurstof kan gedeaktiveer word en daardeur verhoed word om die superoksied radikaal te vorm. Hierdie proses word enkelsuurstof demping genoem. Hierdie demper versprei energie wat in die enkelsuurstof molekule bevat word sodat dit nie oor voldoende energie beskik om deel te neem aan die superoksied-produiserende reaksies nie. Die mees effektiewe, natuurlike enkelsuurstof demper is beta-karoteen (Bendich, 1990).

(ii) Oksidatiewe spanning

Aangesien die produksie van reaktiewe suurstofspesies en antioksidant verdediging ongeveer gebalanseerd is, is dit maklik om hierdie balans te versteur in die guns van die reaktiewe suurstofspesies om oksidatiewe spanning te veroorsaak. Oksidatiewe spanning kan ontstaan vanaf:

- * 'n tekort aan antioksidante weens wanvoeding
- * 'n oorproduksie van reaktiewe suurstofspesies deur blootstelling aan verhoogde O_2 konsentrasies
- * die teenwoordigheid van toksiene wat gemetaboliseer word om vrye radikale te produseer
- * oormatige aktivering van die “natuurlike” radikaal-produiserende sisteme (bv. ooraktivering van fagosiete tydens kroniese inflammatoriese siektes) (Halliwell, 1994).

Selle kan matige oksidatiewe spanning verduur, wat dikwels lei tot 'n verhoogde sintese van antioksidant verdedigingsisteme in 'n poging om die balans te herstel. Wanneer rotte byvoorbeeld geleidelik geakklimatiseer word aan verhoogde O_2 konsentrasies, kan hulle vir 'n veel langer periode suiwer O_2 verduur as kontrole rotte, skynbaar as gevolg van verhoogde sintese van antioksidant verdedigingsensieme en glutatioon in die longe (Frank *et al.* 1989 & Iqbal, 1989). Ernstige oksidatiewe spanning kan egter selmetabolisme tot 'n groot mate versteur, insluitend breking van DNA bande, verhoging in intrasellulêre “vrye” Ca^{+} , skade aan membraanvervoer ione en/of ander spesifieke proteïene en peroksidase van lipiede. Oksidatiewe spanning mag ook lei tot die vrystelling van oordrag metaalione (soos Fe^{2+} vanuit mitochondria)

wat vorming van $\text{OH}^\bullet$ kan bevorder. H_2O_2 kan ook hemoglobien, mioglobien en moontlik ander heem proteïene afbreek om Fe^{2+} ione vanaf die heemring vry te stel (Halliwell, 1994).

(iii) Gevolge van vrye radikale

Die onversadigde bindings in die lipiede van sellulêre membrane, is hoof teikens vir vrye radikaal reaksies deur die proses van lipiedperoksidasie. Gevolglik is daar 'n verlies van membraanvloeibaarheid en reseptor rangskikking, met potensiële sellulêre afbraak (Bendich, 1990). Volgens Nockels (1996) is weefselmembraan skade een van die gevolge van 'n ophoping van vrye radikale. Die vernietiging van membrane lei tot uitlekking van ensieme vanuit selle wat dan die sirkulasie binnegaan. Die ensieme kreatien kinase en laktaat dehidrogenase word dikwels gebruik om weefselskade te voorspel.

Die beskadiging van die swawel bevattende ensieme en ander proteïene deur vrye radikale, lei tot inaktivering, kruisbindings en denaturering. Nukleïensure kan aangeval word en gevolglike veranderinge aan proteïene, ensieme en hormone kan nadelig wees vir die hele organisme (Karlmark, 1993). Skade aan die DNA kan mutasies veroorsaak wat karsinogenies mag wees. Oksidatiewe skade aan koolhidrate kan enige van die sellulêre reseptorfunksies verander, insluitende dié wat geassosieer word met interleukien aktiwiteite en prostaglandien vorming. Voorbeelde van weefsel en orgaanskade wat geassosieer word met vrye radikaal reaksies, sluit die vernietiging van endoteelselle wat die bloedvate omlyn, in, met gevolglike makrofaag indringing. Die inflammatoriese reaksies van artritis gewrigte, versnelling van die verouderingsproses en die vernietiging van longweefsel is ook voorbeelde hiervan (Bendich, 1990).

Die normale verouderingsproses sluit heel moontlik lipiedperoksidasie in. Hierdie teorie word ondersteun deur bevindings dat diere met 'n hoë relatiewe suurstofverbruik 'n korter lewe het. Hul lewensduur verhoog verder skynbaar met die byvoeging van antioksidante. Die voorkoms van superoksied dismutase in hierdie diere is positief gekorreleerd met hul lewensduur (Karlmark, 1993).

(iv) Chemiluminessensie vir die bepaling van $\text{O}_2^{\bullet -}$ en H_2O_2

Die luminessensie van luminol en lusigenien word gereeld gebruik vir die opsporing van superoksied en waterstofperoksied in biologiese sisteme. Dit is nie die luminol en lusigenien self wat met superoksied reageer nie, maar eerder die univalente geoksideerde vorm van luminol en

die univalente gereduseerde vorm van lusigenien. In beide gevalle hang ligproduksie af van die vorming van 'n onstabiele endoperoksied of dioksi-etaan, wat afgebreek word na 'n elektronies opgewekte produk, wat 'n proton vrystel wanneer dit na grondvlak val (Faulkner & Fridovich, 1993).

Luminol

In gebufferde waterige oplossings kan die luminessensie van luminol voortgebring word deur 'n verskeidenheid van oksidante, op voorwaarde dat suurstof beskikbaar is. Oksidasie van luminol met jodium, met H_2O_2 plus 'n peroksidase of by die anode van 'n elektrochemiese sel, lei dus alles tot 'n suurstof-afhanklike luminessensie (Faulkner & Fridovich, 1993).

Luminol is nie 'n betroubare aanwyser van superoksied nie, aangesien, in die teenwoordigheid van enige univalente oksidant, kan dit optree as 'n bron van superoksied. In die geval van xantien oksidase plus xantien, is die univalente oksidant $\text{HO}^\bullet$ of Fe(II)-O , opgewek deur die yster gekataliseerde interaksie van $\text{O}_2^{\bullet-}$ met H_2O_2 . In die geval van geaktiveerde neutrofiële is die univalente oksidant myeloperoksidase plus H_2O_2 . 'n Ander rede waarom luminol nie as 'n geskikte aanduider van $\text{O}_2^{\bullet-}$ beskou kan word nie, is sy swak kwantum opbrengs in die neutrale pH gebied (Faulkner & Fridovich, 1993).

Lusigenien

Die chemiluminessensie van lusigenien, soos dié van luminol, behels die reaksie van $\text{O}_2^{\bullet-}$ met 'n radikale vorm van die lusigenien. Daar is egter 'n belangrike verskil in die sin dat die reaktiewe radikaal vorm van luminol geproduseer moet word deur univalente oksidasie, terwyl in die geval van lusigenien word die radikale opgewek deur univalente reduksie (Faulkner & Fridovich, 1993).

1.2.2 ANTIOKSIDANTE

Alle organismes lei onder blootstelling aan $\text{OH}^\bullet$, aangesien dit opgewek word deur homolitiese deling van O-H bindings in water, aangedryf deur agtergrond geïoniseerde bestraling. Byna alles in lewende organismes reageer met $\text{OH}^\bullet$ teen 'n tempo van $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sekonde}^{-1}$, sodat botsing van $\text{OH}^\bullet$ met die molekules amper altyd tot 'n reaksie lei. Wanneer $\text{OH}^\bullet$ eers gevorm is, kan skade deur hierdie radikaal moontlik nie vermy word nie. 'n Groot gedeelte van die liggaam se antioksidant verdedigings dien om enige verdere produksie van $\text{OH}^\bullet$ te beperk (Halliwell, 1994).

Daar bestaan verskeie natuurlike verbindings wat vrye radikale kan inaktiveer. Antioksidante het die vermoë om die vrye radikaal las te verlig. Vrye radikaal reaksies kan in drie stadiums ingedeel word, nl. aanvang, voortplanting en terminering. Antioksidante kan die opwekking van vrye radikale tydens enige van hierdie stadiums beïnvloed (Bendich, 1990).

(i) Mineraal-bevattende antioksidant ensieme

Daar is twee tipes superoksied dismutases, nl. 'n Mn-bevattende ensiem in mitochondria, en 'n Cu/Zn-bevattende ensiem in die sitoplasma. Volgens Halliwell (1994) het hierdie ensieme die vermoë om $O_2^{\bullet -}$ vier maal vinniger te verwyder by 'n pH van 7.4, deur dit na H_2O_2 om te skakel. Aangesien die superoksied dismutase ensieme H_2O_2 produseer, werk dit nou saam met H_2O_2 – verwyderingsensieme. Katalase is 'n Fe-bevattende ensiem wat in peroksisome gevind word en die afbraak van waterstofperoksied kataliseer. Die eindprodukte van waterstofperoksied afbraak is suurstof en water. Hierdie ensieme verlaag die potensiaal vir die vorming van die hoogs reaktiewe hidroksiel radikaal en ander opgewekte, suurstof-bevattende spesies (Bendich, 1990; Halliwell, 1994 & Nockels, 1996).

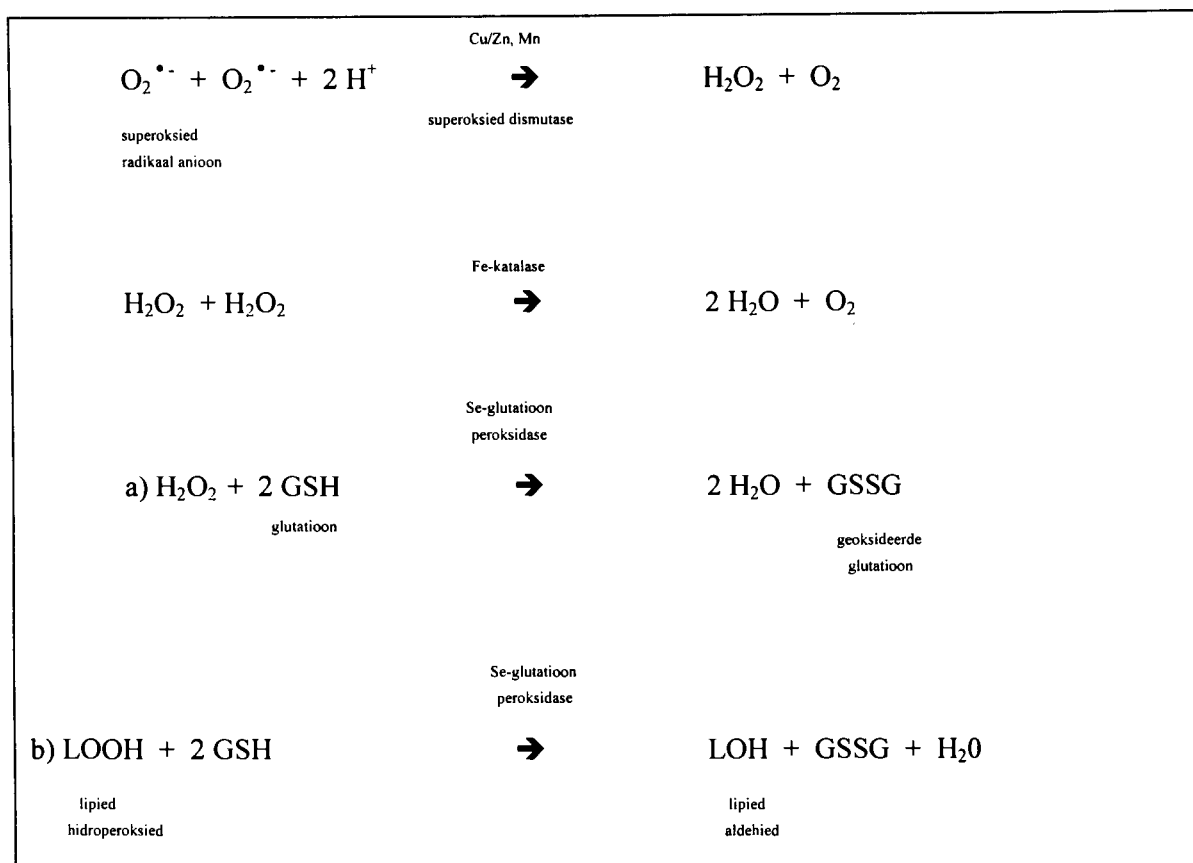
Die belangrikste H_2O_2 – verwyderingsensiem in soogdiere is egter die selenoproteïen, glutatioon peroksidase (GSHPx) ensieme. Selenium is 'n essensiële komponent van hierdie ensiem. GSHPx is belangrik in die afbraak van waterstof peroksied en lipied peroksiedes deur gereduseerde glutatioon (GSH) te oksideer na geoksideerde glutatioon (GSSG). Glutatioon reduktase, 'n flavoproteïen ensiem (FAD-bevattend), regeneer GSH vanaf GSSG, met NADPH as 'n bron van reduserende krag (Bendich, 1990; Karlmark, 1993; Halliwell, 1994 & Nockels, 1996). Se-afhanklike glutatioon peroksidase kan ook lipied peroksiedes na alkohole omskakel (Nockels, 1996).

'n Se-onafhanklike GSHPx (glutatioon S-transferase) is geïdentifiseer (Lawrence *et al.*, 1978). Die aktiwiteit van hierdie ensiem verhoog tydens selenium tekort en mag gedeeltelik kompenseer vir die afname van selenium-afhanklike GSHPx tydens lae selenium toestande.

Die essensiële mineraal nutriënte kan nie as antioksidante beskou word voordat dit nie in die antioksidant ensieme ingesluit is nie (Bendich, 1990).

Die hoeveelheid en funksie van hierdie ensieme mag nie alleen deur kwantiteit van die mineraal beïnvloed word nie, maar ook deur proteïen beskikbaarheid. Sink en koper word gebind aan die

proteïene metallothionien en serruloplasmien, onderskeidelik, wat antioksidant vermoëns besit (Nockels, 1996).



Figuur 1.2. Reaksies waarby die antioksidant ensieme betrokke is (Bendich, 1990)

(ii) Antioksidant vitamien

Vitamien E (α -tokoferol) is die belangrikste vetoplosbare antioksidant wat in alle sellulêre membrane teenwoordig is. Dit inhibeer lipied peroksidase van lae-digheids lipoproteïene (LDL) deur peroksiel radikale te vernietig (Bendich, 1990; Karlmark, 1993 & Halliwell, 1994).

Vitamien C (askorbiensuur), is wateroplosbaar en kan saam met vitamien E vrye radikale en enkelsuurstof, demp. Askorbiensuur kan egter 'n pro-oksidant in die teenwoordigheid van die metaalione, Fe en Cu, wees. Aangesien sulke metaalione egter in baie beperkte hoeveelhede in die liggaam voorkom, is die antioksidant eienskappe van askorbaat oorheersend. Askorbaat kan egter toksies wees in pasiënte wat 'n oordosis Fe inneem. Tydens siektes en beserings kan Fe en

Cu meer beskikbaar raak sodat die pro-oksidant eienskappe van askorbiensuur nie geïgnoreer kan word nie (Bendich, 1990 & Halliwell, 1994).

Die hoof voorloper van vitamien A (retinol), β -karoteen, is 'n doeltreffende demper van enkelsuurstof en kan ook as 'n antioksidant optree (Bendich, 1990). Daar is gevind dat β -karoteen limfosiet blastogenese verhoog en neutrofiel fagositose en vernietigingsvermoë stimuleer tydens pre partum en droë periodes by koeie (Nockels, 1996). Vitamien A en β -karoteen is skynbaar meer potent by 'n lae suurstofdruk, in vergelyking met die meeste ander antioksidante wat hoofsaaklik tydens 'n hoë suurstofdruk voordelig is (Karlmark, 1993). Ander kartoëiede, sonder pro vitamien A aktiwiteit, kan ook as antioksidante optree (Nockels, 1996).

Riboflaviën maak deel uit van die ensiem glutatioon reduktase wat belangrik is in die regenerasie van die antioksidant peptied, glutatioon (Bendich, 1990).

Dit is belangrik om daarop te let dat die antioksidant ensieme hoofsaaklik intrasellulêr voorkom en ekstrasellulêre vrye radikale moet daarom deur die sirkulerende antioksidante, soos sommige vitamene, geïnaktiveer word (Bendich, 1990).

(iii) Koënsiem Q_{10} (Ubiquinien)

Koënsiem Q_{10} is nog nie so deeglik as antioksidant bestudeer nie, alhoewel dit duidelik beide *in vitro* en *in vivo* antioksidasie eienskappe besit. Koënsiem Q_{10} is 'n koënsiem in die elektron oordragketting van die mitochondria en neem deel in die vorming van ATP. Die koënsiem word saam met cholesterol geproduseer vanaf asetiel koA en enige toename in die produksie van die een, sal 'n toename in die produksie van die ander, veroorsaak (Karlmark, 1993).

Daar bestaan ook interaksies tussen die verskillende antioksidante. 'n Voorbeeld hiervan is die beskerming wat vitamien E bied teen baie van die simptome van selenium tekort en andersom. Hierdie sinergistiese aksies is as gevolg van die vermoë van beide tokoferol en selenium-afhanklike glutatioon peroksidase om die produksie van lipied peroksidasie produkte te verminder (Bendich, 1990).

1.2.3 IMMUUNFUNKSIES, VRYE RADIKAAL REAKSIES EN ANTIOKSIDANTE

Onder normale omstandighede behoort die antioksidant verdedigings wat intra- en ekstrasellulêr beskikbaar is, voldoende te wees om teen oksidatiewe skade te beskerm. Die balans kan egter

verlore gaan as gevolg van die oorproduksie van vrye radikale of deur die blootstelling aan bronne wat die antioksidant verdedigings oorweldig (Bendich, 1990). 'n Aktiewe immuunreaksie stimuleer die vorming van miljoene nuwe selle, proteïene en hormone wat 'n baie groot produksie van energie vereis. Hierdie energie word geproduseer deur metaboliese weë wat tot die opwekking van reaktiewe suurstof molekules, lei. Fagositiese selle produseer verder ook vrye radikale in die respiratoriese ontploffingsreaksies om organismes te vernietig (Nockels, 1996).

Volgens Nockels (1996) gaan spanning dikwels 'n infeksie in diere voor, moontlik deur die verlaging van antioksidante wat later deur 'n aktiewe immuunreaksie benodig word. Wanneer 'n neutrofiel byvoorbeeld reaktiewe suurstofmolekules produseer om 'n bakterie te dood, sal die vrygestelde reaktiewe molekules ook die makrofage in die omgewing vernietig, aangesien onvoldoende hoeveelhede antioksidante beskikbaar is in sy membrane en/of sitosol om dit teen sy eie oksidante te beskerm.

Sekere komponente in die dieet kan die vlak van vrye radikaal opwekking in die liggaam beïnvloed. Hoë vlakke van dieet poli-onversadigde vetsure kan immuno-onderdrukkend wees. Die onversadigde dubbelbindings gevind in hierdie poli-onversadigde vetsure is primêre teikens vir vrye radikaal skade en gevolglike kettingreaksies wat lei tot die vorming van lipied peroksiede. Lipied peroksiede en aldehyede kan sellulêre funksies verander en selfs tot die afbraak van die geoksideerde selmembrane lei. Lipoproteïene in die plasma kan ook geoksideer word en hierdie molekules is limfotoksies (Bendich, 1990).

Die vloeibaarheid van selmembrane is gedeeltelik afhanklik van die mate van onversadigheid van sy vetsure. Soos die vlak van poli-onversadigde vetsure verhoog word, word die potensiaal vir membraan lipied peroksidase ook verhoog. Lipied peroksidase veroorsaak 'n afname in membraanvloeibaarheid. Metaboliete van lipied peroksidase kan verder ook immuunreaksies beïnvloed. Verlies van membraan vloeibaarheid is direk gekoppel aan die afnemende vermoë van limfosiete om te reageer op uitdagings aan die immuunsisteem (Bendich, 1990).

(i) **Gebruik van vrye radikale deur leukosiete**

Sekere selle van die immuunsisteem benut vrye radikale vir die vernietiging van indringende patogene. Twee hoof tipes leukosiete wat reaktiewe suurstof intermediêre produseer, is die neutrofiel en die makrofage (Bendich, 1990). Die respiratoriese ontploffing geassosieer met fagositose deur leukosiete lewer $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$, $ClO^{\bullet}$ en moontlik ook enkelsuurstof. Hierdie

vrye radikale beskadig die selwande van teikenorganismes (Hill, 1981).

Neutrofiele

Neutrofiele is die algemeenste sirkulerende fagositiese selle in die liggaam. Hierdie selle reageer op chemiese seine wat vrygestel word by streke van infeksie, en beweeg in die rigting van die sein (chemotakse). Neutrofiele van vitamien C gebrekkige marmotte het onderdrukte chemotakse getoon. Vitamien C, asook vitamien E, kan die chemotakse en fagositose van gesonde individue verhoog (Bendich, 1990).

Gestimuleerde neutrofiele het die vermoë om molekulêre suurstof op te neem en reaktiewe suurstof-bevattende molekules te produseer. Dit word dikwels die oksidatiewe ontploffing genoem. Vrye radikale en enkelsuurstof, saam met ander reaktiewe molekules, kan bakteriële patogene direk doodmaak of reageer met granulosis-spesifieke ensieme om hoogs toksiese verbindings te vorm. Tydens die oksidatiewe ontploffing word vitamien C opgeneem deur die neutrofiele, waarna die vitamien C konsentrasie verlaag is (Bendich, 1990).

Hierdie reaktiewe molekules kan egter ook mutasies veroorsaak; normale selle soos ander neutrofiele, rooibloedselle en plaatjies, afbreek; inflammasie van omliggende weefsels veroorsaak; beskermende ensieme inaktiveer en limfositet vermeerdering inhibeer. Neutrofiele is verder ook instaat om tumor selle af te breek. Monosiete beskerm limfosiete teen neutrofiel oksidatiewe beskadiging aangesien monosiete hoë vlakke van katalase besit. Bakterieë wat hoë vlakke van superoksied dismutase of kartinolies bevat, is meer bestand teen oksidatiewe skade (Bendich, 1990).

Makrofage

Waar neutrofiele hoofsaaklik geassosieer word met akute inflammatoriese reaksies, is makrofage betrokke by kroniese inflammasie. In teenstelling met neutrofiele, is makrofage sentraal tot die ontwikkeling van spesifieke immuunreaksies en prosesseer antigene vir aanbieding aan limfosiete. Beide hierdie fagositiese selle besit die selmembraan-geassosieerde NADPH-oksidasie sisteem wat die sintese en sekresie van reaktiewe suurstofspesies soos waterstofperoksied, hidroksiel radikale en superoksied radikale, toelaat. Prostaglandiene, leukotriene, interleukien 1 en interferone word verder deur makrofage geproduseer (Bendich, 1990).

(ii) Vrye radikale en limfosietfunksies

Die leukosiete wat hoofsaaklik betrokke is in die produksie van spesifieke immuunreaksies, is die T en B limfosiete. Die vitamien C en E inhoud van limfosiete en mononukleêre selle is gewoonlik effens hoër as wat in die bloedplaatjies en rooibloedselle gevind word. Wanneer splenosiete van muis, wat standaard diëte gevoer word, *in vitro* blootgestel word aan substansie wat peroksidatiewe skade deur die opwekking van vrye radikale veroorsaak, word beide T en B limfosiet vermeerderingsreaksie tot mitogene geïnhibeer. *In vitro* antigeen geïnduseerde antiligaam vorming deur B limfosiete word verder ook geïnhibeer. Wanneer addisionele vitamien E of ander antioksidante by hierdie kulture gevoeg word, word die immuun onderdrukking oorkom (Bendich, 1990).

Enkel essensiële nutriënt tekorte beïnvloed baie aspekte van T en B limfosietfunksie. Enkel en veelvuldige mikronutriënt tekorte word geassosieer met verhoogde infeksies in plaasdiere (Bendich, 1990).

Daar is bewys dat koper en selenium tekorte T limfosiete tot 'n groter mate as B limfosiete beïnvloed. Soos wat laboratoriumdiere verouder, word die funksies van T limfosiete meer verlaag as B limfosiet aktiwiteite. T limfosiet membrane is meer vloeibaar as B-sel membrane in jong muis. Soos wat muis verouder verloor T-selle hul vloeibaarheid terwyl B-selle dieselfde vlak van vloeibaarheid behou. T-sel lipiede is meer gevoelig vir peroksidasie as B-sel lipiede. Die vermoë van T limfosiete om rosette te vorm is betekenisvol geïnhibeer na blootstelling aan suurstof radikale, terwyl B limfosiet rosetvorming nie betekenisvol beïnvloed is nie (Bendich, 1990).

'n Studie van Reddy *et al.* (1986) toon aan dat 'n weeklikse vitamien E inspuiting van 1400 IU DL- α -tokoferol asetaat vir 12 weke aan kalwers, limfosiet stimulasie met die mitogeen, fitohemaglutinien, verhoog teen week 4 en 8. 'n Weeklikse orale inname van 2800 mg DL- α -tokoferol asetaat vir 12 weke het die IgM vlakke in die serum verhoog teen week 6. Vitamien E suplementasie (oraal en parenteraal) het ook die gemiddelde serum kreatien kinase vlakke verlaag. Die outeurs wys daarop dat die hoër kreatien kinase inhoud van ongesupplementeerde kontrole kalwers 'n vroeë aanduiding van spierdistrofie was, wat nie deur selenium alleen voorkom kon word nie en dat beide vitamien E en selenium nodig is vir die voorkoming daarvan. Die kalwers was op 'n aanvangsrantsoen met 0.44 mg kg⁻¹ selenium.

Verdere studies (Reddy *et al.*, 1987) het ook getoon dat vitamien E verskeie immuunreaksies in kalwers verbeter. Die sekondêre immuunreaksie antiliggam titers teen herpesvirus tipe I is verhoog met vitamien E supplementasie van 125 IU vitamien E dag⁻¹, in vergelyking met die kontrole kalwers wat aan 'n vitamien E tekort gelei het. Limfosiet stimulasie teen onder andere die fitohemaglutinien mitogeen is doeltreffend verhoog deur die vitamien teen verskillende supplementvlakke toe te dien.

1.2.4 KOPER EN DIE IMMUUNSISTEEM

Koper is 'n essensiële metaal vir die normale funksionering van alle lewende sisteme.

Biochemiese meganismes het ontwikkel wat tot 'n homeostatiese balans van koper in die liggaam lei. Dit verseker dat voldoende maar nie toksiese vlakke van koper geabsorbeer, vervoer, benut en uitgeskei word. Koper druk sy funksie hoofsaaklik uit as spesifieke kupro-ensieme (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

In diere word daar sowat tien proteïene gevind wat algemeen as kupro-ensieme aanvaar word. Hulle wissel in grootte vanaf klein enkel polipeptiede tot komplekse tetramere met tot agt Cu atome per mol. Sommige kupro-ensieme het bykomende ko-faktor behoeftes soos sink, heem yster en pirroloquinolien quinien. Dit is hierdie diverse eienskappe van die kupro-ensieme wat verantwoordelik is vir die verskeidenheid van gespesialiseerde funksies van koper (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

Die direkte effekte van koper is welbekend. Wanneer kopervlakke in die omgewing beperk of oormatig raak, verander die vlakke van 'n aantal ensieme. Prohaska (1988) het 16 sulke ensieme genoem. Die indirekte effekte van koper beïnvloed ook biologiese funksionering (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

Die vermoë om 'n indringing af te weer en om immuniteit te ontwikkel teen 'n bakteriese of virale patogeen, vereis 'n komplekse interaksie tussen verskillende organe, selipes en molekules. Koper speel 'n belangrike rol in die immuunsisteem, soos waargeneem kan word tydens 'n kopertekort in beide mens en dier. Verskillende scenario's, wat elkeen een of meer kupro-ensieme betrek, kan 'n verduideliking bied vir die veranderde immuniteit en verhoogde infeksies wat voorkom wanneer koper in die dieet beperk is. Veranderde antioksidant status is een so 'n scenario, aangesien twee kupro-ensieme, serruloplasmien en Cu.Zn-superoksied dismutase, bekende antioksidant funksies besit. 'n Ander moontlikheid is die veranderde

energiemetabolisme vanweë beperkte sitochroom *c* oksidase. Veranderde neuro-endokrien funksies kan ook nie uitgesluit word nie. Die sintese van norepinefrien is afhanklik van die kupro-ensiem, dopamien- β -mono-oksigenase, en die vorming van verskeie bio-aktiewe peptiedes, wat daarvoor bekend is om sekere immuunreaksies te beïnvloed, is afhanklik van ander kupro-ensieme, soos peptidiel-glisien monoöksigenase. Koper mag ook betrokke wees in intra- en intermolekulêre disulfied vorming in proteïene soos immunoglobuliene (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

Studies met muise en rotte het getoon dat koper belangrik is vir beide antiliggaam en selbemiddelde immuniteit en inflammatoriese reaksies (Prohaska & Lukasewycz, 1990; Windhauser *et al.*, 1991). Ward *et al.* (1997) het egter gevind dat die effekte van 'n koper tekort op spesifieke immuunfunksie minimaal en veranderlik by beeste is en dat die data wat vanaf laboratorium diere verkry is, nie gebruik moet word om die effekte van koper tekort by beeste te voorspel nie. In teenstelling hiermee het Cerone *et al.* (1995) weer in 'n studie met Aberdeen Angus verse gevind dat totale vlakke van IgG en totale komplement konsentrasie in serum beperk word deur lae koper status. Antiliggaam titers teen *Brucella abortus* en proliferasie van Concanavalin A en oplosbare antigeen-gestimuleerde perifere bloed mononukleêre selle was betekenisvol laer in verse met 'n kopergebrek teenoor die kontroles. Hierdie resultate toon weer dat immuunreaksie teen 'n intrasellulêre patogeen deur 'n koper tekort beperk mag word.

Daar is aangetoon dat kroniese koper tekort die limfosiet verspreiding in die milt van C58 muise beïnvloed, wat lei tot 'n aansienlike toename in B-selle en 'n relatiewe afname in T-selle. Hierdie verskuiwing in limfosiet verspreiding mag die immuunreaksies van koper gebrekkige muise beïnvloed (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

Dit is moontlik dat nie slegs die verspreiding, maar ook die funksionele eienskappe van selle, belangrik is. Limfokiene wat deur die T-selle geproduseer word, is belangrik in die koördinerende van immuun- inflammatoriese reaksies. *In vitro* - studies wat gedoen is in media met 'n "kopergebrek", het aangetoon dat splenosiete 'n verlaagde produksie van die monosiet-afkomstige faktor, interleukien-1 en die T-sel-vervangende faktor (interleukien-5) het. Daar is verder ook 'n verlaging van interleukien-2 ('n limfokien vanaf tipe I helper T-selle) produksie gevind (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

In studies met beeste en skape wat aan 'n kopertekort gelei het, is bewys dat neutrofielfunksies

verander word. In hierdie studies is selle van perifere bloed gebruik en het 'n verlaagde weerstand teen die mikrobiële organisme, *Candida albicans*, getoon (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

Dit wil ook voorkom asof die funksies van die makrofage ook deur 'n veranderde koperstatus beïnvloed kan word, aangesien kopergebreklike muise groter hoeveelhede interleukien-1 ('n monokien wat deur die makrofage geproduseer word) besit (Prohaska & Lukasewycz, 1990).

In 'n studie met mense was daar in die lae koper groep 'n betekenisvolle afname in die proliferasie van perifere bloed mononukleêre selle wat met fitohemagglutinin of Concanavalin A gekweek is, en 'n toename in die persentasie sirkulerende B-selle (CD 19+). Geen effek is gevind op die konsentrasie van serum interleukien-2 reseptor, die persentasie van perifere monosiete, neutrofiel, CD3+, CD4+ of CD8+ T-selle of op die neutrofiel fagositiese funksie, nie (Kelley *et al.*, 1995).

Prohaska & Lukasewycz (1990) beskryf verskillende biochemiese hipoteses wat die beperking in immuunreaksies tydens 'n kopertekort, kan verduidelik:

1. Immuniteit kan verlaag word weens veranderinge van die plasmamembrane. Die vetsuursamestelling in die plasmamembrane van limfositete verander met 'n kopertekort. Hierdie verandering mag die gevolg wees van foutiewe sintese of verhoogde katabolisme.
2. Veranderinge in die intrasellulêre redokspotensiaal en energiemetabolisme kan die immuunsisteem benadeel. Verhoogde lipiedperoksidase verander nie net die membraansamestelling nie, maar kan ook die redokspotensiaal beïnvloed sodat veranderinge in glutatioon (GSH/GSSG) voorkom. Dit kan selvorming en antigeenproduksie beïnvloed. Veranderde GSH vlakke in rotte, wat aan 'n kopertekort gelei het, asook veranderde piridien nukleotied verhoudings in die brein, is gevind. Daar is aangetoon dat laktaat/piruvaat en α -gliserol fosfaat/dihidroksi-asetoon fosfaat verhoog wat 'n verhoging in NADH/NAD⁺ kan voorstel.
3. Immuniteit kan beïnvloed word deur veranderinge in endokrienfunksie. Daar bestaan 'n komplekse interaksie tussen immuun-, senuwee- en reprodutiewe sisteme. Binne die senuweestelsel byvoorbeeld, hang die sintese van norepinefrien af van dopamien- β -monooksigenase. Dit is bekend dat die omskakeling van norepinefrien afneem tydens 'n immuunreaksie. Dit wil egter lyk asof norepinefrien omskakeling verhoog word deur 'n kopertekort. Verder is daar ook aangetoon dat norepinefrien vlakke in die milt van muise met

'n kopertekort, laer is. Norepinefrien metabolisme mag dus 'n moonlike verduideliking bied vir veranderinge in die immuunsisteem tydens 'n kopertekort. 'n Ander streek in die senuweestelsel wat moontlik mag reageer op veranderinge in dieet koper, is die hipotalamus. Die vrystelling van die LH-vrystellingshormoon word skerp verhoog in die teenwoordigheid van koper en prostaglandien E_2 . Vrystelling van LH vanaf die pitutêre klier het 'n groot effek op gonadale hormoonvrystelling wat weer die timus beïnvloed.

4. Veranderde immuniteit kan die gevolg wees van sekere onbekende koper-afhanklike faktore. Limfosiëte bevat Cu,Zn-superoksied dismutase en sitochroom *c* oksidase, twee koper-afhanklike faktore. Limfosiëte beskik oor serruloplasmien reseptore en het dus 'n spesifieke meganisme om koper vanuit die bloed op te neem. Limfosiëte mag unieke koper-afhanklike ensieme bevat. Tydens 'n kopertekort mag veranderinge in hierdie ensieme die immuunsisteem direk beïnvloed. Een so 'n ensiem is moontlik die sulfhidriël oksidase wat in die plasmamembraan van limfosiëte voorkom. Hierdie ensiem is belangrik in die vorming van IgM en dus B-sel differensiëring.

Volgens Ward *et al.* (1993) is daar nie 'n verskil in die gebruik van koper lisien en koper sulfaat as bron van koper by beeste, ten opsigte van groeitempo, voerinnome, voerdoeltreffendheid, plasma koper, serruloplasmien aktiwiteit en immuunreaksies, as aanduiding van koperstatus, nie.

1.2.5 DIE EFFEK VAN SINK OP DIE IMMUUNSISTEEM

Daar is gevind dat beeste wat 'n sink supplement ontvang hoër antiliggam titers toon na inenting met bees herpes virus, terwyl dit wil voorkom asof sinkmetionien meer doeltreffend as sinkoksied is om antiliggamproduksie te bevorder (Nockels, 1996). Volgens Macarulla *et al* (1992) het die humorale immuunreaksie van muise tot skaap rooibloedselle met sinksupplementasie verhoog, terwyl limfosiëtfunksie ook beïnvloed word deur die beskikbaarheid van sink. Droke *et al.* (1993) kon nie hierdie veranderinge in die immuunsisteem met 'n sink tekort, bevestig nie.

Oefening kan verskeie aktiwiteite van die immuunsisteem verander, waarvan die graad afhanklik is van faktore soos intensiteit van oefening en ouderdom. Totale en relatiewe getalle van sirkulerende neutrofiële en limfosiëte en die funksie van limfosiëte en fagosiëte kan na oefening verskil (Keast *et al*, 1988). Singh *et al.* (1994) het 'n studie gedoen waar die effek van sink supplementering op oefening-geïnduseerde veranderinge in die immuunsisteem ondersoek is. Die respiratoriese ontploffingsreaksie van geïsoleerde neutrofiële was laer in die sink gesupplementeerde groep van manlike hardlopers na strawwe oefening, met gevolglike laer

vlakke van superoksied anione, in vergelyking met die plasebo groep. Sink supplementering mag dus individue, wat blootgestel is aan kroniese fisiese spanning, beskerm teen die potensiële skadelike effekte van oormatige reaktiewe suurstofspesies. Sink verhoog ook skynbaar die onderdrukte reaktiwiteit van T-limfosiete tot mitogene direk na strawwe oefening. Hierdie onderdrukte limfosiete mag atlete tydelik vatbaar maak vir infeksies.

1.3 SELENIUM

Selenium is lank reeds bekend vir sy toksisiteit. Die biologiese belang van selenium is eers later ontdek toe gevind is dat selenium nodig is om lewerseroses in rotte te voorkom waar diëte laag in vitamien E is (Schwarz en Foltz, 1957). Selenium mag eers absoluut benodig word deur diere waar die vetoplosbare antioksidant, vitamien E, afwesig is van die dieet.

'n Tekort aan selenium in die dieet van herhouers kan lei tot witspiersiekte, verlies aan glutatioon peroksidase aktiwiteit en selenoproteïene, en onderdrukking van die immuunsisteem. Aangesien voere wat in baie dele van die wêreld geproduseer word waar daar 'n seleniumtekort voorkom, is selenium supplementering dikwels nodig. Metodes van supplementering is, onder andere deur inspuiting, dosering, selenium-gelaaide bolusse en spoorelement soutmengsels. Anorganiese selenium soute, veral natriumseleniet, word gewoonlik in selenium supplemente gebruik. Organiese selenium bronne, soos plante en seleniumryke gis (Sel-Plex) bevat seleno-aminosure wat moontlik voordelig kan wees as selenium supplement. Verskille bestaan in die benutting van die verskillende chemiese vorme van dieet selenium. Selenium in natriumseleniet kan chemies gereduseer word na chemies onoplosbare vorme deur rumen bakterieë en daardeur die selenium absorpsie verlaag. Seleno-aminosure kan nie-spesifiek direk in liggaamsproteïene ingebou word en as 'n selenium stoor dien (Kincaid *et al.*, 1999).

Die effekte van selenium supplementering kan gemonitor word deur die selenium konsentrasies in verskillende liggaamsvloeistowwe en organe te bepaal. Die meting van selenium-afhanklike funksies, soos glutatioon peroksidase aktiwiteit in serum of geïsoleerde bloedselle, kan ook waardevolle inligting verstrek. Die aktiwiteit van selenium supplemente kan ook bepaal word deur biologiese en kliniese effekte te ondersoek (Nève, 1994).

Selenoproteïene is teenwoordig in elke seltipe. Daar bestaan minstens 20-30 selenoproteïene, waarvan ongeveer 12 volledig of gedeeltelik beskryf is (McKenzie, *et al.*, 1998). Onder hierdie selenoproteïene val glutatioon peroksidase en deïodinase ensieme.

1.3.1 ORGANIESE VS ANORGANIESE SELENIUM

(i) Vorme van selenium

Selenium is, in teenstelling met die meeste ander noodsaaklike spoorelemente, beskikbaar in

verskillende chemiese vorme wat geskik is vir supplementeringsdoeleindes. Hierdie vorme sluit in anorganiese vorme (natriumseleniet en selenaat), gedefinieerde organiese vorme (Se-aminosure soos selenometionien en selenosistien) en meer komplekse organiese vorme soos selenium-verrykte gis. Anorganiese vorme en seleno-aminosure is goed-gedefinieerde chemiese strukture met bekende fisiese en chemiese eienskappe. Hierdie eienskappe is nuttig in die studies van interaksies en farmaseutiese onverenigbaarheid en vergemaklik biobeskikbaarheidstudies. Se-aminosure ontstaan deur die vervanging van die swawel-atoom deur selenium in die swawel-bevattende aminosure. Selenium-verrykte gis word normaalweg verkry deur kweking van *Saccharomyces cerevisiae* (brouersgis) op 'n selenium-verrykte medium wat beperk is aan swawel (Oldfield, 1996), gevolg deur liofilisering van die geïsoleerde mikro-organismes. Die selenium wat in hierdie vorm voorkom, is gedeeltelik gemetaboliseer deur die selle. Dit is moeilik om die presiese samestelling van die gis te definieer, aangesien die chemiese vorm van selenium in die gis (seleno-aminosure, selenosulfiede, selenoproteïene, anorganiese vorme, ensovoorts) en die totale of fraksionele konsentrasies aansienlik varieer. Hierdie faktore word weer beïnvloed deur die chemiese vorm van die selenium supplement in kulture en van eksperimentele toestande, soos tydsduur van kweking en wastegnieke na isolering. Dit is 'n groot nadeel in studies van biobeskikbaarheid en ook vir ekstrapolering van resultate wat verkry is met een sekere gisvorm teenoor ander beskikbare vorme (Nève, 1994).

(ii) Biobeskikbaarheid van selenium

Aanbevole dieetinnames word oor die algemeen gegee sonder om die chemiese vorm van die selenium in die dieet in ag te neem. Daar bestaan egter 'n groot verskil tussen organiese en anorganiese selenium ten opsigte van biobeskikbaarheid en moontlik ook bio-aktiwiteit (Pehrson, 1993).

Biobeskikbaarheid kan die beste gedefinieer word as die gedeelte van selenium wat vanuit die spysverteringskanaal geabsorbeer word wat metabolies beskikbaar is vir die onderhoud van die normale strukture en fisiologiese prosesse van 'n organisme onder gedefinieerde toestande. Verskillende endogene en eksogene faktore kan die biobeskikbaarheid van enige spoorelement beïnvloed, sodat die metabolisme van spoorelemente 'n baie komplekse en dinamiese aangeleentheid is. Hierdie faktore sluit onder andere in die hoeveelheid en chemiese vorm van die element wat saam met die voer ingeneem word, oplosbaarheid in die spysverteringskanaal, fisiologiese toestand van die organisme (byvoorbeeld groei of dragtigheid), die biobeskikbaarheid en metabolisme van ander elemente, siektes, ouderdom en farmaseutiese middels (Wolffram,

1999).

(iii) Absorpsie van selenium uit die spysverteringskanaal

Balansstudies wat gebaseer is op die verdwyning van chemies gedefinieerde seleniumverbindings (seleniet of selenometionien) vanuit die spysverteringskanaal het op voldoende absorpsie van beide anorganiese (senaat, seleniet) en organiese selenium (seleno-aminosure) gedui (Wolffram, 1999).

Anorganiese selenium se biobeskikbaarheid is laer in herkouers as in die monogastriese dier vanweë die anaerobiese toestande in die rumen en reduksie van seleniet na meer onoplosbare verbindings (selenied) deur die rumen mikrobe (Van Ryssen *et al.*, 1989; Hakkarainen, 1993; Wolffram, 1999). Hierdie selenied word swak deur die rumen of spysverteringskanaal geabsorbeer, maar sommige van die anorganiese selenium word deur die rumen mikrobies gebruik vir hul metabolisme. Die selenium-bevattende mikrobe proteïen kan deurvloei na die dunderm en as 'n bron van dieet selenium vir die herkouer dien. Die algehele biobeskikbaarheid van anorganiese selenium is egter laag by die herkouer. Organiese selenium, in die vorm van seleno-aminosure, vloei gewoonlik deur die rumen en word geabsorbeer terwyl die selenium behoue bly en doeltreffend benut word (Mahan, 1999). In skape is gevind dat tot 69% van anorganiese vorm van selenium wat per mond toegedien is, in die faeses uitgeskei word, terwyl die waarde vir organies-gebonde selenium (selenium-ryke rooiklawer) effens laer is teen 54% (Wolffram, 1999).

Die werk van Van Ryssen *et al.* (1989) het getoon dat selenosisteïen die dominante seleno-aminosuur is wanneer rumenorganismes geïnkubeer word met seleniet en selenometionien domineer wanneer hulle met selenometionien geïnkubeer word.

Koenig *et al.* (1997) het die effekte bepaal van dieetsamestelling en chemiese vorm van selenium op intestinale vloei, absorpsie en retensie van selenium in skape. Die diere het 'n ruvoer (lusernhooi)-gebaseerde (0,37 mg Se/kg) of konsentraat (gars)-gebaseerde (0,27 mg Se/kg) dieet teen 90% van *ad libitum* inname, ontvang, en stabiele isotope van selenium (verrykte selenium-gis, verrykte selenium-seleniet) is in die rumen ingevoeg. 'n Groter verhouding (51 tot 61%) van die selenium merkers wat na die duodenum gevloei het, was met die gepartikuleerde fraksie, hoofsaaklik as bakterie-geassosieerde selenium, as met die vloeistoffraksie, geassosieer. Die Se-seleniet was meer beskikbaar vir absorpsie en retensie as die Se-gis, wat daarop dui dat die anorganiese chemiese vorme van selenium net so beskikbaar is vir die herkouer as organiese

forme wat algemeen in voere voorkom. Selenium absorpsie en retensie was groter in die skape wat die konsentraat-gebaseerde dieet ontvang het as in die skape op die ruvoer-gebaseerde dieet. Die beskikbaarheid van selenium vanaf anorganiese en organiese bronne in skape is dus volgens hierdie studie van Koenig *et al.* (1999) skynbaar afhanklik van die dieetsamestelling.

Wolffram *et al.* (1985) en Thomson & Robinson (1986) het gevind dat selenaat 'n hoër absorpsie tempo vanuit die ileum het as seleniet, maar nie vanuit die ander segmente van die spysverteringskanaal nie. Die teenwoordigheid van 'n aktiewe meganisme vir die opname van selenaat in die ileum, teen 'n konsentrasie gradiënt, is deur verskillende outeurs (Ardüser *et al.*, 1985; Thomson & Robinson, 1986; Wolffram, 1999) bevestig. Die hoër en vinniger uitskeiding van selenaat in die uriene, teenoor dié van seleniet, kan daarop dui dat selenaat en sulfaat op dieselfde manier in die liggaam gehanteer word (Thomson & Robinson, 1986).

Die absorpsie van seleniet uit die spysverteringskanaal is onafhanklik van natrium en vind waarskynlik plaas deur eenvoudige diffusie (Mykkänen & Wasserman, 1989; Pehrson, 1993). Eksperimente met geïsoleerde borselmembraan vesikels toon 'n uitgebreide binding van selenium vanuit seleniet aan die membraanoppervlakte (Mykkänen & Wasserman, 1989). Hierdie binding kan verduidelik word deur die reaksie van seleniet met tiolgroepe binne die membrane van die ingewande. Reaksies van seleniet met intrasellulêre tiol mag selfs die diffuse opname van selenium vanuit seleniet bevorder deur 'n chemiese gradiënt vir seleniet te handhaaf. Die algemeenste intrasellulêre tiol in soogdierselle is die tripeptied, glutatioon, wat teen konsentrasies van 0,5 – 10 mmol/l mag voorkom (Kelly, 1993). Die redusering van seleniet na selenied deur tiol (glutatioon of sisteïen) mag bydra tot die hoë biobeskikbaarheid van seleniet, aangesien selenied skynbaar maklik geabsorbeer word (Wolffram, 1999).

In voere van natuurlike bronne word 'n aansienlike hoeveelheid van die totale selenium as vrye of peptied-gebonde seleno-aminosure (selenometionien, selenosisteïen en selenosistien) aangetref. Die seleno-aminosure word waarskynlik deur dieselfde aminosuurdraers van die basiese aminosure vervoer, aangesien sisteïen vervoer geïnhibeer word deur selenosisteïen, lisien en arginien, terwyl die vervoer van selenometionien oor die membrane deur metionien beïnvloed word (Wolffram, 1999).

(iv) **Metabolisme van selenium**

Heelwat data dui op 'n hoër biobeskikbaarheid van organiese seleniumverbindings teenoor

anorganiese selenium bronne, in terme van seleniumvlakke in weefsels (Van Ryssen *et al.*, 1989; Nève, 1994; Mahan & Parrett, 1996; Raisbeck *et al.*, 1996; Mahan, 1999; Wolfram, 1999). Raisbeck *et al.* (1996) het egter gevind dat die selenium konsentrasie in die lewer van osse wat 0,8 mg/kg seleniet ontvang het nie-betekenisvol hoër was as die selenometionien groep. Raisbeck *et al.* (1996) het verder gevind dat plasma selenium konsentrasies vinniger toeneem en ook meer labiel is as volbloed konsentrasies en dus sal volbloed selenium konsentrasie 'n beter aanduiding wees van langtermyn selenium status as plasma of serum.

Selenometionien is vier maal meer doeltreffend as selenaat of selenosisteïen in die voorkoming van pankreatiese degenerering, wat kenmerkend is van selenium tekort in pluimvee. Hierdie waarneming dui op 'n hoër bio-beskikbaarheid van organiese selenium, asook 'n verskil tussen organiese vorme. 'n Betekenisvolle verlaging in vleis drupverliese is ook waargeneem wanneer braaikuikens organiese selenium gevoer is. Verder was daar ook 'n verbetering in veerkwaliteit gewees, wat veral belangrik by lêhenne kan wees, aangesien 'n verbetering van een eenheid in veerkwaliteit, 'n besparing van tot 6 gram voer per dag kan teweeg bring. Selenium wat as selenium-ryke gis (Sel Plex 50) aan varke gegee is teen 0,3 dpm in die dieet op droë materiaal basis, was ongeveer twee maal meer effektief as seleniet in die verhoging van selenium in spiere. Soortgelyke resultate is gevind waar organiese selenium (Se-ryke gis), teen dieetvlakke van 0,4 dpm, die selenium inhoud van bloed serum en lewerweefsel van varke betekenisvol meer verhoog het as anorganiese selenium. 'n Organiese vorm van selenium (Se-bemeste lusern), het tot hoër vlakke van selenium by melkkoeie gelei as 'n soortgelyke dieetsupplement van anorganiese selenium (Lyons & Oldfield, 1996 en Oldfield, 1997). Daar is verder ook gevind dat selenium in die melk met 4-5 keer toeneem wanneer organiese selenium gevoer word (Mahan, 1999).

Waar diere vroeër van organiese selenium (veral selenometionien) voorsien is, word selenium konsentrasies in bloed en ander weefsels, asook glutatioon peroksidase aktiwiteit, vir 'n langer periode gehandhaaf nadat selenium supplementering gestaak is (Mahan & Parrett, 1996; Pehrson, 1993). Hierdie verskil in selenium retensie van weefsels teen gelyke dieetvlakke van seleniet en selenometionien illustreer dat bio-aktiwiteit studies gebaseer op die selenium inhoud of glutatioon peroksidase aktiwiteit in bloed of weefsel, foutiewe resultate kan lewer (Pehrson, 1993). Mahan & Parrett (1996) maak die stelling dat anorganiese selenium verbindings net so, indien nie meer, effektief as organiese verbindings in die verhoging en handhawing van die aktiwiteite van selenoproteïene, is.

Daar bestaan twee hoof selenium poele in die liggaam wat voorsien word deur anorganiese en organiese selenium wat met die dieet ingeneem word. Dit mag bogenoemde verskille tussen organiese en anorganiese selenium bronne, in terme van selenoproteïen sintese aan die een kant, en selenium deponering in weefsels aan die ander kant, verduidelik. Een van hierdie poele, wat die uitruilbare metaboliese poel genoem word, bevat intermediêre produkte wat vorm tydens die reduksie van selenaat/seleniet, endogene sintese van selenoproteïene, sowel as verbindings wat vorm vanuit metilering van selenied (metielselenol, dimetielselenied of trimetielselenonium). Seleno-aminosure kan ook hierdie uitruilbare metaboliese poel binnegaan. Hierdie poel verskaf metabolisme en sintese van al die funksioneel belangrike seleno-verbindings. Die tweede poel bevat alle selenometionien-bevattende proteïene, maar het geen funksie behalwe as om moontlik by te dra tot die selenium store nie (Daniels, 1996).

Aangesien selenometionien 'n substraat is vir die ensieme wat metionien gebruik, word selenometionien nie-spesifiek vir metionien in 'n groot aantal proteïene vervang (veral skeletspier proteïene), veral wanneer groot dosisse van selenometionien voorsien word (Behne, 1991; Daniels, 1996). Selenometionien in skeletspiere mag vir 40-50% van totale selenium in die liggaam verantwoordelik wees. Selenosisteïen kan ook in plaas van sisteïen in proteïene ingesluit word, maar dit kan nie direk in spesifieke selenoproteïene geïnkorporeer word nie (Daniels, 1996). Pehrson (1993) maak die aanname dat verskillende proteïenvlakke in die dieet tot verskillende vlakke van selenium in glutatioon sal lei. Wanneer 'n dieet byvoorbeeld te laag is in proteïen sal die selenometionien hoofsaaklik ingesluit word in bloedproteïene as 'n alternatief tot metionien. Selenosisteïen word aan die ander kant vinnig geabsorbeer in die glutatioon as seleniet en die meeste van selenium in glutatioon kom daarom ook voor in die vorm van selenosisteïen.

Volgens Beilstein en Whanger (1986) is die hoof seleno-aminosuur in die weefsels van rotte wat met seleniet gesupplementeer was, selenosisteïen, terwyl selenometionien gewoonlik die hoof seleno-aminosuur is in weefsels van rotte wat selenometionien ontvang het. In sommige weefsels soos die lewer, waar metaboliese aktiwiteit hoog is, kan selenosisteïen domineer selfs wanneer selenometionien gegee is.

Wolfram (1999) maak die gevolgtrekking dat indien selenium gesupplementeer word om dieregesondheid en prestasie te verbeter, daar nie 'n wesenlike verskil is tussen organiese en anorganiese bronne nie. Indien selenium egter aan diere gesupplementeer word met die doel om

selenium inname by mense te verbeter deur verrykte diereprodukte soos vleis, eiers of melk, sal organiese selenium soos selenometionien meer voordelig wees (Mahan, 1999; Wolfram, 1999).

Natriumseleniet kan dus as 'n doeltreffende vorm van selenium beskou word, maar sy potensiële pro-oksidatiewe effekte moet as 'n nadeel gesien word. Selenium mag homself teengaan deur oksidatiewe spanning op vette mee te bring. 'n Sekere pigment, lipofuscin, wat as 'n metaboliese produk van lipied peroksidase beskou word, is teen die hoogste konsentrasies gevind wanneer anorganiese selenium in die dieet gesupplementeer word (Pehrson, 1993).

(v) **Glutatioon peroksidase aktiwiteit**

'n Eksperiment waar die doeltreffendheid van die organiese en anorganiese vorme van selenium in groeier-afrondings varke op serum glutatioon peroksidase aktiwiteit vergelyk is, het aangetoon dat die vlak van dieet selenium wat nodig is om maksimum serum glutatioon peroksidase aktiwiteit te onderhou, ongeveer 0,05 – 0,10 dpm Se is. Alhoewel die anorganiese vorme van selenium gewoonlik tot hoër glutatioon peroksidase vlakke gelei het teen laer dieet selenium vlakke, het beide die vorme duidelik maksimum glutatioon peroksidase aktiwiteitsvlakke behaal teen laer konsentrasies as wat gewoonlik aan varke gevoer word, d.i. 0,3 dpm Se. Hierdie studie het ook getoon dat hoër dieet vlakke nie verdere produksie van glutatioon peroksidase stimuleer nie, en dat die aktiwiteit van die ensiem met ouderdom van die varke toeneem (Mahan, 1999).

Pehrson *et al.* (1989) het gevind dat gis selenium of selenometionien ongeveer twee maal meer aktief as seleniet was in die verhoging van glutatioon peroksidase aktiwiteit in die eritrosiete van selenium-arm verse. Hierdie bevinding dui daarop dat daar nie staat gemaak kan word op glutatioon peroksidase aktiwiteit as 'n merker van selenium bio-aktiwiteit nie.

Die aktiwiteit verlaag in diere met 'n selenium-tekort en word herstel met selenium supplementering. Ensiem aktiwiteit toon versadiging teen vlakke wat ooreenstem met selenium behoefte vir hierdie belangrike ensiematiese funksie (Nève, 1994).

(iv) **Effek van chemiese vorm op die immuunsisteem**

Kincaid *et al.* (1999) rapporteer dat geen betekenisvolle verskille gevind kon word in serum IgG en IgM vlakke tussen ooie wat Sel-Plex ontvang het en dié wat seleniet ontvang het nie. Konsentrasies van serum IgM was egter hoër in koeie wat sout met 60 dpm Se as Sel-Plex, ontvang het, teenoor koeie wat dieselfde hoeveelheid selenium as seleniet ontvang het.

Eksperimentele data van Stabel *et al.* (1991) toon aan dat die byvoeging van organiese en anorganiese vorme van selenium IgM produksie in mitogeen-gestimuleerde bees periferele bloed mononukleêre selle *in vitro* verhoog. Die selle is geïsoleer uit diere wat normale vlakke van selenium in die voer ontvang het. Hierdie resultate dui aan dat selenium in anorganiese en organiese vorm, B-sel funksie *in vitro* verhoog. Nicholson *et al.* (1993) het ook gevind dat organiese selenium meer effektief is in die bevordering van immunoglobien sintese.

1.3.2 SELENIUM AS ANTIOKSIDANT

Wanneer selenium in die dieet beskikbaar is, induseer dit die sintese van twee Se-bevattende antioksidant ensieme, sitosol glutatioon peroksidase (GSHPx) en fosfolipied hidroperoksidase glutatioon peroksidase (PLGSHPx). GSHPx is 'n 84 000 dalton sitosoliese ensiem wat 4-gram-atome Se in tetrametriese vorm bevat en is die hoof sitosoliese Se-ensiem in baie weefsels. PLGSHPx is 'n 20 000 dalton sitosoliese ensiem wat 1-gram-atoom Se in monomeriese vorm bevat. Hierdie ensiem word geassosieer met biomembrane en reduceer fosfolipied hidroperoksiede na alkohole, 'n funksie wat 'n verduideliking bied vir die sparende effek van Se in die afwesigheid van voldoende dieet vitamien E. Wanneer vitamien E, die belangrikste membraangebonde antioksidant, beperk is, bied PLGSHPx peroksidatiewe beskerming aan die membraan. Wanneer dieet en membraan vitamien E voldoende is, verlaag die behoefte aan dieet Se en PLGSHPx, en is Se dalk selfs glad nie nodig nie (Spallholtz, 1990).

Peroksinitriet, produkte van superoksied en salpeteroksied, word in die vel geproduseer tydens blootstelling aan ultraviolet en veroorsaak breking van enkelketting DNA. Studies met ebselen, 'n sintetiese selenium verbinding wat as 'n glutatioon peroksidase funksioneer, het aangetoon dat hierdie ensiem die breking kan voorkom. Ebselen inhibeer ook die proinflammatoriese ensieme, salpeteroksied sintase en proteïen kinase C. Glutatioon peroksidase speel verder ook 'n belangrike rol in die sintese van arachidonsuur metaboliete (McKenzie *et al.*, 1998).

(i) Verspreiding van selenium en glutatioon peroksidase

Selenium, die glutatioon peroksidases en ander selenium bevattende proteïene is wyd versprei in die diereryk, maar daar is geen bekende behoefte aan selenium in hoër plante nie. Weefsel verspreiding van Se en glutatioon peroksidase is moontlik die beste in rotweefsels gedokumenteer (Spallholtz, 1990).

Tabel 1.1. Verspreiding van selenium en selenium-afhanklike glutatioon peroksidase aktiwiteit in rotweefsels (Spallholtz,1990)

Weefsel	Se Hoeveelheid %	GSHPx Aktiwiteit %
Spier	39.8	6.1
Lewer	31.7	65.6
Eritrosiete	0.9	21.2
Plasma	7.9	2.1
Niere	7.5	2.0
Skelet	3.1	---
Longe	1.2	0.8
Milt	1.0	1.3
Pankreas	0.7	0.2
Hart	0.7	0.5
Brein	0.5	<0.1
Adrenale	0.1	<0.1
Timus	0.1	<0.1

1.3.3 DIE INVLOED VAN SELENIUM OP DIE IMMUUNSISTEEM

Selenium het, buiten die spesifieke insluiting in die glutatioon peroksidase as 'n selenosisteien residu, verskeie effekte op die immuunsisteem, onder andere uitdrukking van spesifieke en nie-spesifieke humorale en selbemiddelde reaksies. Die antioksidatiewe rol van GSHPx in die eliminering van anorganiese en organiese hidroperoksiede speel 'n dominante rol by selle van die immuunsisteem, sowel as in die verskillende weefsels. 'n Hoof funksie van selenium in immuunselle en veral die fagositiese selle, is die beheer van oormatige produksie van peroksidatiewe substrate, soos H_2O_2 . (Spallholtz,1990)

Volgens McKenzie *et al.*, (1998) is daar drie meganismes waarvolgens selenium suplementasie sellulêre immuniteit bevorder:

1. Selenium stimuleer die uitdrukking van die T-limfosiet hoë-affiniteit IL-2 reseptor en verhoog T-limfosiet reaksies. Aangesien die T-limfosiet 'n sleutel komponent in die

voorsiening van B-limfosiet hulp vir sintese van antiligggame is, mag dit 'n verduideliking bied vir die effekte van Se op antiliggaamproduksie.

2. Selenium voorkom skade aan immuunselle wat deur oksidatiewe spanning veroorsaak kan word (McKenzie, 1998). Die funksie van selenium wat die beste beskryf en verstaan word, is sy rol as 'n antioksidant in die GSHPx sisteem. Endogene produksie van $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , sowel as ander vrye radikale tydens die respiratoriese uitbarsting van fagositiese selle, is nodig vir die sitotoksiese vernietiging van die indringerspesie. Vitamien E, vitamien C, superoksied dismutase en GSHPx beskerm die fagositiese selle teen selfvernietiging deur vrye radikaal peroksidasie. Wanneer die GSHPx aktiwiteit in makrofage en ander fagositiese selle daal, sal daar 'n verhoging van H_2O_2 vrystelling plaasvind. Spallholz en Boylan (1989) het inderdaad gevind dat muis makrofage wat 'n selenium en GSHPx tekort het, meer H_2O_2 produseer tydens die respiratoriese uitbarsting, soos gemeet deur luminol chemiluminessensie. Verder is ook gevind dat die $O_2^{\bullet-}$ produksie in hierdie selle hoër is, soos gemeet deur lusigenien chemiluminessensie. Bykomend tot die antioksidant funksie van GSHPx in selle, mag selenium en/of GSHPx ook ander funksies in die immuunselle vervul, direk of indirek verwant aan die verhoogde endogene vrystelling van H_2O_2 (Spallholtz, 1990).
3. Selenium verander bloedplaatjie aggregrasie deur die verhouding van tromboksaan tot leukotrien produksie te verlaag.

(i) Effekte op Antiliggaamproduksie

Die primêre antiliggaam reaksie en totale IgM konsentrasies in beide enkelmaagdiere en herkouers word deur selenium tekorte beïnvloed. Selenium supplementering kan ook serum IgG en die produksie van sekondêre antiligggame tot antigeen verhoog, wat daarop dui dat die helper T-limfosiet afhanklike klas ook deur 'n selenium tekort beïnvloed word. Die immunologiese effekte van selenium supplementering op die antiliggaam reaksies is van beide ouderdom en antigeen afhanklik (Spallholz *et al.*, 1973; Martin & Spallholz, 1976; Baalsrud & Øvernes, 1986; Jelinek *et al.*, 1988; Larsen *et al.*, 1988a; Reffett *et al.*, 1988a; Reffett *et al.*, 1988b; Droke & Loerch, 1989; Hayek *et al.*, 1989; Stabel *et al.*, 1989; Swecker *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1990; Knight & Tyznik, 1990; Larsen, 1993). Volgens Baalsrud & Øvernes (1986) en Droke & Loerch (1989) is die supplementering van beide selenium en vitamien E in perde en beeste nodig, om 'n verhoogde antiliggaam reaksie te verkry, terwyl geen additiewe effek van selenium en vitamien E by lammers gevind is nie (Larsen *et al.*, 1988a & Reffett *et al.*, 1988b). Larsen *et al.* (1988a) het ook gevind dat dieet selenium konsentrasies van 1 mg/kg natriumseleniet minder effektief was in vergelyking met 0,1 mg Se/kg in hul reaksie tot parainfluenza-3 virus en *Corynebacterium*

pseudotuberculosis.

Spallholz *et al.* (1975) het gevind dat natriumseleniet wat per inspuiting intraperitoneaal toegedien is, die primêre immuunreaksie teen skaap rooibloedselle, verhoog. Hierdie outeurs het ook gevind dat die verhoging in die primêre immuunreaksie op skaap rooibloedselle, die grootste was wanneer selenium net voor of gelyktydig saam met die antigeen toegedien is.

Nemec *et al.* (1990) kon geen effek van selenium of vitamien E vind op IgG₁, IgG₂, IgA of IgM antiliggam vlakke teen *Brucella abortus*, na inenting met dié antigeen, nie. Resultate van Finch & Turner (1986) het ook getoon dat lammers met 'n marginale selenium tekort, sterk antiliggam titers teen 'n bakteriële antigeen (*Salmonella dublin*) kan lewer en dat suplementering met selenium slegs marginale verhoging van immuunreaksies te weeg bring. Daar word verder aangedui dat die voordele van selenium suplementering in werklikheid teengewerk kan word in die reaksie van muise teen lewendige salmonellae (*Salmonella typhimurium*). Verbeterings in die gasheer se immuunsisteem vanweë die verhoogde beskikbaarheid van selenium kan, onder sekere omstandighede, verdoesel word deur die stimulasie van lewende patogene deur verhoging van hul groei of uitset van toksiene.

In 'n studie van Reffett *et al.* (1988) het kalwers met 'n Se tekort 'n primêre en sekondêre inenting met aansteeklike bees rhinotracheitis virus ontvang. Na albei die inspuitings het die glutatioon peroksidase aktiwiteit verlaag en die plasma kreatien kinase aktiwiteit verhoog, terwyl IgG vlakke konstant gebly het. Die antiliggam titer het na die sekondêre uitdaging afgeneem.

In 'n studie van Jelinek *et al.* (1988) is die immuniteit van 12 Merino skape, wat op 'n lae selenium dieet (0.01 mg Se/kg) was, vergelyk met dié van 10 ooreenkomstige skape op dieselfde dieet, maar wat elkeen 'n intraruminale seleniumpil ontvang het. Die skape was in individuele, beskutte hokkies gehuisves. Al die skape is uitgedaag met *Brucella abortus* selle (dag 0 en 28), haas rooibloedselle (dag 0, 7 en 28) en *Corynebacterium pseudotuberculosis* toksoïed (dag 0 en 28). Serum antiliggam titers is weekliks vir 8 weke lank gemeet. Die data toon dat die skape op 'n lae Se dieet sterk algehele immuunreaksies getoon het wat grootliks met dié van die skape op 'n hoë Se dieet vergelykbaar was. Die gemiddelde antiliggam titers vir *B. abortus* in die skape op die hoë selenium dieet, was betekenisvol hoër as dié van die skape op die lae selenium dieet op dae 21 en 28 (Rose Bengal toets), op dag 7 (komplement fikseringstoets) en dag 14 (ensiem-gekoppelde immunosorbent bepaling). Die gemiddelde agglutinasie antiliggam titer in die skape

op die hoë selenium dieet teen haas rooibloedselle, was marginaal hoër in vergelyking met die titerwaardes van die skape op die lae selenium dieet ($p = 0.049$) op dag 49. Die gemiddelde antiliggaaam titers vir *C. pseudotuberculosis* was op geen stadium van die eksperiment betekenisvol verskillend tussen die twee groepe nie. Die outeurs is van mening dat die sterk immuunreaksies in die skape op die lae selenium dieet in hierdie eksperiment moontlik die gevolg kon gewees het van die oorvloedige α -tokoferol liggaamsreserwes van die lae selenium skape, wat vir die selenium tekort kon kompenseer. Die outeurs is egter nogtans van mening dat lae selenium status alleen nie immuniteit in Merinoskape tot 'n groot mate beïnvloed nie.

Nicholson *et al.* (1993) het ook nie groot verskille tussen die antiliggaaam titers van selenium ongesupplementeerde en selenium gesupplementeerde groepe beeste, na uitdaging met skaap rooibloedselle en ovalbumien, waargeneem nie. Die resultate van hierdie eksperiment steun die voorstel van Swecker *et al.* (1989) dat bloed selenium vlakke van meer as $100 \mu\text{g L}^{-1}$ nodig is vir optimum werking van die immuunsisteem.

Swecker *et al.* (1989) het kalwers 'n selenium supplement gegee teen 20, 80, 120, 160 en 200 mg kg^{-1} . Die liggaamsmassa toenames is nie deur die seleniumvlak beïnvloed nie, wat voorstel dat 20 mg kg^{-1} voldoende is vir groei. IgG titers, wat in reaksie op hen eier lisosiem inenting geproduseer is, was hoër in al die selenium konsentrasies bokant 20 mg kg^{-1} . Hierdie data wys daarop dat die immuunsisteem hoër vlakke van selenium benodig as groei.

Die effekte van suplementering op die produksie van 'n spesifieke antiliggaaam is nie noodwendig parallel aan die veranderinge in die totale immunoglobulien vlakke van dieselfde isotype nie, en verskillende isotipes (byvoorbeeld IgM en IgG) word nie noodwendig op dieselfde manier beïnvloed deur suplementering nie (Reddy *et al.*, 1986; Larsen *et al.* 1988a & Swecker *et al.*, 1995). Daar moet dus aanvaar word dat 'n gegewe protokol waar suplemente toegedien word, verskillende effekte op die antiliggaaam reaksies met verskillende tipe antigene (byvoorbeeld T-afhanklike in vergelyking met T-onafhanklike reaksies) het. Verskillende effekte kan ook waargeneem word tydens verskillende stadiums van 'n immuunreaksie (byvoorbeeld primêr teenoor sekondêr) en so ook binne verskillende humorale kompartemente (byvoorbeeld kolostraal teenoor serum antiliggaaam) (Finch & Turner, 1996). Die chemiese vorm van die supplement mag ook belangrik wees: *in vitro* studies op beesselle het getoon dat organiese selenium meer effektief is as anorganiese selenium in die stimulerings van IgM sintese (Stabel *et al.*, 1991). 'n Verdere oorsaak van variasie mag wees dat diere sonder werklike tekorte gebruik

word of dat die bloed seleniumvlakke wat behaal word nie hoog genoeg is om groot verskille te toon nie (Nicholson *et al.*, 1993).

(ii) Selenium en Limfosiet Produksie

Die tekort van die antioksidant mikro-nutriënte mag T limfosiete tot 'n groter mate as B limfosiete beïnvloed. T-sel membrane is meer vloeibaar as die membrane van die B-selle en T-sel lipiede is meer sensitief vir peroksidase as B-sel lipiede. Mitogene soos fitohaemagglutinin word dikwels gebruik om die reaksies van limfosiete te bepaal (Larsen, 1993). Selenium tekort alleen of in kombinasie met vitamien E onderdruk die limfosiet reaksies tot mitogene (Larsen & Tøllersrud, 1981; Turner *et al.*, 1985; Larsen *et al.*, 1988b; Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1990; Lessard *et al.*, 1991). Volwasse herkousers is skynbaar meer weerstandig teen die immunologiese effekte van 'n selenium tekort op limfosiet proliferasie. Ooie wat rantsoene ontvang het wat laag was in beide selenium en vitamien E het goeie reaksies teen fitohaemagglutinin getoon, terwyl selle wat vanaf die lamms geneem is, almal verlaagde T-sel reaktiwiteit getoon het (Turner & Finch, 1990). Hierdie waarnemings kan verduidelik word met verhoogde beskikbaarheid van rumen mikrobe selenium aan die limfosiete (Turner & Finch, 1991).

Die effektor gedeelte van die T-sel reaksie tot antigene bestaan uit beide opwekking van effektor limfosiete en aktivering van fagosiete. In 'n studie van Aziz & Klesius (1985) is die mitogeen-geïnduseerde produksie van leukosiet migrasie inhiberingsfaktor onderdruk by die limfosiete van bokke met 'n selenium tekort, in vergelyking met bokke met voldoende selenium. Die interleukien-2 produksie en die limfosietreaksie op die mitogeen, concanavalin A, is egter nie beïnvloed nie. Verlaagde produksie van migrasie inhiberingsfaktore mag ook 'n effek hê op toestande met kroniese inflammasie, wat geassosieer word met makrofaag infiltrasie en aktivering.

Selenium supplementering beïnvloed nie die IL-1 en IL-2 produksie deur makrofage en limfosiete betekenisvol nie. Hierdie waarneming stel duidelik voor dat die meganisme(s) verantwoordelik vir die waargenome effekte van selenium op limfosiet proliferasie onafhanklik is van die vlakke van IL-1 of IL-2 (Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 1990). Die moontlike verlaging van selbemiddelde immuuniteit met 'n selenium tekort mag veroorsaak word deur 'n afname van interleukien-2 (IL-2) reseptor uitdrukking, wat daardeur IL-2-bemiddelde sellulêre immuunreaksies beperk. Daar word voorgestel dat selenium die uitdrukking van IL-2 reseptore op die seloppervlakte verander, wat die verlaagde vermoë van die limfosiete van selenium-

gebrekkige diere om teen mitogene en antigene te reageer, kan verduidelik (Larsen, 1993). Studies deur Eskew *et al* (1985) en Koller *et al.* (1986) het ook getoon dat veranderinge in die proliferasie vermoë van limfosiete volgens selenium status, nie die gevolg is van 'n veranderde vermoë van makrofage om IL-1 te produseer of om antigene te vernietig nie.

Alhoewel die produksie van IL-1 nie beïnvloed word deur die selenium status nie, kan veranderde sekresie van arachidoonsuur metaboliete deur makrofage, belangrike regulatoriese implikasies hê. GSHPx, en dus selenium, is nodig in die arachidoonsuur kaskade vir die produksie van prostaglandiene, tromboksane, leukotriene en ander bemiddelaars van inflammatoriese en immuunreaksies. Selle met 'n tekort aan GSHPx en selenium het 'n laer omskakeling van die arachidoonsuur siklo-oksigenase produk, prostaglandien G_2 (PGG_2) na die alkohol, PGH_2 (Spallholtz, 1990). Maddox *et al.* (1991) het by beeste getoon dat daar definitiewe effekte is van dieet selenium op melk eikosanoïed konsentrasies in reaksie op 'n *Escherichia coli* infeksie. Verhoogde konsentrasies van tromboksaan B_2 , prostaglandien $F_{1\alpha}$, prostaglandien E_2 en leukotrien B_4 is geassosieer met aansienlike hoër getalle bakterieë in die melk, waarskynlik as gevolg van 'n verlaging in die vernietiging van *E.coli* deur neutrofiele van diere met 'n selenium tekort. Verhoogde inflammasie en weefsel skade, veroorsaak deur endotoksien en inflammatoriese bemiddelaars, sal 'n hoër weefsel hidroperoksied konsentrasie induseer. Tydens selenium tekorte mag dit weer tot 'n hoër aktiwiteit van siklo-oksigenase en lipoksigenase ensieme lei, met gevolglike hoër eikosanoïedvlakke.

Turner *et al.* (1985), Finch & Turner (1989) en Stabel *et al.* (1991) het gevind dat die byvoeging van natriumseleniet by selkulture van herkouters, die limfosiet reaksie tot mitogene verhoog. Die mitogeen-geïnduseerde immunoglobulien produksie word ook verhoog wanneer serum of gepoelde plasma van diere met 'n hoë selenium status, by die selkulture gevoeg word. Hierdie bevinding dui daarop dat die effek van selenium eerder in die mikro-omgewing van die sel as in die sel self, plaasvind. Finch & Turner (1989) het verder ook waargeneem dat die hoeveelheid selenium wat *in vitro* benodig word om die reaksie van lammer limfosiete tot die fitohaemagglutinin mitogeen in kultuur te verhoog, in die omgewing van 1-10 ng Se/ml, was. Toksiese effekte is verkry bokant 1 $\mu\text{g/ml}$. Soortgelyke effekte is ook deur Larsen *et al* (1988b) gevind. Natriumseleniet of selenometionien wat teen 'n konsentrasie van 0.1 of 0.5 $\mu\text{g/g}$ by die dieet gevoeg is, het die limfosiet reaksies van lammers tot mitogene verhoog, terwyl 1 $\mu\text{g/g}$ selenometionien 'n inhiberende effek getoon het.

Pollock *et al.* (1994) het kalwers diëte gevoer wat laag is in vitamien E en selenium en die diere met vitamien E en/of selenium gesupplementeer om die moontlike interaktiewe effekte van hierdie mikro-nutriënte op sellulêre immuunreaksies te toets. *In vitro* limfosiet proliferasie is gebruik om die effekte van dieet op selbemiddelde immuniteit te bepaal. Daar is gevind dat hierdie effekte afhanklik is van die tipe serum wat gebruik is om die selle in te kweek. Hierdie bevindinge dui aan dat die mikro-nutriënt status van beide die skenkerdiere en van die kultuur media, in ag geneem moet word wanneer die resultate van *in vitro* studies van limfosietfunksie, geïnterpreteer word.

(iii) Selenium en Fagosiet Funksies

Die produksie van vrye radikale deur fagosiete is nodig vir die vernietiging van bakteriële patogene. Die vernietigingsproses word gewoonlik beperk tot intrasellulêre vakuole wat die gefagositeerde patoëen omring. Die reaktiewe molekules lek egter vanuit die fagolisosome in die omringende sitoplasma en intrasellulêre spasies uit. Hierdie produkte kan die sel beskadig indien dit nie gedetoksifiseer word nie. Neutrofiele bevat superoksied dismutase, katalase en glutatioon/glutatioon peroksidase om die sel teen outo-oksidasie te beskerm. Tydens toestande van 'n antioksidant tekort, mag die selle egter deur die reaktiewe suurstof spesies beskadig word (Larsen, 1993).

Selenium en/of glutatioon peroksidase word in fagositiese en ander limfoïedselle gevind. Hoë spesifieke aktiwiteit van GSHPx is gevind in beenmurg, milt en limfknope van skape (Paynter, 1979). Scholz en Hutchinson (1979) het gevind dat die GSHPx in bloed leukosiete van melkkoeie 4 keer hoër is as in eritosiete. Hierdie en ander voorbeelde van selenium en GSHPx konsentrasie in immuunweefsels en verwante limfoïedselle is 'n bewys dat selenium en GSHPx belangrike funksies in hierdie selle moet vervul. Die selenium behoefte van hierdie selle kan weer gesien word wanneer diere 'n lae selenium dieet gevoer word. Organe soos die lewer, hart en niere en spiere se selenium en GSHPx vlakke daal redelik vinnig, terwyl ander weefsels, soos die limfoïedselle, relatief stadiger in die afwesigheid van dieetselenium daal (Spallholz, 1990).

Die vermoë van fagosiete om na die streek van infeksie of inflammasie te migreer, mag ook beïnvloed word deur 'n diere se selenium/vitamien E status. Selenium tekort het die willekeurige migrasie en chemotaktiese reaksies van bok neutrofiele verlaag en beide die reaksies kon omgekeer word deur of die diere of die geïsoleerde neutrofiele *in vitro* te supplementeer (Aziz *et al.*, 1984). Aziz & Klesius (1986) het ook gevind dat 'n selenium tekort die vermoë beperk om

chemotaktiese faktore, wat 'n sleutelrol speel in die rekrutering van selle na die streek van infeksie, te produseer. Hierdie afname kon weereens omgekeer geword het deur supplementering met selenium.

Dieet tekorte van selenium en/of vitamien E beperk neutrofiel en makrofaag aktiwiteite. Die selenium tekorte word egter nie geassosieer met verlaagde fagositose nie (Grasso *et al.*, 1990), alhoewel fagositose wel kan verminder waar beide selenium en vitamien E tekorte ondervind word (Turner & Finch, 1990). Die intrasellulêre vernietiging van gis en bakterieë deur neutrofiele en makrofage van diere met 'n selenium tekort, is verlaag (Gyang *et al.*, 1984 & Grasso *et al.*, 1990). Grasso *et al.* (1990) het gevind dat 'n selenium tekort die vermoë van neutrofiele om *Escherichia coli in vitro* dood te maak met 30% verlaag, terwyl die vermoë om *Staphylococcus aureus* te dood met 50% verminder. In 'n studie van Serfass & Ganther (1975) kon neutrofiele van rotte met 'n selenium tekort nie *Candida albicans* ná fagositose vernietig nie. Boyne en Arthur (1979) bevestig die feit dat selenium tekort in osse nie die vermoë van neutrofiele om *C. albicans* te fagositêr, benadeel nie, maar wel die vermoë om die organisme dood te maak, moontlik die gevolg van laer ensiem aktiwiteite in die neutrofiele van die osse op 'n lae selenium dieet. Daar is ook gevind dat selenium-gebrekkige muis wat met *Candida albicans* ingespuet is, vinniger doodgaan as muis met voldoende selenium in die dieet (Spallholz, 1990). Die oksidatiewe vermoëns van neutrofiele word in selle verlaag wat geïsoleer is vanaf bokke (Aziz & Klesius, 1986) en beeste (Arthur & Boyne, 1985 & Grasso *et al.*, 1990) met 'n selenium tekort ($< 0.08 \text{ mg kg}^{-1}$) en voldoende vitamien E. Hierdie beperking van funksies kon herstel word deur *in vitro* inkubasie met natriumseleniet (Aziz *et al.*, 1984; Aziz & Klesius, 1986) of supplementering van diere met selenium en/of vitamien E (Aziz *et al.*, 1984; Politis *et al.*, 1995).

(iv) Selenium en kanker

Beide normale en oormatige vlakke van dieet selenium verminder die voorkoms, groei en grootte van tumore in eksperimentele diere en selle in weefselkulture. 'n Moontlike immunologiese meganisme vir hierdie verskynsel is die verhoging van Natural Killer (NK) selaktiwiteit. NK selle benodig nie sensitisering of antiliggamme vir sitotoksiese seleksie vir tumorselle nie. Selenium wat aan rotte in die drinkwater teen 'n konsentrasie van 0.5 of 2.0 dpm gegee is, het die NK selle se sitotoksiteit teen tumorselle verhoog, terwyl 'n seleniumkonsentrasie van 5 dpm in die drinkwater die sitotoksiteit effens onderdruk het. Die vraag ontstaan of hierdie effekte van verhoogde dieetselenium op NK selle verband hou met die bekende toksisiteit van selenium.

Aangesien selenium self toksies is en H_2O_2 en $\text{O}_2^{\cdot -}$ produseer met die oksidasie van glutatioon deur seleniet, kan dit wees dat dieetselenium sitotoksies *in vivo* in immuunselle is (Spallholtz, 1990).

1.4 SELENIUM TOKSISITEIT

Aandag is vir die eerste maal op selenium gevestig in die 1930's toe die element geïdentifiseer is as die toksiese bestanddeel in plante wat haarverlies, lamheid, hoofverweer en dood in weidende diere veroorsaak. In 1957 is selenium egter beskryf as 'n spoorelement wat in klein hoeveelhede deur die liggaam benodig word. Dit het gelei tot die gebruik van selenium supplemente - soms in oormaat. Die potensiële gevaar van oordosering is hoog aangesien die "terapeutiese indeks" van selenium besonders laag is. Die kritiese vlak tussen toksiese en nie-toksiese voere word algemeen as 5 mg Se/kg dieet, geneem. Oordosering mag voorkom as gevolg van foutiewe vervaardiging van voormengsels of gelyktydige suplementering van selenium deur verskeie roetes (Sandholm, 1993).

Volgens Twomey *et al.* (1977) word vergiftiging geassosieer met drie faktore, nl. hoë grondvlakke, sekere selenium akkumulator plante en die benutbaarheid van selenium vir die plant. Hierdie outeurs het ook gevind dat klimaat 'n groot rol speel in die voorkoms van selenium vergiftiging by weidende beeste. Met 'n lae reënval sal die gras bruin vertoon en die beeste vreet nader aan die grond as tydens 'n normale reënval seisoen. Stof vanaf die grond kan ook die gras kontamineer. Oplosbare seleniumsoute bly in die grond aangesien normale logging deur reënwater verminder word. Die grondtemperatuur kan ook die vorming van meer oplosbare en beskikbare selenium bevorder. Laastens kan die lae reënval ook plante bevorder met 'n lang wortelsisteem wat hulle nader aan die beskikbare selenium kan bring.

Selenium in grond word die beste deur plante as selenate geabsorbeer en tot 'n mindere mate as seleniete. Organiese seleniumverbindings mag benodig word deur sekere selenium akkumulator spesies, aangesien groei vertraag word in die afwesigheid van grondselenium (Spallholz, 1994). Die selenium akkumulator of indikator plante groei goed op gronde wat hoog is in selenium inhoud en hul teenwoordigheid is 'n aanduiding van selenium-ryke grond. Plante in hierdie groep sluit onder andere spesies van *Astragalus*, *Machaeranthera*, *Haplopappus* en *Stanleya* in. Daar bestaan oor die 1500 *Astragalus* spesies waarvan ongeveer 25 spesies toksies kan wees as gevolg van hul onderskeidelike vermoë om selenium vanuit die grond te konsentreer (Spallholz, 1994). Hierdie plante metaboliseer selenium na nie-proteïenagtige aminosure soos Se-metielselenosisteïen, selenosistien, selenohomosisteïen en selenosistatioon. Diere vermy hierdie plante oor die algemeen aangesien dit 'n onaangename geur, waarskynlik vanaf

dimetiëldiselenied en dimetiëlselenied, afgee en onsmaklik is. Indien dit wel gevreet word by gebrek aan meer geskikte plantmateriaal, kan vergiftiging plaasvind. Hierdie vergiftiging kan egter nie alleen aan selenium toegeskryf word nie aangesien baie selenium-indikator plante addisionele toksiene mag bevat (Sandholm, 1993 & Spallholz, 1994).

Sekere plante, genoem passiewe akkumulators, kan op seleniumryke grond groei, maar akkumuleer slegs lae vlakke van selenium. Hierdie vlakke kan egter so hoog as 50 mg Se/kg wees en dimetiëlselenied kan ook geproduseer word. Die hoof seleniumkomponent van die nie-akkumulator plante is skynbaar die proteïenagtige aminosuur, selenometionien (Spallholz, 1994). Hierdie groep plante is baie belangrik aangesien dit sekere smaaklike spesies, soos sekere grane, grasse en witklawer, bevat, wat waarskynlik bewei sal word. In hierdie plante kom meeste van die selenium voor in wateroplosbare vorme soos selenaat en seleno-aminosure (Sandholm, 1993).

Selenium kan somtyds toksiese vlakke in water bereik. Dit is hoofsaaklik die gevolg van selenium opname deur plankton. Bakterieë, plankton en alge kan selenium uit die water opneem en dit na organiese vorme omskakel. Sommige alge en plankton spesies kan selenium konsentreer tot baie hoë vlakke, terwyl selenium giftig is vir ander spesies. Daar is gevind dat dreineerwater van besproeiingsgebiede gevaarlik hoë seleniumvlakke kan bevat, wat 'n ernstige nadelige uitwerking op watervoëls en visse kan hê. Daar moet dus meer versigtig gekyk word na huidige regulasies oor voersupplemente en die gebruik van selenium in bemestingstowwe (Sandholm, 1993).

1.4.1 MEGANISMES VAN SELENIUM VERGIFTIGING

Painter (1941) was die eerste persoon om voor te stel dat selenium (seleniet) toksisiteit die gevolg is van sy interaksie met tirole. Hierdie seleniumreaksies is later deur Ganther (1968) en Ganther (1971) ondersoek en gevind dat dit spontaan plaasvind en dat dit geen behoefte aan suurstof het nie. Hy beskryf die reaksies as volg:

- a. $4\text{GSH} + \text{SeO}_2 \rightarrow \text{GSSeSG} + \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
- b. $4\text{GSH} + \text{SeO}_3 \rightarrow \text{GSSeSG} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2\text{O}$

Ganther (1968) vermoed dat selenium toksisiteit die gevolg is van die interaksie van selenium met die disulfiede van proteïene in die vorming van selenotrisulfiede (RSSeSR).

Selenotrisulfiede kan gereduseer word deur oormaat tirole of deur sellulêre glutatioon reduktase om hoogs reaktiewe selenopersulfiede (GSSeH) te vorm. Seko *et al.* (1989) het aangetoon dat

seleniet met glutatioon reageer om H_2Se te vorm en daarna superoksied. Spallholz (1994) het skanderings elektron mikroskopiese bewyse dat seleniet, selenosisteïen en selfs glutatioon peroksidase *in vitro* skade kan aanrig aan die selmembrane van rot eritrosiete. Daar word vermoed dat vrye radikale die oorsaak van hierdie membraanskade kan wees. Soorgelyke skade aan membrane van *E. coli* en *B. subtilis* deur hierdie seleniumverbindings is ook waargeneem deur skanderings elektron mikroskopie.

Yan & Spallholz (1991) het lusigenien versterkte chemiluminisensie gebruik vir die bepaling van superoksied en het die waarnemings van Seko *et al.* (1989) ondersteun dat seleniet met GSH reageer om superoksied te produseer. Verder is ook gevind dat die tiolet, merkaptotoetanol en L-sisteïen, ook met seleniet reageer om superoksied op te wek. Met luminol versterkte chemiluminisensie is ook gevind dat H_2O_2 geproduseer word. Selenaat en selenometionien produseer skynbaar nie superoksied met reaksie tot GSH nie, terwyl selenosistien met GSH reageer onder verskillende pH en tiolkonsentrasies om superoksied te vorm. 'n Reeks *in vitro* studies is op 'n aantal ander seleniumverbindings gedoen om te bepaal of hulle met GSH reageer om superoksied of waterstofperoksied te produseer. Die volgende hipotese is uit hierdie studies afgelei:

1. Seleniumverbindings, soos seleniet en selenium dioksied, kan met GSH en ander tiol reageer om selenotrisulfied te vorm en superoksied en waterstofperoksied te produseer. Hierdie verbindings is toksies.
2. Diseleniede, soos selenosistien en selenosistamien in die teenwoordigheid van GSH en ander tiol, word na selenole ($RSeH$) gereduseer wat katalities van aard is en superoksied en waterstofperoksied produseer. Hierdie verbindings is toksies.
3. Seleniumverbindings wat nie met tiol reageer nie, soos selenaat en seleno-eters ($RSeR$), produseer nie superoksied en waterstofperoksied *in vitro* nie en is nie toksies *per se* nie.
4. Selenaat en seleno-eters is toksies in weefselkulture of *in vivo* slegs nadat dit na seleniet of 'n selenol gereduseer is.
5. Selenium toksisiteit manifesteer homself akute of kronies wanneer oksidatiewe skade groter is as die antioksidant verdediging of die vermoë van plante of diere om selenoproteïene, seleno-eters of element selenium te vorm.

Kroniese seleniet toksisiteit in rotte neem 'n aanvang teen 3-4 dpm dieet selenium. Selenaat, 'n nie-katalitiese en byna nie-sitotoksiese seleniumverbinding *in vitro*, het *in vivo* slegs 'n effens laer toksisiteit wanneer dit aan rotte gevoer word. Die rede hiervoor is omdat selenaat *in vivo*

gereduseer word na seleniet, waarna dit die hoofstroom van selenium metabolisme binnegaan (Young *et al.*, 1982).

Martin & Hurlbut (1974) het gevind dat seleniet meer toksies is as Se-metielselenosisteïen, wat meer toksies is as D,L-selenometionien. Hierdie resultate stem ooreen met die derde hipotese, naamlik dat seleno-eters *in vitro* nie katalities van aard is nie en *in vivo* slegs tot 'n geringe mate toksies is.

Dit is dus duidelik dat ware redoks katalise deur klein organiese selenium bevattende molekules, GSSe^- of RSe^- , superoksied en waterstofperoksied produseer as 'n gevolg van tiol oksidasie. Wanneer tiol oksidasie deur katalitiese selenium verbindings oortref word deur die vermoë van plante of diere om oormatige selenium metaboliete te metileer, ontstaan 'n toestand van selenosis of selenium vergiftiging (Spallholz, 1994).

Seko *et al.* (1989) het aangetoon dat seleniet superoksied in die teenwoordigheid van glutatioon genereer. Hierdie superoksied kan skade aan selle aanrig deur breking en ontbinding van DNA kettings te veroorsaak. Hierdie waarneming word aanvaar as 'n moontlike meganisme van selenium vergiftiging. Breking van DNA kettings is ook *in vivo* waargeneem in die lewers van muise wat seleniet of selenosistien gevoer is. Spallholz (1998) het, met behulp van lusigenien versterkte chemiluminessensie, die verwantskap ondersoek tussen seleniumverbindings en hul vermoë om superoksied *in vitro* te produseer. Sy data toon ook aan dat seleniet, selenium dioksied en 'n aantal diseleniede superoksied in die teenwoordigheid van glutatioon produseer en ook dat ander tiol, soos sisteïen, in die plek van glutatioon, as bron van elektrone gebruik kan word. Spallholz (1998) het ook waargeneem dat seleno-eters, soos selenometionien, nie katalities van aard *in vitro* is nie en baie minder toksies *in vivo* is as seleniet of selenosistamien.

1.4.2 AKUTE EN KRONIESE VERGIFTIGING

Selenium vergiftiging in weidende diere is in 1964 deur Rosenfeld & Beath soos volg geklassifiseer: (1) akute vergiftiging en (2) kroniese vergiftiging.

(i) Akute vergiftiging

Die toksiese dosis is afhanklik van chemiese vorm, metode van toediening, duur van blootstelling en spesie. Akute selenium vergiftiging is by lammers, kalwers, varke, honde en laboratorium knaagdier, geïnduseer deur inspuibare seleniumverbindings (Sandholm, 1993).

Geaffekteerde diere staan met koppe omlaag en hangende ore. Hul liggaamstemperatuur is effens verhoog en die polsslag is vinnig en swak (Rosenfeld & Beath, 1964). Urienekskresie neem toe en die pupille is vergroot. Die mukusmembrane is bleek en verkleur. Dood tree in as gevolg van staking van die respiratoriese sisteem. Intraveneuse dosering van natriumseleniet (2 mg Se/kg liggaamsmassa) aan varke verlaag die sistemiese bloeddruk drasties, terwyl kardiase uitset en hart frekwensie toeneem. Die enigste betekenisvolle effekte van dimetielselenied was 'n verhoogde kardiase uitset (Nebbia *et al.* 1991). Die mees kenmerkende teken van akute selenose is 'n knoffelreuk in die asem, afkomstig van pulmonêre ekskresie van vlugtige selenium metaboliete, soos dimetielselenied. Wanneer muise binne-aars teen gegradeerde vlakke van seleniet gedoseer word, blyk die dodelike dosis van seleniet dié een te wees waar die suur-oplosbare tiol inhoud van die lewer en brein na zero daal (Sandholm, 1993).

Selenium word normaalweg as 'n antioksidant beskou vanweë sy funksie in glutatioon peroksidase. In akute toksisiteit funksioneer selenium as 'n pro-oksidant waar selenium self gereduseer word ten koste van gereduseerde glutatioon. Die toksisiteit van selenium is waarskynlik afkomstig vanaf seleno-diglutatioon trisulfied (GS-Se-SG) of faktore wat intrasellulêre gereduseerde glutatioon verminder. Seleniet is meer toksies wanneer dit in kombinasie met gereduseerde glutatioon intra-veneus toegedien word. Dit is moontlik as gevolg van selenotrisulfied vorming in die ekstrasellulêre spasies. Seleno-diglutatioon trisulfied is waarskynlik die toksiese intermediêr van selenium. Seleniet, wanneer dit gemeng word met gereduseerde glutatioon, vorm dadelik die seleno-diglutatioon-trisulfied (GS-Se-SG) kompleks. Die methaemoglobinaemia wat voorkom is 'n aanduiding van aanhoudende oksidatiewe spanning. Die onderliggende meganisme van akute toksisiteit van selenium is waarskynlik die gepaardgaande oksidatiewe skade. Die veranderinge in intrasellulêre redokssisteme word gekenmerk deur 'n verlaging in gereduseerde glutatioon en NADPH in beide eritrosiete en hepatosiete. Waar diere aan 'n selenium en vitamien E-tekort lei, kan 'n te vinnige vervanging van selenium gevaarlik wees weens die pro-oksidant eienskappe van hoë vlakke van seleniet (Sandholm, 1993).

Hoë konsentrasies selenium kan meeste van die belangrike organe beskadig. Omtrent al die organe word tydens toksikose geaffekteer. Patalogiese bevindinge sluit kongestie en bloeding van die lewer, niere, longe, omasum, pankreas, galblaas, limfknope en milt, in. Lewernekrese kom ook tipies voor (Sandholm, 1993).

(ii) Kroniese vergiftiging

Kroniese vergiftiging word waargeneem as uitputting, gewigsverlies, verlaagde reproduksie, growwe haarkleed met haarverlies, hoofveranderinge wat rondom die koronêre band begin, verlies van die hoewe by beeste, varke en perde, en lamheid. Anemie is algemeen by selenosis in alle spesies. Die hoof teikenweefsels in kroniese selenium vergiftiging is die gekeratiniseerde weefsels. Hierdie toestand staan algemeen bekend as alkali siekte (Sandholm, 1993 & Spallholz, 1994).

Raisbeck *et al.* (1996) het 'n toksikologiese evaluering gedoen van chroniese selenosis in herbivore. Twintig Hereford osse is hooi gevoer met ongeveer 0.3 dpm selenium. Die osse is, na 'n aanpassingsperiode, in 7 groepe gedeel. Hierdie groepe was soos volg: kontrole (basale dieet), seleniet (0.15, 0.28 en 0.8 mg Se/kg lewende massa) en selenometionien (0.15, 0.28 en 0.8 mg Se/kg lewende massa). Die seleniumdosisse wat gegee is, was ongeveer 5, 10 en 25 dpm en is weekliks aangepas volgens die vorige week se liggaamsmassa. Elke seleniumdosis is daagliks geabsorbeer in 80g mieliekopmeel en deeglik per hand gemeng met ongeveer 10 kg gemaalde hooi en 250 g katoensaadmeel. Hooi iname is daagliks gemonitor en aangepas om te verseker dat elke os die volle Se dosis binne 24 uur inneem.

Aan die einde van 'n 120 dae proeftydperk is geen duidelike kliniese effekte, soos lamheid of haarverlies, waargeneem wat aan selenium toegeskryf kan word nie. Die kontrole diere het effens beter gewig opgetel, alhoewel hierdie waarnemings nie betekenisvol was nie. Daar was nie enige aanduiding van anemie in die rooibloedseltelling, hemoglobien of hematokrit nie en geen betekenisvolle verskille kon gevind word in kliniese chemiese parameters soos kreatien, kreatien kinase, bilirubien, glukose, albumien, proteïen of totale bloedseltelling nie (Raisbeck *et al.*, 1996).

Evaluering van bloed in hierdie eksperiment het geen selenium-verwante effekte in enige indeks van die immuunsisteem, wat *in vitro* manipulerings van immunosiete aanbetref, soos interleukien 2 of interleukien 4 produksie, getoon nie. Selenium blootstelling het ook geen invloed gehad op algemene maatstawwe van immuunstatus, soos totale limfosiëttellings of totale immunoglobien konsentrasies in sirkulerende bloed nie. Daar is egter 'n dosis-verwante afname in produksie van spesifieke antiliggamme, in reaksie op vreemde proteïen uitdaging (heneier albumien), gevind. Hierdie vreemde proteïen is toegedien terwyl die osse op hoë selenium diëte was. Primêre antiliggamereaksie het ook by wildsbokke wat aan hoë seleniumvlakke blootgestel was

afgeneem. Die feit dat slegs hierdie antiliggam reaksie tot 'n antigeen afgeneem het terwyl die diere aan hoë selenium blootgestel was, dui daarop dat selenium op 'n manier met primêre immuunreaksie inmeng, eerder as die nie-spesifieke vernietiging van immuunselle. Dit wil dus blyk dat, onder veldtoestande, selenium-geïnduseerde vatbaarheid vir infeksie siektes eerder tot verliese mag lei as direk deur die vergiftiging self (Raisbeck *et al.*, 1996).

Raisbeck *et al.* (1996) het gevind dat die effekte van kroniese blootstelling van die osse aan hoë vlakke van selenium in die dieet, geassosieer word met bloed konsentrasies hoër as 3,0 dpm, lewer konsentrasies hoër as 9,0 dpm en nier konsentrasies hoër as 5,0 dpm. Selenium konsentrasies self was egter nie 'n akkurate voorspeller van selenium-geïnduseerde effekte in hierdie diere nie en kliniese selenosis is geïdentifiseer in diere onder veldtoestande met veel laer konsentrasies.

Die identifikasie van selenosis moet dus gebaseer word op kliniese tekens, patologie sowel as chemiese analise eerder as chemiese analyses alleen (Raisbeck *et al.*, 1996).

1.4.3 ANORGANIESE VS ORGANIESE SELENIUM VERGIFTIGING

Selenium vergiftiging deur plante kan nie direk vergelyk word met vergiftiging deur anorganiese bronne nie, aangesien bakterieë en plante anorganiese selenium makliker na organiese vorme omskakel as diere. Plantselenium is daarom hoofsaaklik in die vorm van seleno-aminosure. Selenometionien en selenosisteïen is minder toksies as selenaat of seleniet in toksisiteitstudies. Aan die ander kant neig die organiese vorme van selenium om meer toksies te wees in kroniese toksiteit studies. Dit vind plaas as gevolg van bio-akkumulering vanweë insluiting van selenium in proteïene (Sandholm, 1993).

Selenium vanaf anorganiese bronne akkumuleer nie in proteïenryke weefsels, byvoorbeeld spiere, soos wat seleno-aminosure doen nie. Dit is 'n belangrike aspek om in ag te neem wanneer die potensiële risiko van weefsels van selenium-gesupplementeerde diere, vir menslike gebruik, bepaal word. Aan die ander kant mag anorganiese selenium komplekse vorm met swawelryke proteïene deur selenotrisulfied (RS-Se-RS) kompleksvorming. Na akute blootstelling aan anorganiese selenium word die hoogste konsentrasies van selenium in metaboliserende en ekskreterende weefsels, die lewer en niere, gevind (Sandholm, 1993).

Selenium vanaf anorganiese bronne akkumuleer binne die eerste minute in die rooibloedselle

nadat dit die sirkulatoriese sisteem binnegegaan het. Die selenium word daarna vrygestel vanuit die rooibloedselle waarna dit opgeneem word deur die lewer, niere, milt, brein en testis. Met die binne-aarse inspuiting van ^{75}Se -seleniet in muise, het dit dadelik die rooibloedselle binnegegaan, maar is weer dadelik binne die volgende paar minute vrygestel. Die radio-aktiewe selenium is daarna deur die lewer, niere en ander organe opgeneem (Sandholm, 1993).

Gemetileerde seleniede is die hoof ekskresie produk van selenium in diere. Teen hoë vlakke van blootstelling word die selenium hoofsaaklik as die trimetielselemonium ioon in die uriene uitgeskei. Uriene bevat ook dikwels ander ongeïdentifiseerde seleniummetaboliete. Dimetielselemonied en dimetieldiselenied is vlugtig en word gevorm wanneer diere uitgedaag word met toksiese selenium dosisse. Die feit dat dimetiel selemonied minder giftig is as gelyke hoeveelhede seleniet, beklemtoon die belang van die metileringsreaksies in die detoksifisering van 'n oormaat selenium. Die doeltreffendheid van metilering en ekskresie deur uitaseming is spesie-afhanklik. S-adenosielmetionien funksioneer as die metieldonor vir die metileringsreaksie (Sandholm, 1993).

Aangesien selenium vanaf selenometionien tot 'n groter mate in die weefsels akkumuleer, is selenometionien moontlik meer chronies toksies as seleniet (Raisbeck *et al.*, 1996).

Een van die doelwitte van die projek deur Raisbeck *et al.* (1996) was om 'n wiskundige verwantskap tussen selenium in die ruvoer en bloed selenium konsentrasies onder veldtoestande daar te stel. So 'n verwantskap kan vergelykings vergemaklik tussen eksperimentele studies en natuurlike siektetoestande. Hulle het gevind dat, onder matige blootstelling, die bloed selenium konsentrasies ongeveer lineêr toeneem met dieet konsentrasie. Die helling (die tempo waarteen verhoogde dieet selenium in verhoogde bloed konsentrasies weerspieël word) was dieselfde vir hooi, weidingsgras en gesuiwerde selenometionien, wat voorstel dat selenium in ruvoer nader is aan selenometionien as aan anorganiese selenium. By hoër blootstellings is die weefselkonsentrasies wat deur anorganiese selenium bereik word, nader aan dié wat deur selenometionien bereik word, moontlik omdat die vernietigingsmeganismes by hoë weefselkonsentrasies geïnhibeer word.

Die feit dat hoër selenium weefselkonsentrasies akkumuleer wanneer herkouers selenometionien gevoer word as seleniet, is problematies in verskeie opsigte. Eerstens, wat is die diagnostiese betekenis van 'n sekere selenium konsentrasie in die bloed of weefsel wanneer die chemiese vorm

wat ingeneem is, onbekend is? Dit is 'n moontlike verduideliking vir die teenstrydighede in die literatuur ten opsigte van weefselkonsentrasies in selenosis. Weefselkonsentrasie alleen is dus nie voldoende kriteria vir diagnose van seleniumvergiftiging nie. Tweedens, wat is die toksikologiese betekenis van 'n gegewe dieet konsentrasie indien die dieetbron selenometionien was? Daar is vir jare lank voorgestel dat dieet selenometionien akkumuleer nie-spesifiek in weefselproteïene waar dit relatief onskadelik is (Stadtman, 1991). Eksperimente met laboratorium knaagdiere het egter getoon dat kroniese dieet selenometionien meer toksies is as anorganiese seleniumsoute (Waschulewski & Sunde, 1988). Dit is moontlik dat die groter bioakkumulasie van selenometionien 'n groter seleniumpoel verskaf as seleniet om dit dus potensieel meer toksies te maak na volgehoue blootstelling.

Wilber (1993) het gevind dat die kroniese inname van óf selenaat óf seleniet, byna dieselfde vergiftiging teweeg bring. Volgens Spallholz (1994) het die dieet inname van organoselenium verbindings 'n baie breër spektrum van vergiftiging. Martin & Hurlbut (1976) het gevind dat, op 'n ekwivalente seleniumbasis, is die toksisiteit van selenosistien ongeveer dieselfde as seleniet. Selenometionien is egter gevind om minder toksies te wees as seleniet met die L-isomeer slegs effens meer toksies as die D-isomeer (Stewart *et al.*, 1991; Willhite *et al.*, 1992). Martin & Hurlbut (1976) het verder ook gevind dat Se-metielselenosisteïen, die nie-proteïenagtige aminosuur wat in selenium akkumulator plante gevind word, 'n laer of vertraagde toksisiteit in muise veroorsaak. Ander seleno-eters, dimetielselenied en trimetielselenonium ioon is nie baie toksies in vegelyking met seleniet nie (McConnell & Portman, 1952; Ip & Ganther, 1992).

1.5 MOTIVERING VIR STUDIE

Vrye radikale word gedurig in die liggaam gevorm. Die hoof teikens vir vrye radikaal reaksies is die onversadige bindings in die lipiede van sellulêre membrane, deur die proses van lipiedperoksidasie. Daar vind 'n verlies van membraanvloeibaarheid en reseptor rangskikking plaas, met potensiële sellulêre afbraak (Bendich, 1990). Nukleïensure word aangeval met gevolglike veranderinge aan proteïene, ensieme en hormone, wat nadelig kan wees vir die hele organisme (Karlmark, 1993). 'n Aktiewe immuunreaksie veroorsaak die produksie van groot hoeveelhede reaktiewe suurstofmolekules en vrye radikale, wat die omringende weefsel, maar ook makrofage self, kan vernietig, wat dus tot 'n verlaging in die doeltreffendheid van die immuunsisteem kan lei (Nockels, 1996).

Verskeie natuurlike verbindings, bekend as antioksidante, bestaan, wat vrye radikale kan inaktiveer. 'n Belangrike antioksidant is die selenoproteïen, glutatioon peroksidase, waarvan selenium 'n essensiële komponent is (Nockels, 1996). Aandag was vir die eerste maal op selenium gevestig in die vroeë 1930's met die identifisering van die element as die toksiese bestanddeel in plante wat haarverlies, lamheid hoefverweer en dood in weidende diere veroorsaak. Selenium was egter in 1957 beskryf as 'n essensiële spoorelement wat in klein hoeveelhede deur die liggaam benodig word. Dit het gelei tot die gebruik van selenium supplemente – soms in oormaat. Die potensiële gevaar van oordosering is groot as gevolg van die besondere lae 'terapeutiese indeks' van selenium. Oordosering mag voorkom as gevolg van foutiewe vervaardiging van voormengsels, gelyktydige suplementering van selenium deur verskeie roetes of inname van sekere selenium akkumulator plante (Twomey *et al.*, 1977; Sandholm, 1993).

Selenium is, in teenstelling met die meeste ander noodsaaklike spoorelemente, beskikbaar in verskillende chemiese vorme wat vir suplementeringsdoeleindes geskik is (Nève, 1994). Die waarde van die verskillende vorme waarin selenium aan diere gesupplementeer word, is steeds onduidelik. Anorganiese selenium se biobeskikbaarheid is laer in herkouers as in die monogastriese dier vanweë die anaerobiese toestande in die rumen en reduksie van seleniet na meer onoplosbare verbindings (selenied) deur die rumenmikrobe (Van Ryssen *et al.*, 1989; Hakkarainen, 1993; Wolfram, 1999). Organiese selenium, in die vorm van seleno-aminosure, vloei gewoonlik deur die rumen en word geabsorbeer terwyl die selenium behoue bly en doeltreffend benut word (Mahan, 1999). Heelwat data dui op 'n hoër biobeskikbaarheid van

organiese seleniumverbindings teenoor anorganiese bronne, in terme van seleniumvlakke in weefsels (Van Ryssen *et al.*, 1989; Nève, 1994; Mahan & Parrett, 1996; Raisbeck *et al.*, 1996; Mahan, 1999; Wolfram, 1999). 'n Groot gedeelte van hierdie selenium mag in weefsel proteïene as selenometionien eindig en word, indien enigsens, slegs aan die dier beskikbaar gestel met proteïen katabolisme. Anorganiese seleniumbronne soos natriumseleniet kan egter ook, veral by hoë innames, 'n pro-oksidatiewe effek in die liggaam hê, waar selenium self gereduseer word ten koste van gereduseerde glutatioon (Sandholm, 1993).

Die volgende vrae kan dus gevra word:

1. Tot watter mate is die antioksidatiewe eienskappe van selenium bevordelik vir die immuunfunksies.
2. Wat is die effek van hoë innames van organiese en anorganiese selenium op die immuunsisteem van die liggaam? Het die pro-oksidant eienskappe van hoë vlakke van seleniet 'n nadelige uitwerking op die immuunsisteem en is dit moontlik dat die hoë vlak van akkumulasie van organiese selenium in die weefsels, die liggaam tot 'n mate beskerm teen die effekte van 'n hoë seleniuminname?

Daar is in hierdie studie gepoog om meer duidelikheid omtrent bogenoemde probleemstellings te verkry. Antiliggaamproduksie, superoksiedproduksie deur fagosiete en die onderlinge verhouding tussen CD4⁺ T limfosiete, CD8⁺ T limfosiete en B limfosiete word as parameters van die immuunsisteem bestudeer. Kreatien kinase in serum word ontleed as aanduider van weefselskade, terwyl die grootte van die lever ook tot 'n mate op toksisiteit kan dui.

HOOFSTUK 2:

PROSEDURE

2.1 DIERE

Twee-en-vyftig Vleismerino lammers van 2-tand ouderdom is vir die studie gebruik. Die diere is op die Proefplaas van die Universiteit van Pretoria aangehou vir die duur van die studie. Die diere is kort na hul aankoms op die proefplaas met 15 ml Multispec (Jansen) gedosseer en 'n maand later met 1 ml Dectomax (Pfizer) ingespuut. Die skape is kort voor die aanvang van die proefperiode en daarna net voordat hulle geslag is, geweeg.

2.1.1 Behuising

Die diere is vir 'n vooraf periode van ongeveer 3 maande saam in 'n kraal aangehou. Die skape is hierna, vir 'n periode van 5 maande, na individuele hokke verskuif.

2.1.2 Voeding

Die skape het tydens die vooraf periode ad lib *Eragrostis curvula* en ongeveer 100 g sjokolademielies per skaap ontvang. Beide die hooi en die mielies het 'n lae gemiddelde selenium inhoud, van onderskeidelik 0.16 dpm en 0.3 dpm, gehad. Die doel van die vooraf periode was om die bloed selenium vlakke van die skape te laat daal na minder as 60 ng selenium/ ml volbloed.

Tydens die 5 maande proeftydperk is die skape individueel gevoer sodat innames deeglik gekontroleer kon word. Tydens hierdie periode het die skape ongeveer 1kg hooi en 380g konsentraat ontvang. Die konsentraat het uit die volgende bestaan:

- * 90% geel mieliemeel
- * 6,5% molassemeel
- * 2,6% voergraad ureum
- * 0,9% voerkalk

2.1.3 Groepindeling

Die skape is ewekansig in blokke volgens lewendige gewigte ingedeel en daaruit ewekansig in sewe groepe verdeel, sodat die verskillende grootte diere sover moontlik eweredig tussen die groepe versprei was. Die sewe groepe het die volgende behandelings ontvang:

Groep	Aantal diere	Selenium supplementering per dag
Kontrole	10	Geen
Groep 1	7	6 mg organiese Se
Groep 2	7	1,8 mg organiese Se
Groep 3	7	0,75 mg organiese Se
Groep 4	7	6 mg anorganiese Se
Groep 5	7	1,8 mg anorganiese Se
Groep 6	7	0,75 mg anorganiese Se

Die selenium supplement is met behulp van 'n meganiese menger deeglik in die konsentraat ingemeng.

Vir die organiese selenium supplement is daar van 'n seleniumryke gis gebruik gemaak wat deur Alltech (Pty) Ltd. (Kentucky, VSA) vervaardig word en as SelPlex 50 bekend staan. Hierdie gis het 'n seleniuminhoud van 0,2% gehad.

Natriumseleniet (Na_2SeO_3) (Merck; Darmstad, Duitsland), met 'n seleniuminhoud van 45,66% is as bron van anorganiese selenium gebruik. Vir die hoë vlak selenium diëte is 3g gis en 13,1mg natriumseleniet per skaap per dag gebruik, vir die medium vlak selenium diëte is 0,9g gis en 3,94mg natriumseleniet gebruik en vir die lae vlak selenium diëte is 0,375g gis en 1,643mg natriumseleniet gebruik.

Grypmonsters is een maal per week van die verskillende konsentraatvoere en die hooi geneem. Al die grypmonsters van die hooi is saamgepoel en 'n verteenwoordigende monster is elke tweede maand ontleed vir seleniumkonsentrasie. Die grypmonsters van die konsentraat van elke groep is ook gepoel, sodat verteenwoordigende monsters van die verskillende groepe se konsentraatvoere verkry is en ook, saam met die hooi, vir seleniumkonsentrasie ontleed is.

2.2 MONSTERNEMING EN LABORATORIUMANALISES

2.2.1 Bepaling van seleniumvlakke

.0.0.. @ @ Monsterneming

Bloed- en plasmamonsters

Seleniumkonsentrasie in die volbloed is na 4 maande en weer na 5 maande (kort voordat die diere geslag is), bepaal. Bloedmonsters is vanuit die nekaar van die skape in heparienbuis versamel. Plasma is verkry deur volbloed af te swaai teen 1200g vir 5 minute. 'n Beckman (Model TJ6) sentrifuge is gebruik.

Weefselmonsters

Na die 5 maande proeftydperk is die skape geslag, karkasmassa is bepaal en die volgende monsters is versamel:

- Hartspier: Die onderste punt van die hart is geneem en alle sigbare vet is verwyder
- Nierkorteks: Die korteksgedeeltes van albei die niere is noukeurig met 'n lemmetjie van die medulla geskei
- Lewer: Vier verskillende gedeeltes van omtrent 30 g elk en van ongeveer dieselfde lokaliteit is
van elke lewer versamel. Voordat die monsters geneem is, is die lewers eers geweeg sodat die lewermassa, as persentasie van karkasmassa, bereken kon word.
- Spier: 'n Gedeelte van die *Longissimus dorsi* spier, aan die bokant van die laaste en tweede laaste rib, is versamel. Alle sigbare vet is verwyder.

2.2.1.2 Prosedure vir die bepaling van seleniumvlakke

Die seleniumvlakke in die monsters is volgens die hidried generator metode op 'n Perkin-Elmer (Norwalk, Connecticut, VSA) Atoom Absorpsie Spektrofotometer (A.A.) (model 2380) bepaal.

1 ml Se standaard (20, 50, 100 en 200 dpm), 0.5 ml volbloed of plasma, 2 g voer of 1 g lewer, nier, hart of spier is in suur-gewaste kultuur buise afgeweeg. Daar is 1 g van 'n beeslewer kontrole (National Institute of Standards and Technology, 1577b; Gaithersburg, MD) gebruik.

5 ml van 'n 1: 4 HClO₄: HNO₃ mengsel is by die monsters gevoeg.

Die buise is op 'n programmeerbare verteringsblok geplaas met die volgende program:

- 4 ure teen kamertemperatuur.
- 1 uur vanaf kamertemperatuur na 100 °C.
- 1 uur teen 100 °C.
- 1 uur vanaf 100 °C op na 180 °C.
- 6 ure teen 180 °C.
- 2 ure vanaf 180 °C af na 130 °C.
- 1 uur teen 130 °C.

Die buise is daarna vanaf die blok verwyder en vir ongeveer 10 min laat staan om na kamertemperatuur af te koel. Hierna is 1 ml van 20% HCl in die buise gevoeg en weer op die blok geplaas vir 'n verdere 40 minute om sodoende selenium VI na selenium IV te reduseer. Tydens hierdie 40 minute is die A.A. volgens die gebruikershandleiding opgestel. Daar is by 'n golflengte van 196 nm en 'n lampstroom van 8 mA gewerk. Die buise is daarna van die blok verwyder en laat afkoel tot kamertemperatuur, waarna dit tot 10 ml opgevol is met 10% HCl. Houers op die Varian dampsisteem (Mulgrave, Australië) (model VGA-77) van die A.A. is met 20% HCl en Na(BH₄) gevul. Om die Na(BH₄) op te maak is 1,2 g Na(BH₄) opgelos in 200 ml van 0,5% NaOH.

Die dampsisteem is gekalibreer om 'n vloeï van 4 ml per minuut Na(BH₄) en 8 ml per minuut HCl te lewer. Die draergas (stikstof of Argon) het 'n vloeitempo van 400 ml per minuut gehad. Die absorbansies van die blanko, standaard en monsters is op die A.A. gelees en 'n kurwe is bepaal. Die lesings is daarna geneem.

2.2.2 Chemiluminessensie

Superoksiedproduksie van forbol 12-miristaat 13-asetaat (PMA) - gestimuleerde fagosiete in volbloed, is deur 'n lusigenien (bis-N-metiel-akridinium nitraat)-versterkte chemiluminessensie metode, wat as 'n betroubare aanwyser van superoksied beskou word (Seko *et al.*, 1989; Spallholz & Boylan, 1989; Yan & Spallholz, 1991; Faulkner & Fridovich, 1993), bepaal.

Hierdie bepaling is 90 dae na die aanvang van die seleniumplesmentering van die skape, gedoen.

Om stolling te voorkom is 10ml vars getrekte volbloed, vanuit die nekaar van die skape, met 0.1 ml steriele preserveermiddelvrye heparien (500 eenhede per ml H₂O), gemeng. Die bloedmonsters is binne 6 uur nadat dit geneem is, ontleed.

Lusigenien is vooraf opgemaak teen 'n konsentrasie van 1 mg lusigenien/ 1 ml Hanks se gebalanseerde soutoplossing (pH 7.4) en is by -20°C gevries. PMA is opgemaak teen 'n konsentrasie van 1 mg PMA / 1 ml etanol en 20 µl van hierdie oplossing is net voor gebruik, by 1 ml Hanks gevoeg. Alle media is teen kamertemperatuur gebruik.

Die volgende reaksiemengsels, opgemaak in polipropileenbuisies (45 mm x 10 mm) is gebruik:

	<u>Ongestimuleerde selle</u> <u>(agtergrond)</u>	<u>Gestimuleerde selle</u>
Hanks se gebalanseerde soutoplossing (pH 7.4)	850 µl	750 µl
Lusigenien	100 µl	100 µl
Volbloed	50 µl	50 µl
Inkubeer vir 60 min teen 37°C		
PMA (stimulant)	-	100 µl

PMA is direk na inkubasie by die mengsel gevoeg, waarna die monsters onmiddelik in 'n LKB Wallac (Turku, Finland) chemiluminometer (model 1251) geplaas is om spontane en PMA-geaktiveerde lusigenien-versterkte chemiluminessensie reaksies te meet. Die lesings is vir 5 sekonde intervalle geïntegreer en as millivolts per sekonde (mV s⁻¹) uitgedruk. Die piekwaarde, wat binne ongeveer 10 - 20 minute bereik is, is as die finale waarde geneem.

2.2.3 Antiliggaamtiter

Perdebloed is vanuit die nekaar, in buise wat heparien bevat het, versamel. Die eritrosiete en plasma is deur sentrifugering teen 1200 g in 'n Beckman sentrifuge (model TJ6) geskei. Die eritrosiete is versamel en drie maal in 40 ml fosfaat-gebufferde saline (PBS) (pH 7.4) gewas. Die gewaste eritrosiete is opgemaak tot 'n 30% hematokrit met PBS. Daar is deurentyd steriel te werk gegaan.

Die skape is twee keer met 0.5 ml elk van hierdie suspensie van perd eritrosiete in die nekaar

ingespuut. Die eerste inspuiting is 100 dae na die aanvang van seleniumplesmentering toegedien, en die tweede inspuiting het drie weke daarna gevolg. Bloedmonsters is in stolbuis vanuit die nekaar, vóór die eerste inspuiting, 2 en 3 weke daarna en 1 week na die tweede inspuiting, geneem.

Die serum is verkry deur die gestolde bloed teen 1200 g vir 5 minute af te swaai. Die serum is daarna vir 30 minute teen 56°C geïnkubeer, om die komplement te inaktiveer.

Plasma titers van anti-perd eritosiet antiliggame is deur passiewe hemagglutinasie bepaal deur gebruik te maak van perd eritosiete. Dieselfde perd is deurentyd gebruik vir die duur van die studie. Daar is 125 µl PBS in elke putjie van 'n 96 put V-bodem titerplaat plaat gevoeg. Onverdunde skaap serummonsters (wat vooraf by 56°C vir 30 minute geïnkubeer is om die komplement te inaktiveer) is in duplikaat rye in kolom 2 gevoeg. Die monsters in kolom 2 is opeenvolgend verdun deur telkens 125 µl van die serum, na deeglike vermenging met die PBS, na die aangrensende kolom oor te dra. In kolom 12 is die serum en PBS gemeng en 125 µl hiervan verwyder. Perd eritosiete 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 geles. Die antiliggamtiters is geneem as die hoogste verdunning waar heamagglutinasie plaasgevind het. Die 1:1 verdunning is 'n waarde van 1 toegeken, terwyl die 1:2 verdunning 'n waarde van 2, 1:4 'n waarde van 3, ensovoorts, toegeken is. Kolom 1, wat slegs PBS en perd eritosiete bevat het, het as negatiewe kontrole gedien (Nicholson *et al.*, 1993).

2.2.4 Vloesitometrie

Volbloed is, 95 dae na die aanvang van seleniumplesmentering, vanuit die nekaar van die skape in EDTA buise versamel. Die bloed is afgeswaai teen 1200 g (2500 rpm) vir 25 minute en toegelaat om vry te stop. Hierdie afswaai staan as die 'Buffy Coat Spin' bekend. Die boonste wit lagie, wat uit witbloedselle bestaan, is afgehaal.

Vorbereiding van T limfosiete vir vloesitometrie:

1. Die selsuspensie is teen 250 g vir 10 min by 10 °C afgeswaai en die bo-stand is verwyder.
2. Die selle is daarna gehersuspendeer in 1-2 ml RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, VSA) en weer getel.
3. Die selle is nou uitgeplaat teen 2×10^5 selle per 50 µl in 'n 96 put V-bodem plaat.
4. 50 µl van die geskikte antiliggam, wat in FACS medium (Beckman-Coulter; Miami, VSA)

(RPMI 1640, 0,2% NaN₃) verdun is, is in elke putjie gevoeg.

Die volgende antiligggame is gebruik:

<u>Antiligggame</u>	<u>Isotipe</u>	<u>Spesifisiteit</u>
GC50A1	IgM	α CD4 T limfosiete
CACT80C	IgG ₁	α CD8 T limfosiete
BAQ44A	IgM	$\alpha\beta$ B limfosiete (nog nie voorheen op skape gebruik nie)

Alle antiligggame is vanaf Washington State University, Department Veterinary Microbiology and Pathology, Monoclonal Antibody Centre, verkry. Die antiligggame is teen 'n 15 μ g/ml finale konsentrasie gebruik.

- Die plate is daarna op ys vir 25 - 30 minute geïnkubeer om binding te bevorder.
- 100 μ l FACS medium (Beckman-Coulter) is nou by elke putjie gevoeg en die plate is teen 300g vir 3 min teen 10°C, gesentrifugeer.
- Vloeistof is uit die putjies verwyder deur die plaat vinnig om te keer. Die selle is op 'n menger gehersuspendeer.
- 200 μ l FACS medium is by elke putjie gevoeg en teen 300 g vir 3 minute geswaai by 10°C. Hierdie wasproses is nog 2 maal herhaal (3 maal was in totaal).
- Na hersuspendering van die selle is 50 μ l van die sekondêre bygevoeg.
- Die plate is vir 30 minute in die donker op ys geïnkubeer om binding te bevorder.
- Die selle is daarna gewas soos in stappe 7 en 8.
- Na hersuspendering van selle is 200 μ l FACS fikseermiddel (2% formaldehyd in PBS; Beckman-Coulter) bygevoeg en in die yskas in die donker vir minstens 30 minute geplaas. Die selle kan in die yskas gestoor word totdat dit nodig word.
- Die CD4⁺ en CD8⁺ T limfosiete, sowel as die B limfosiete, is as persentasie van totale witbloedselle bereken deur van 'n Coulter EPICS XL MCL Vloeisitometer (Beckman-Coulter) gebruik te maak. Standaard prosedures is gevolg.

2.2.5 Kreatien Fosfokinase

Volgens Nockels (1996) is weefselmembraan skade een van die gevolge van 'n opeenhoping van vrye radikale. Die vernietiging van membrane lei tot uitlekking van ensieme vanuit selle wat dan die sirkulasie binnegaan. Kreatien fosfokinase in plasma en serum is 'n sensitiewe aanduider van

weefselkade en kan gebruik word in die diagnose van spiersiektes soos Duchenne progressiewe spierdistrofie (Szazs *et al.*, 1976) en spierdistrofie in kalwers (Reddy *et al.*, 1987).

Kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum is na een maand (ongeveer 30 dae) en daarna weer na 3 maande (ongeveer 90 dae) nadat seleniumsupplementering 'n aanvang geneem, bepaal.

Bloedmonsters is vanuit die nekaar in stolbuis versamel en afgeswaai teen 1200g vir 5 minute. Die serum is afgetrek en in 5 ml buis versamel. Die serum is daarna weer afgeswaai om seker te maak dat geen rooibloedselle teenwoordig is nie.

'n Technicon RA-1000[®] sisteem (Alsatech) is gebruik vir bepaling van kreatien kinase aktiwiteit in die serum. Die reagent wat gebruik word, bevat N-asetielsisteïen om kreatien kinase aktiwiteit te herstel en te heraktiveer in die serummonster. Kreatien kinase reageer met kreatien fosfaat en ADP om ATP te vorm, wat gekoppel is aan die heksokinase/GDP reaksie en NADPH vorm. Die tempo van produksie van NADPH, wat teen 340 nm absorbeer, is direk proporsioneel aan die kreatien kinase aktiwiteit in die monster.

Die kreatien kinase reagents van Bayer, produk no. T11-1880-02, is vir die analise gebruik. 'n Kontrole vir ensiem aktiwiteit, Humatrol P (Boehringer-Mannheim), is gebruik.

2.2.6 Statistiese analise

Data is onderwerp aan variansie-analise (ANOVA) deur gebruik te maak van die GLM (General Linear Models) prosedure van SAS[®] (Uitgawe 6) (SAS Institute, Inc., North Carolina, 1990). Die Fishertoets van SAS is gebruik om onderlinge verskille tussen die verskillende groepe aan te dui. Alle verwysings wat gemaak is aangaande betekenisvolheid, is gebasseer deur toetsing teen die $P < 0.05$ vlak.

HOOFSTUK 3

RESULTATE

3.1 SELENIUMVLAKKE IN DIE VOER

Die konsentraat en hooi is deurlopend tydens die studie ontleed vir seleniumkonsentrasie. Die gemiddelde seleniumkonsentrasie van die hooi oor die 5 maande proefperiode was 0.16 mg/kg droë materiaal (DM) gewees. Aangesien die diere 'n gemiddelde hooi-inname van ongeveer 1 kg per dag (900g DM) gehad het oor die 5 maande proefperiode, word daar aangeneem dat 'n seleniuminname van 0.14 mg per dag deur die hooi, gehandhaaf was.

Die gemiddelde seleniumkonsentrasies van die verskillende konsentraatmengsels (waarvan ongeveer 340g DM per dag gevoer is), was soos volg:

- Kontrole: 0.711 mg/kg DM
- Groep 1: 18.26 mg/kg DM
- Groep 2: 4.947 mg/kg DM
- Groep 3: 2.553 mg/kg DM
- Groep 4: 17.94 mg/kg DM
- Groep 5: 4.674 mg/kg DM
- Groep 6: 2.495 mg/kg DM

Die gemiddelde totale selenium inname (deur die hooi en konsentraat) per dag van die skape oor die 5 maande proefperiode, was dus soos volg:

- Kontrole: 0.38 mg/dag (geen seleniumplesiment in die voer nie)
- Groep 1: 6.35 mg/dag (6 mg organiese selenium in die voer gesupplementeer)
- Groep 2: 1.82 mg/dag (1.5 mg organiese selenium in die voer gesupplementeer)
- Groep 3: 1.01 mg/dag (0.75 mg organiese selenium in die voer gesupplementeer)
- Groep 4: 6.23 mg/dag (6 mg anorganiese selenium in die voer gesupplementeer)
- Groep 5: 1.73 mg/dag (1.5 mg anorganiese selenium in die voer gesupplementeer)
- Groep 6: 0.99 mg/dag (0.75mg anorganiese selenium in die voer gesupplementeer)

3.2 SELENIUMVLAKKE IN VOLBLOED, PLASMA EN WEEFSELS

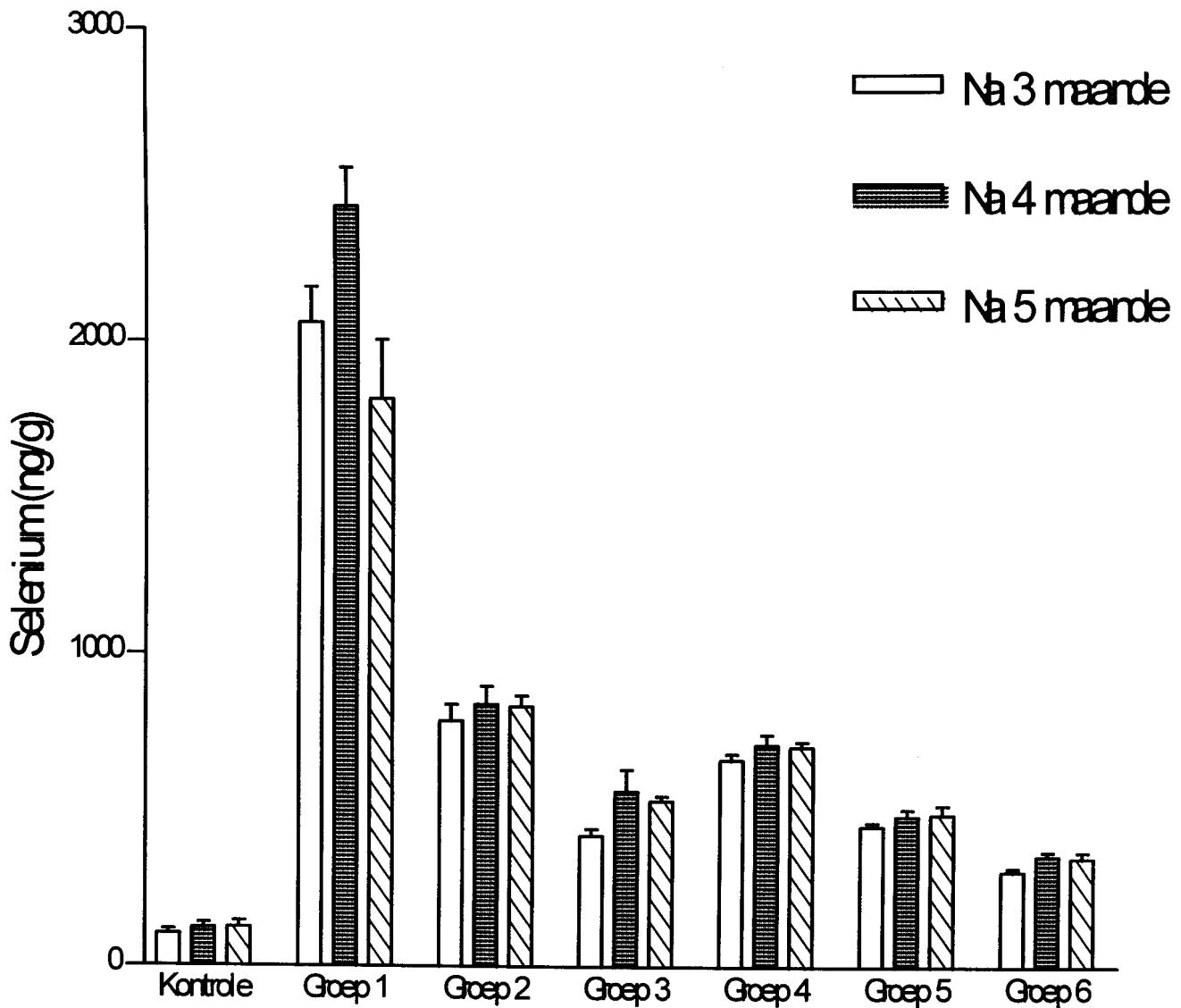
Seleniumvlakke in die volbloed is na 3 maande, 4 maande en 5 maande, na die aanvang van suplementering met verskillende konsentrasies organiese en anorganiese selenium, bepaal. Hierdie resultate word in Tabel 3.1 opgesom en in Figuur 3.1 grafies voorgestel.

Tabel 3.1 Gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed, 3, 4 en 5 maande na aanvang van seleniumsuplementering van die verskillende groepe (ng/g $\pm$ standaardfout van die gemiddeld)

	Kontrole Geen	Groep 1 6 mg/dag	Groep 2 1.5 mg/dag	Groep 3 0.75 mg/dag	Groep 4 6 mg/dag	Groep 5 1.5 mg/dag	Groep 6 0.75 mg/dag	p – waarde ¹ (R kwadraat)
		Organiese Se			Anorganiese Se			
Na 3 maande	103.7 $\pm$ 15.16	2060 $\pm$ 116.2	789.2 $\pm$ 52.98	422.6 $\pm$ 22.84	665.4 $\pm$ 21.74	454.9 $\pm$ 10.53	308.7 $\pm$ 12.98	0.0001 (0.9605)
Na 4 maande	124.2 $\pm$ 16.49	2435 $\pm$ 123.9	840.3 $\pm$ 58.63	566.4 $\pm$ 69.55	713.2 $\pm$ 31.89	486.0 $\pm$ 22.81	357.6 $\pm$ 16.61	0.0001 (0.9591)
Na 5 maande	125.8 $\pm$ 21.30	1817.1 $\pm$ 189.7	833.1 $\pm$ 36.20	536.5 $\pm$ 14.90	706.7 $\pm$ 17.10	491.2 $\pm$ 30.60	351.5 $\pm$ 20.10	0.0001 (0.8885)
p-waarde ¹ (R kwadraat)	0.6267 (0.034)	0.0264 (0.332)	0.7421 (0.033)	0.0701 (0.256)	0.3449 (0.112)	0.4917 (0.076)	0.1086 (0.219)	

¹ P<0.05 is betekenisvol

Al die groepe, buiten groep 1, wat 6 mg organiese selenium per dag ontvang het, se gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed het vanaf die derde maand na aanvang van seleniumsuplementering tot die vierde maand na aanvang van suplementering, slegs effens gestyg (nie betekenisvol nie) en daarna konstant gebly. Groep 1 se seleniumvlakke in die volbloed het ook effens gestyg tussen die derde en vierde maand van suplementering, maar het daarna 'n skerp betekenisvolle daling ($p<0.05$) getoon.



Figuur 3.1 Gemiddelde seleniümvlakke in die volbloed van die verskillende groepe¹, 3 maande, 4 maande en 5 maande na aanvang van seleniümsupplementering (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen seleniüm supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese seleniüm / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese seleniüm / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese seleniüm / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese seleniüm / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese seleniüm / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese seleniüm / dag

Die verskillende seleniumvlakke wat verkry is in volbloed, plasma, hartspier, lewer, nierkorteks en *Longissimus dorsi* spier na 5 maande van supplementering met verskillende konsentrasies organiese en anorganiese selenium, is opgesom in Tabel 3.2 en word grafies voorgestel in Figure 3.1 tot 3.6.

Tabel 3.2 Gemiddelde seleniumvlakke in volbloed, plasma, hartspier, lewer, nierkorteks en *Longissimus dorsi* spier, met slag (5 maande na aanvang van seleniumsupplementering) (ng/g $\pm$ standaardfout van die gemiddeld) (sien tabelle 3.3 tot 3.8 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen groepe)

	Kontrole Geen	Groep 1 Organiese Se 6 mg/dag	Groep 2 1.5 mg/dag	Groep 3 0.75 mg/dag	Groep 4 6 mg/dag	Groep 5 1.5 mg/dag	Groep 6 0.75 mg/dag	p - waarde ¹ (R kwadraat)
Volbloed	125.8 $\pm$ 21.3	1817.1 $\pm$ 189.7	833.1 $\pm$ 36.2	536.5 $\pm$ 14.9	706.7 $\pm$ 17.1	491.2 $\pm$ 30.6	351.5 $\pm$ 20.1	0.0001 (0.8885)
Plasma	45.74 $\pm$ 6.6	762.4 $\pm$ 27.1	326.1 $\pm$ 17.1	211.4 $\pm$ 5.1	435.6 $\pm$ 26.5	243.5 $\pm$ 16.6	167.6 $\pm$ 6.1	0.0001 (0.9646)
Hart ^{2,4}	789.5 $\pm$ 98.4	16400.0 $\pm$ 625.3	5479.0 $\pm$ 221.4	3056.0 $\pm$ 136.9	3402.0 $\pm$ 112.3	2349.0 $\pm$ 127.6	1564.0 $\pm$ 61.65	0.0001 (0.9831)
Lewer ⁴	975.5 $\pm$ 102.8	25180.0 $\pm$ 2253.0	12050.0 $\pm$ 1550.0	5432.0 $\pm$ 971.9	16480.0 $\pm$ 3199.0	7400.0 $\pm$ 1681.0	4071.0 $\pm$ 710.0	0.0001 (0.7605)
Nier ^{3,4}	6795 $\pm$ 355.5	30300 $\pm$ 1645.0	14490 $\pm$ 935.3	9897 $\pm$ 398.0	15590 $\pm$ 797.7	10690 $\pm$ 612.8	8836 $\pm$ 364.1	0.0001 (0.9273)
Spier ^{2,4}	300.5 $\pm$ 46.6	10780 $\pm$ 1499.0	3743 $\pm$ 153.6	2838 $\pm$ 1046.0	1796 $\pm$ 66.5	1095 $\pm$ 101.3	559.3 $\pm$ 71.73	0.0001 (0.8019)

1. P = 0.0001 is hoogs betekenisvol
2. Alle sigbare vet verwyder
3. Nierkorteks
4. Waardes op droë materiaal basis

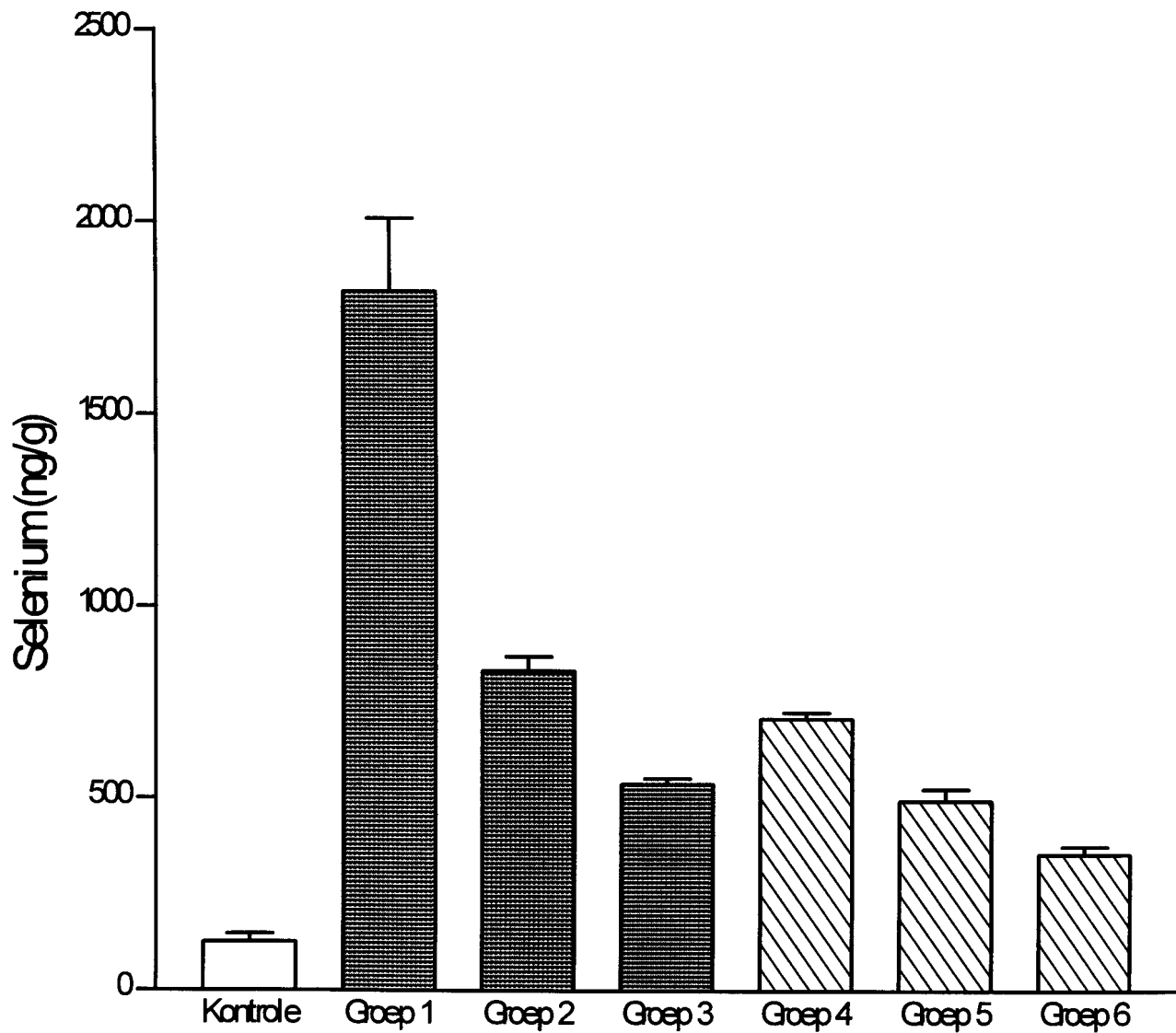
3.2.1 Gemiddelde seleniumvlakke in volbloed

Daar was 'n duidelike dosisrespons gewees in die seleniumvlakke in die volbloed, by die verskillende groepe wat organiese selenium ontvang het, sowel as by die groepe wat anorganiese selenium ontvang het (Figuur 3.2). 'n Hoë R^2 waarde van 0.8885 is verkry (Tabel 3.2) wat daarop dui dat seleniumvlakke in die volbloed tot 'n hoë mate afhanklik is van beide die vlak van selenium supplementering asook die chemiese vorm van die seleniumsupplement. Die seleniumvlakke in die volbloed van die kontrolegroep, wat geen selenium supplement ontvang het nie, was betekenisvol laer gewees as die seleniumvlakke in die volbloed van die groepe wat selenium as 'n supplement ontvang het (Tabel 3.3). Vanuit die p-waardes in Tabel 3.3, is dit ook duidelik dat die groepe wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1) en 1.5 mg/dag (groep 2) ontvang het, albei betekenisvol hoër gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed gehad het as die groepe wat, onderskeidelik, met anorganiese selenium teen 6 mg/dag (groep 4) en 1.5 mg/dag (groep 5) gesupplementeer is. Daar was egter nie 'n betekenisvolle verskil tussen die gemiddeld van groep 3, wat 0.75 mg/dag organiese selenium ontvang het, en groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, nie. Groep 2, asook groep 3, se gemiddelde volbloed seleniumvlakke het nie betekenisvol verskil van dié van groep 4 nie, terwyl groep 3 ook nie betekenisvol verskillend was van groep 5 nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die volbloed was betekenisvol tot hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.3 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0004	0.0223
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0001	0.0001	.	0.0063	0.2281	0.0019	0.0001
Groep 3	0.0001	0.0001	0.0063	.	0.1067	0.6641	0.0804
Groep 4	0.0001	0.0001	0.2281	0.1067	.	0.0430	0.0013
Groep 5	0.0004	0.0001	0.0019	0.6641	0.0430	.	0.1833
Groep 6	0.0223	0.0001	0.0001	0.0804	0.0013	0.1833	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.2 Gemiddelde seleniumvlakke in die volbloed van die verskillende groepe¹, met slag (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

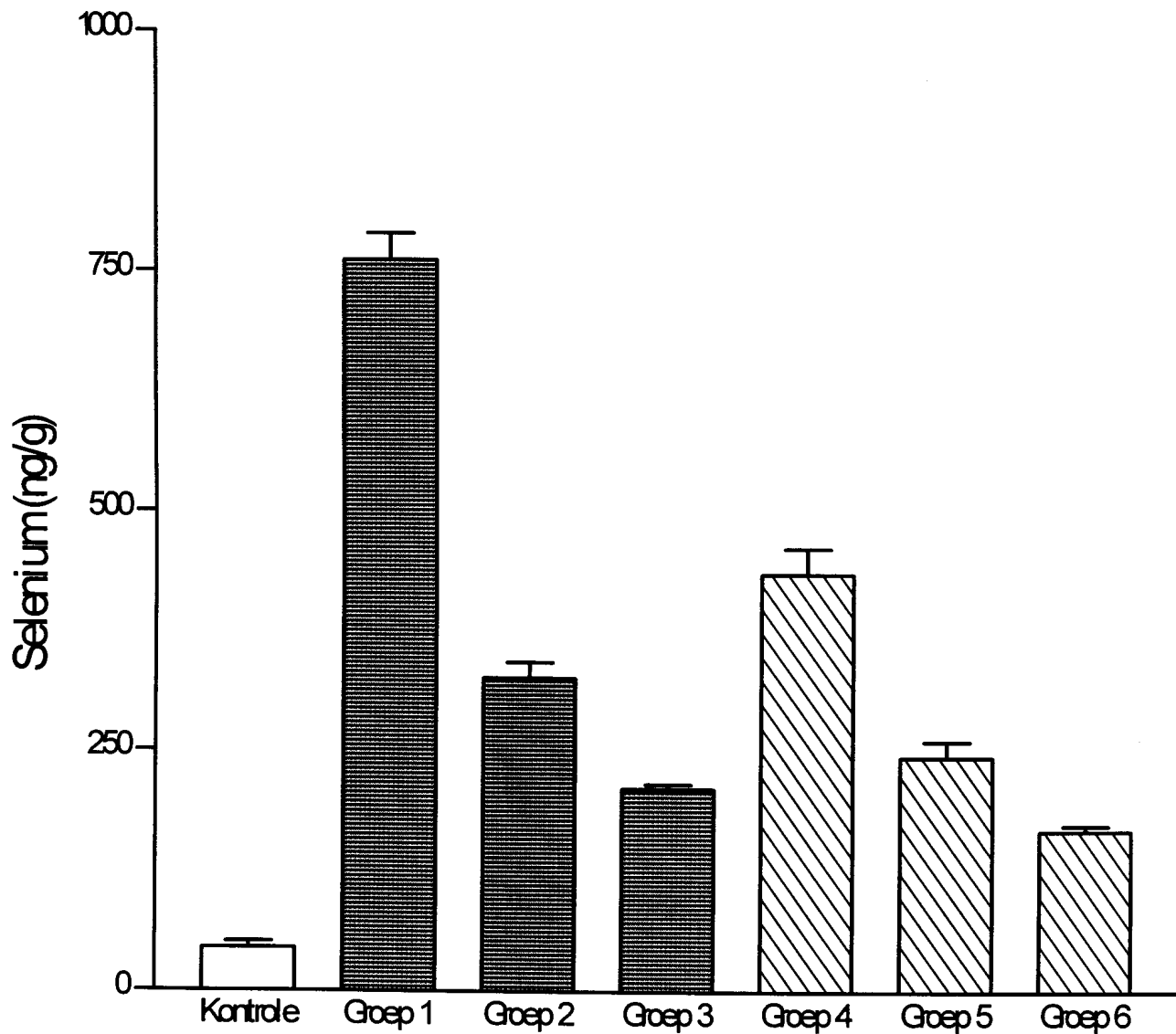
3.2.2 Gemiddelde seleniumvlakke in die plasma

Daar het 'n duidelike dosisrespons plaasgevind en 'n toename in plasma seleniumkonsentrasie met 'n toename in seleniumkonsentrasie in die dieet, is duidelik waargeneem (Figuur 3.3). 'n Hoë R^2 waarde van 0.9646 is verkry (Tabel 3.2), wat daarop dui dat 96.46% van die variasie wat verkry is in plasma seleniumvlakke tussen die groepe, toe te skryf is aan die vlak en chemiese vorm van seleniumsupplementering. Die seleniumvlakke in die plasma van die kontrolegroep, wat geen seleniumsupplement ontvang het nie, was betekenisvol laer gewees as die seleniumvlakke in die plasma van die groepe wat selenium as 'n supplement ontvang het (Tabel 3.4). Die groepe wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1) en 1.5 mg/dag (groep 2) ontvang het, het betekenisvol hoër gemiddelde seleniumvlakke in die plasma gehad as die groepe wat, onderskeidelik, met anorganiese selenium teen 6 mg/dag (groep 4) en 1.5 mg/dag (groep 5) gesupplementeer was. Daar was egter nie 'n betekenisvolle verskil tussen die gemiddeld van groep 3, wat 0.75 mg/dag organiese selenium ontvang het, en groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, nie. Groep 3 se gemiddelde plasma seleniumvlakke het ook nie betekenisvol van dié van groep 5, verskil nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die plasma was hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.4 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die plasma van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0001	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0013	0.0001
Groep 3	0.0001	0.0001	0.0001	.	0.0001	0.1880	0.0751
Groep 4	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	.	0.0001	0.0001
Groep 5	0.0001	0.0001	0.0013	0.1880	0.0001	.	0.0028
Groep 6	0.0001	0.0001	0.0001	0.0751	0.0001	0.0028	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.3 Gemiddelde seleniumvlakke in die plasma van die verskillende groepe¹, met slag (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

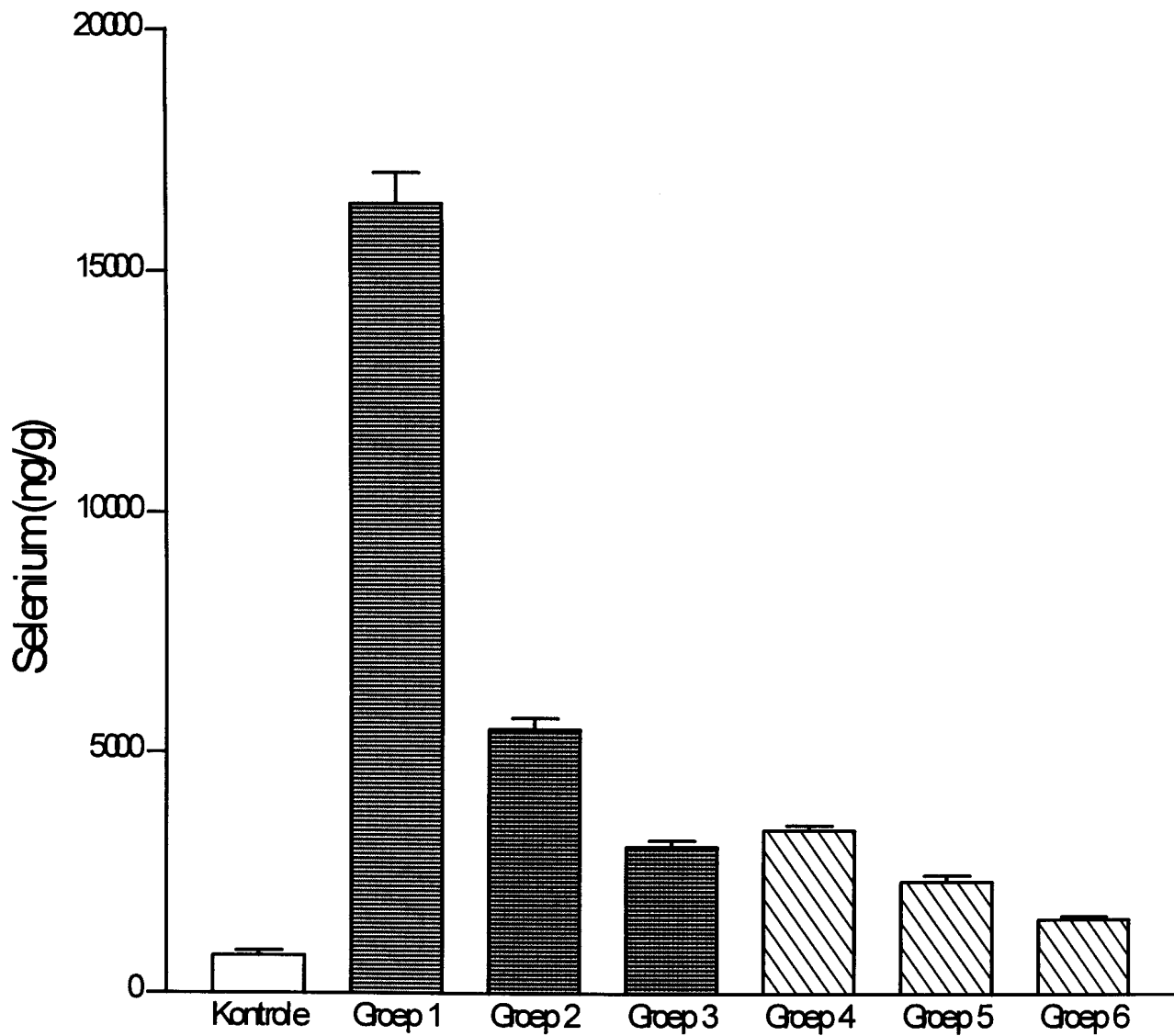
3.2.3 Gemiddelde seleniumvlakke in die hartspeer

Daar het 'n duidelike dosisrespons plaasgevind en 'n toename in die seleniumkonsentrasie in die hartspeer, met 'n toename in seleniumkonsentrasie in die dieet, is duidelik waargeneem (Figuur 3.4). 'n Hoë R^2 waarde van 0.9831 is verkry (Tabel 3.2), wat daarop dui dat 98.31% van die variasie wat verkry is in die hartspeer seleniumvlakke tussen die groepe, toe te skryf is aan die vlak en chemiese vorm van seleniumsupplementering. Die seleniumvlakke in die hartspeer van die kontrolegroep, wat geen seleniumsupplement ontvang het nie, was betekenisvol laer gewees as die seleniumvlakke in die hartspeer van die groepe wat selenium as 'n supplement ontvang het (Tabel 3.5). Die groepe wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1), 1.5 mg/dag (groep 2) en 0.75 mg/dag (groep 3) ontvang het, het betekenisvol hoër gemiddelde seleniumvlakke in die hartspeer gehad as die groepe wat, onderskeidelik, met anorganiese selenium teen 6 mg/dag (groep 4), 1.5 mg/dag (groep 5) en 0.75 mg/dag (groep 6) gesupplementeer was. Daar was egter nie 'n betekenisvolle verskil tussen die gemiddeld van groep 3 en die gemiddelde van groepe 4 en 5 nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die plasma was betekenisvol tot hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.5 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die hartspeer van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0279
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0001	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 3	0.0001	0.0001	0.0001	.	0.3533	0.0621	0.0002
Groep 4	0.0001	0.0001	0.0001	0.3533	.	0.0066	0.0001
Groep 5	0.0001	0.0001	0.0001	0.0621	0.0001	.	0.0392
Groep 6	0.0279	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0392	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.4 Gemiddelde seleniumvlakke in die hartsier van die verskillende groepe¹, met slag
(balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

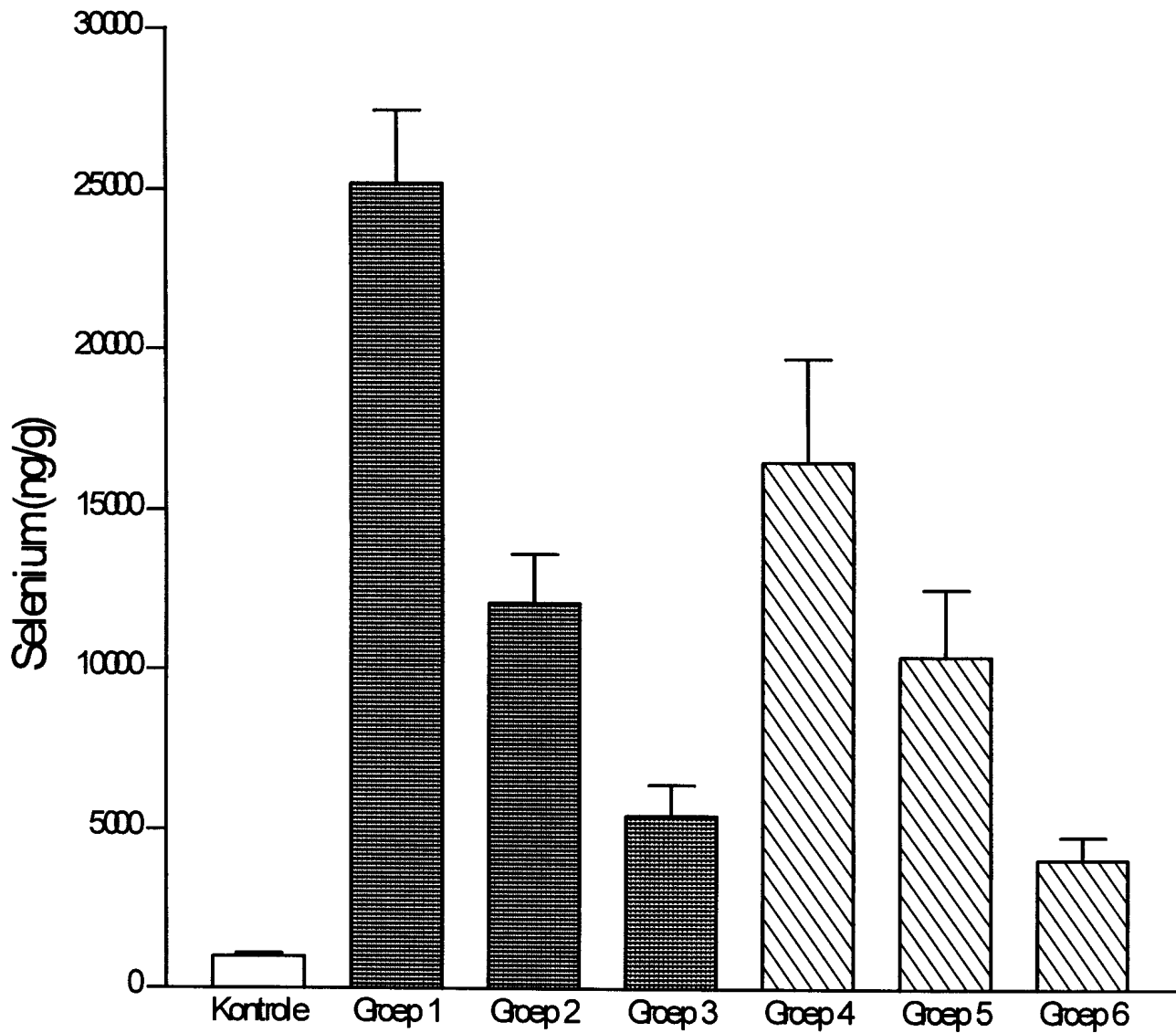
3.2.4 Gemiddelde seleniumvlakke in die lewer

Daar het 'n duidelike dosisrespons plaasgevind en 'n toename in die seleniumkonsentrasie in die lewer, met 'n toename in seleniumkonsentrasie in die dieet, is waargeneem (Figuur 3.5). 'n Hoë R^2 waarde van 0.7605 is verkry (Tabel 3.2), wat daarop dui dat 76.05% van die variasie wat verkry is in die lewer seleniumvlakke tussen die groepe, toe te skryf is aan die vlak en chemiese vorm van seleniumplesmentering. Die R^2 waarde van die lewer seleniumvlakke was egter die laagste vir al die weefsels, volbloed en plasma wat vir seleniumkonsentrasie ontleed is. Die ongesuplementeerde kontrolegroep se gemiddelde seleniumkonsentrasie in die lewer was nie betekenisvol verskillend van die gemiddelde van groepe 3 en 6 nie (Tabel 3.6). Groepe 3 en 6 het, onderskeidelik, 0.75 mg/dag organiese en anorganiese selenium, ontvang. Die groep wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1) ontvang het, het 'n betekenisvol hoër gemiddelde seleniumvlak in die lewer gehad as die groep wat met anorganiese selenium teen 'n vlak van 6 mg/dag (groep 4) gesuplementeer was. Daar was egter nie betekenisvolle verskille tussen die gemiddelde van groepe 2 en 5 (wat, onderskeidelik, 1.5 mg/dag organiese en anorganiese selenium ontvang het) en die gemiddelde van groepe 3 en 6 (wat, onderskeidelik, 0.75 mg/dag organiese en anorganiese selenium ontvang het) nie. Groepe 2 en 4, asook groepe 3 en 5, se gemiddelde seleniumvlakke in die lewer, het ook nie betekenisvol verskil nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die lewer was betekenisvol tot hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.6 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die lewer van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0001	0.0602	0.0001	0.0002	0.1872
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0012	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0001	0.0001	.	0.0113	0.0840	0.5083	0.0026
Groep 3	0.0602	0.0001	0.0113	.	0.0001	0.0544	0.5900
Groep 4	0.0001	0.0012	0.0840	0.0001	.	0.0190	0.0001
Groep 5	0.0002	0.0001	0.5083	0.0544	0.0190	.	0.0154
Groep 6	0.1872	0.0001	0.0026	0.5900	0.0001	0.0154	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.5 Gemiddelde seleniumvlakke in die lever van die verskillende groepe¹, met slag (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

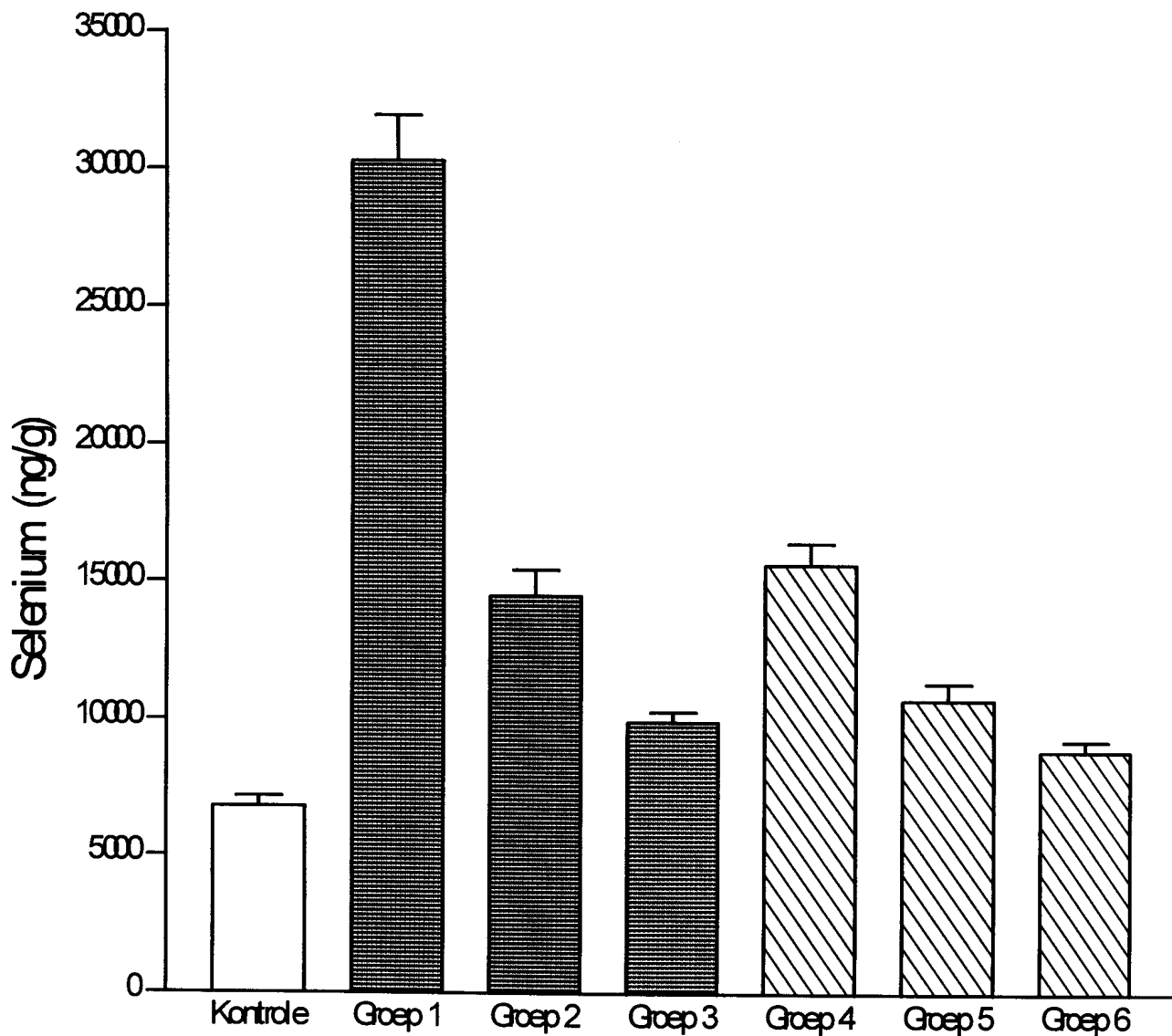
3.2.5 Gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks

Daar het 'n duidelike dosisrespons plaasgevind en 'n toename in die seleniumkonsentrasie in die nierkorteks, met 'n toename in seleniumkonsentrasie in die dieet, is duidelik waargeneem (Figuur 3.6). 'n Hoë R^2 waarde van 0.9273 is verkry (Tabel 3.2), wat die hoë mate van afhanklikheid van die seleniumkonsentrasie in die nierkorteks vir chemiese vorm en vlak van seleniumplesmentering, uitwys. Die seleniumvlakke in die nierkorteks van die kontrolegroep, wat geen seleniumplesment ontvang het nie, was betekenisvol laer gewees as die seleniumvlakke in die nierkorteks van al groepe wat selenium as 'n plesment ontvang het, behalwe groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het (Tabel 3.7). Die groepe wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1) en 1.5 mg/dag (groep 2) ontvang het, het betekenisvolle hoër gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks gehad as die groepe wat, onderskeidelik, met anorganiese selenium, teen vlakke van 6 mg/dag (groep 4) en 1.5 mg/dag, gesupplementeer was. Daar was egter nie betekenisvolle verskille tussen die gemiddelde van groepe 3 en 6 (wat, onderskeidelik, 0.75 mg/dag organiese en anorganiese selenium ontvang het) nie. Groepe 2 en 4, asook groepe 3 en 5, se gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks, het ook nie betekenisvol verskil nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die nierkorteks was betekenisvol tot hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.7 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks van die verskillende groepe, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0001	0.0062	0.0001	0.0008	0.0655
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0001	0.0001	.	0.0003	0.3541	0.0022	0.0001
Groep 3	0.0062	0.0001	0.0003	.	0.0001	0.5039	0.3700
Groep 4	0.0001	0.0001	0.3541	0.0001	.	0.0001	0.0001
Groep 5	0.0008	0.0001	0.0022	0.5039	0.0001	.	0.1213
Groep 6	0.0655	0.0001	0.0001	0.3700	0.0001	0.1213	.

1. Kontrole: geen selenium plesment;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.6 Gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks van die verskillende groepe¹, met slag (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

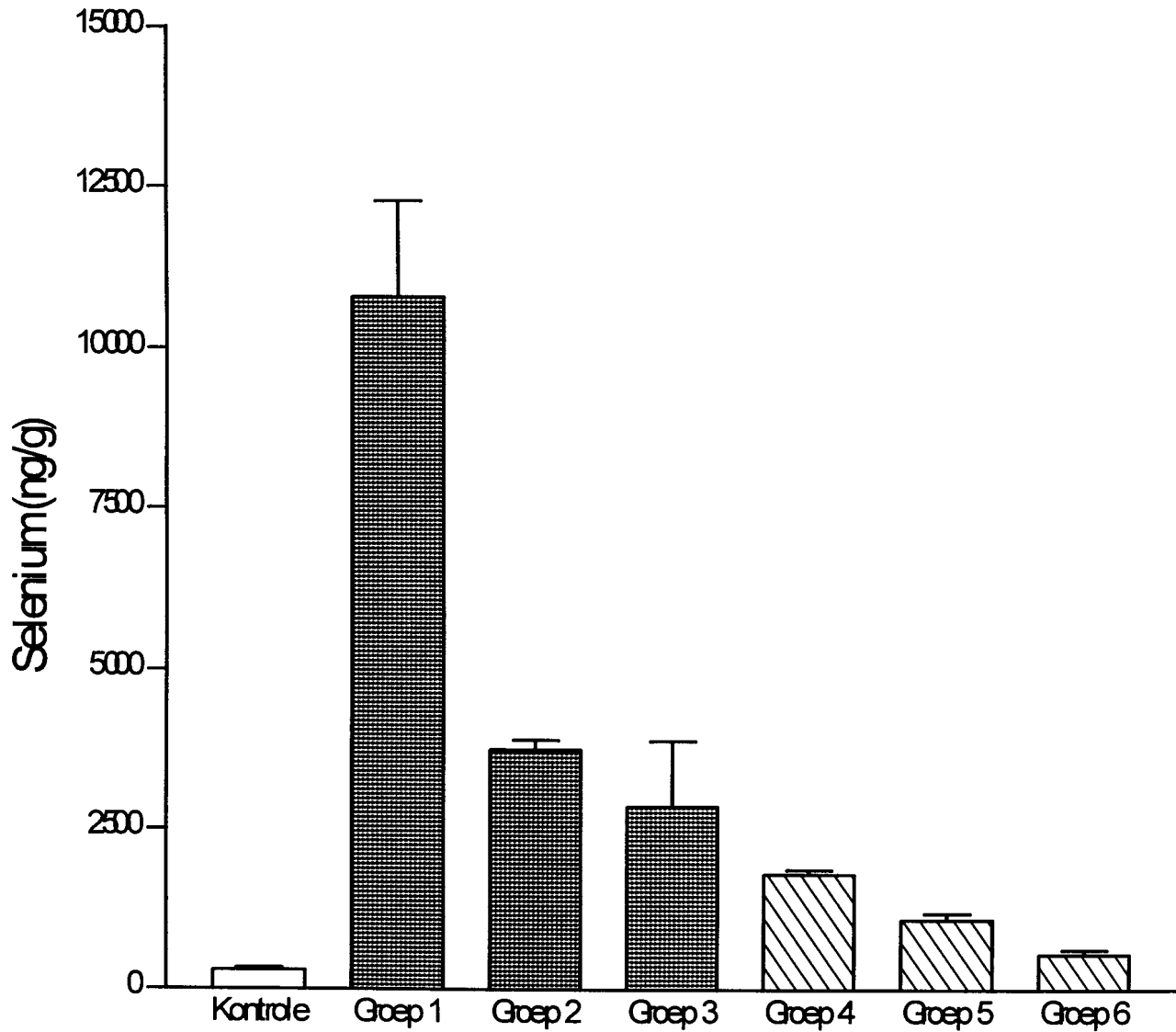
3.2.6 Gemiddelde seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier

Daar het 'n duidelike dosisrespons plaasgevind en 'n toename in skeletspier seleniumkonsentrasie, met 'n toename in seleniumkonsentrasie in die dieet, is waargeneem (Figuur 3.7). 'n Hoë R^2 waarde van 0.8019 is verkry (Tabel 3.2), wat daarop dui dat 80.19% van die variasie wat in skeletspier seleniumvlakke tussen die groepe verkry is, toegeskryf kan word aan die vlak en chemiese vorm van seleniumplesmentering. Die seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier van die kontrolegroep, was betekenisvol laer gewees as die seleniumvlakke in dieselfde spier van die groepe wat organiese selenium as 'n supplement ontvang het (Tabel 3.8). Die groepe wat anorganiese selenium het, se gemiddelde skeletspier seleniumkonsentrasies was nie betekenisvol verskillend van die gemiddeld van die kontrolegroep nie. Die groepe wat organiese selenium teen 6 mg/dag (groep 1), 1.5 mg/dag (groep 2) en 0.75 mg (groep 3) ontvang het, het betekenisvol hoër gemiddelde seleniumvlakke in die skeletspier gehad as die groepe wat, onderskeidelik, met anorganiese selenium teen 6 mg/dag (groep 4), 1.5 mg/dag (groep 5) en 0.75 mg/dag (groep 6) gesupplementeer was. Daar was egter nie 'n betekenisvolle verskil tussen die gemiddeld van groep 3 en die gemiddeld van groep 2, asook van groepe 4 en 5 nie. Verder was daar ook geen onderlinge verskille tussen die drie groepe, wat anorganiese selenium in hul dieet ontvang het, nie. Al die ander onderlinge verskille in die seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier was betekenisvol tot hoogs betekenisvol gewees.

Tabel 3.8 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier van die groepe, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0001	0.0003	0.0058	0.0948	0.3693	0.7691
Groep 1	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Groep 2	0.0003	0.0001	.	0.3459	0.0464	0.0078	0.0016
Groep 3	0.0058	0.0001	0.3459	.	0.2790	0.0735	0.0208
Groep 4	0.0948	0.0001	0.0464	0.2790	.	0.4649	0.1999
Groep 5	0.3693	0.0001	0.0078	0.0735	0.4649	.	0.5757
Groep 6	0.7691	0.0001	0.0016	0.0208	0.1999	0.5757	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.7 Gemiddelde seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier van die verskillende groepe¹, met slag (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

3.3 ANTILIGGAAMPRODUKSIE

Die gemiddelde primêre en sekondêre antiliggaamproduksies wat verkry is na supplementering met verskillende konsentrasies van organiese en anorganiese selenium, is opgesom in Tabel 3.9 en word grafies voorgestel in Figure 3.7 tot 3.9.

Tabel 3.9 Gemiddelde antiliggaamproduksie, uitgedruk as 'n verdunningsfaktor¹ ($\pm$ standaardfout) (sien tabelle 3.10 tot 3.12 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen groepe)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6	
	Geen	Organiese Se			Anorganiese Se			
		6	1.5	0.75	6	1.5	0.75	
		mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	p – waarde ² (R kwadraat)
Primêr ³	3.350 ± 0.107	3.643 ± 143	3.071 ± 0.170	3.286 ± 0.101	3.357 ± 0.143	3.786 ± 0.406	3.071 ± 0.297	0.1955 (0.1679)
Primêr ⁴	6.350 ± 0.299	6.786 ± 0.241	6.571 ± 0.481	6.500 ± 0.408	5.429 ± 0.230	7.857 ± 0.585	6.214 ± 0.214	0.0048* (0.3282)
Sekondêr ⁵	6.800 ± 0.423	7.000 ± 0.189	7.143 ± 0.585	7.214 ± 0.486	6.929 ± 0.517	8.071 ± 0.369	7.071 ± 0.369	0.5036 (0.1071)

1. Positiewe haemaglutinasie by 'n verdunning van 1:1 is 'n waarde van 1 toegeken, 1:2 'n waarde van 2, 1:4 'n waarde van 3, ensovoorts
2. $P < 0.05$ is betekenisvol
3. 2 weke na uitdaging met perd rooibloedselle
4. 3 weke na uitdaging met perd rooibloedselle
5. 1 week na 2^{de} uitdaging met perd rooibloedselle

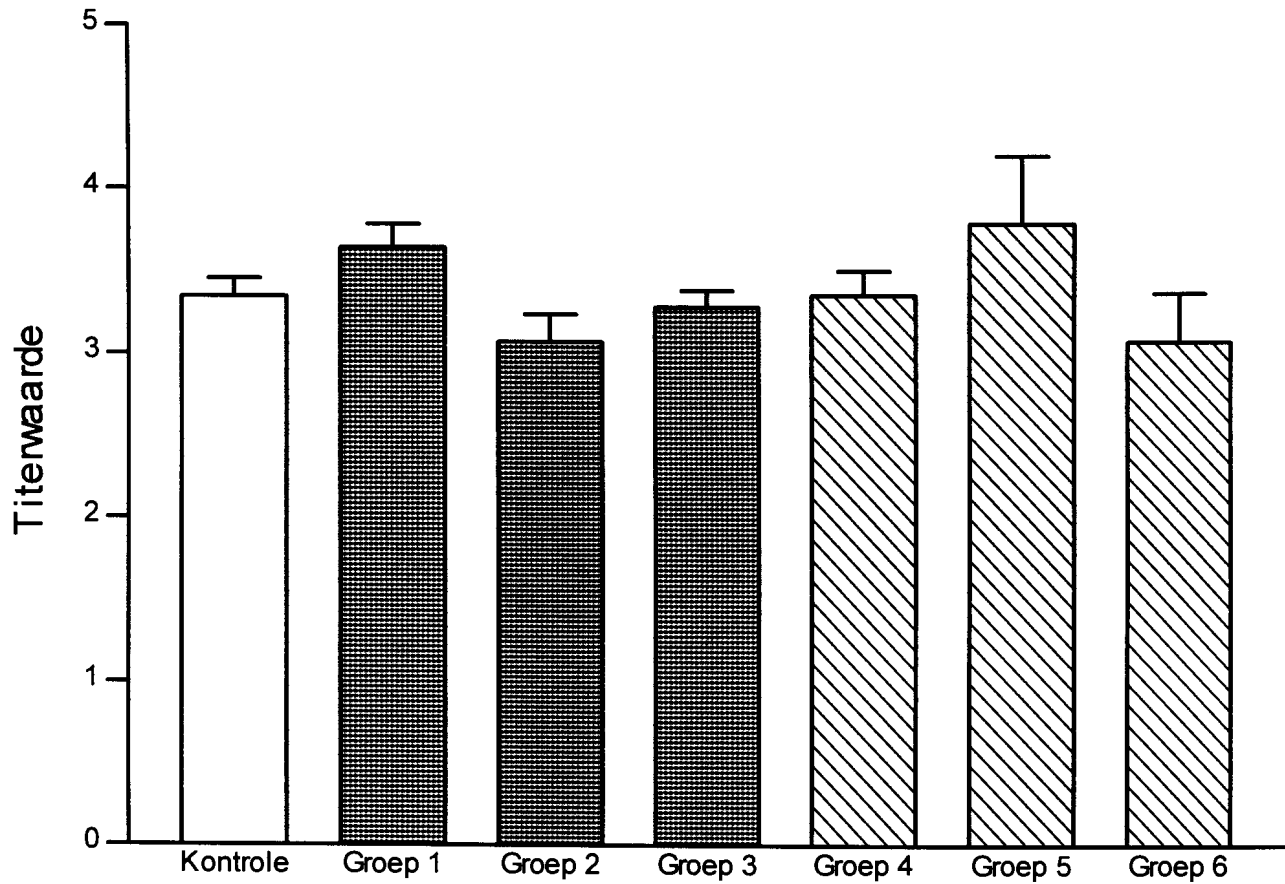
3.3.1 Primêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete, 2 weke na uitdaging

Die gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete, 2 weke na die uitdaging, het laer titerwaardes getoon as 'n week later, en piekwaardes is dus op hierdie stadium nog nie bereik nie (Tabel 3.9). Groep 5, wat 1.5 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, het betekenisvolle hoër waardes getoon as groep 2, wat ook 1.5 mg/dag selenium ontvang het, maar in organiese vorm. Groep 5 het ook 'n betekenisvol hoër primêre antiliggamproduksie gehad as groep 6, wat 0.75 mg/dag selenium in anorganiese vorm, ontvang het. Geen ander betekenisvolle verskille kon verder tussen die verskillende groepe gevind word nie (Tabel 3.10).

Tabel 3.10 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete (2 weke na uitdaging) van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.3092	0.3332	0.8224	0.9801	0.1330	0.3332
Groep 1	0.3092	.	0.0709	0.2537	0.3599	0.6459	0.0709
Groep 2	0.3332	0.0709	.	0.4914	0.3599	0.0254	1.0000
Groep 3	0.8224	0.2537	0.4914	.	0.8182	0.1125	0.4914
Groep 4	0.9801	0.3599	0.3599	0.8182	.	0.1721	0.3599
Groep 5	0.1330	0.6459	0.0254	0.1125	0.1721	.	0.0254
Groep 6	0.3332	0.0709	1.0000	0.4914	0.3599	0.0254	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.8 Gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen perd eritrosiete (2 weke na uitdaging) van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

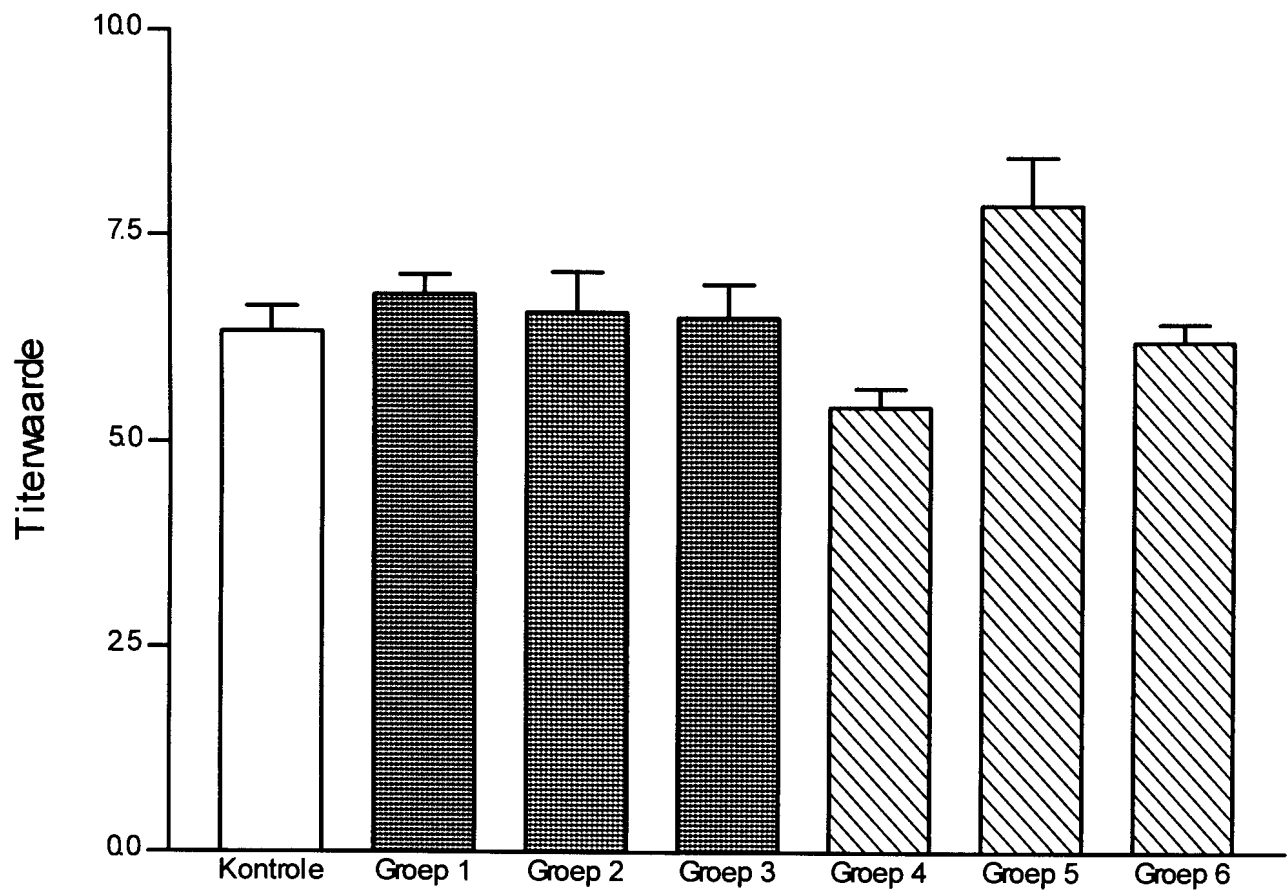
3.3.2 Primêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, 3 weke na uitdaging

Die primêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, 3 weke na uitdaging, tussen die verskillende groepe, het 'n redelike hoë R^2 waarde van 0.3282 behaal (Tabel 3.9). Daar is dus 'n duidelike afhanklikheid van primêre antiliggaamproduksie na 3 weke vir chemiese vorm en vlak van selenium. Vanuit Tabel 3.11 kan gesien word dat groep 5, wat 1.5 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, 'n betekenisvol hoër gemiddeld gehad het as die ander groepe. Groep 4, wat 6 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, het egter 'n betekenisvol laer gemiddeld as groepe 1, 2 en 5 gehad, en daar was ook 'n sterk neiging van die gemiddeld van groep 4 om laer as die gemiddeld van groep 3 te wees. Hierdie stimulerende effek van groep 5 en onderdrukkende effek van groep 4 op die produksie van primêre antiliggame, kan duidelik in Figuur 3.9 gesien word.

Tabel 3.11 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, 3 weke na uitdaging, van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.3848	0.6577	0.7639	0.0700	0.0040	0.7858
Groep 1	0.3848	.	0.6925	0.5983	0.0153	0.0527	0.2943
Groep 2	0.6577	0.6925	.	0.8951	0.0393	0.0212	0.5106
Groep 3	0.7639	0.5983	0.8951	.	0.0527	0.0153	0.5983
Groep 4	0.0700	0.0153	0.0393	0.0527	.	0.0001	0.1515
Groep 5	0.0400	0.0527	0.0212	0.0153	0.0001	.	0.0038
Groep 6	0.7858	0.2943	0.5106	0.5983	0.1515	0.0038	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.9 Gemiddelde primêre antiliggamproduksie teen perid eritosiete (3 weke na uitdaging) van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

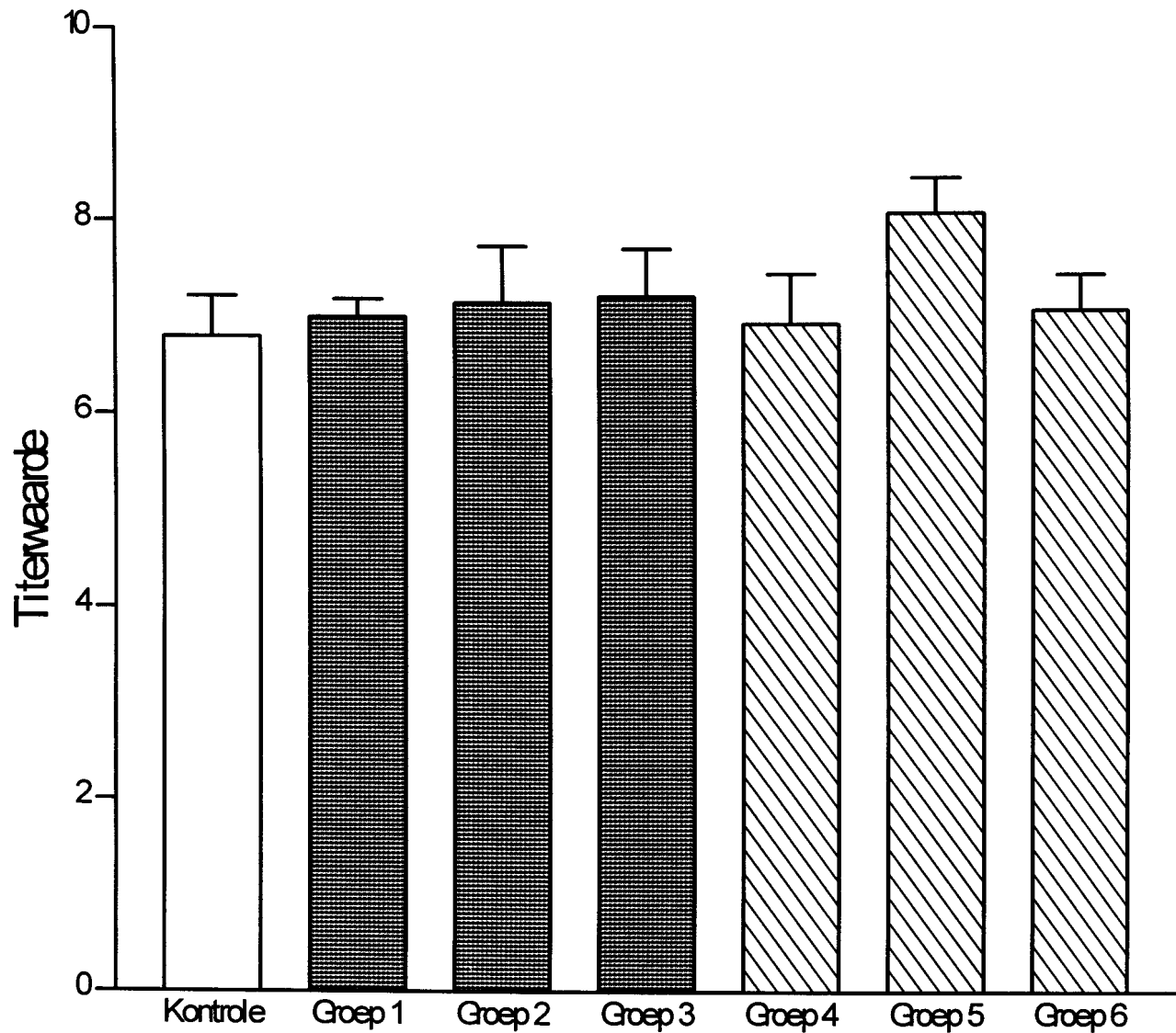
3.3.3 Sekondêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, 1 week na uitdaging

Groep 5, wat 1.5 mg/dag anorganiese selenium ingeneem het, het 'n betekenisvol hoër gemiddelde sekondêre antiliggaamproduksie gehad as die ongesupplementeerde kontrolegroep (Tabel 3. 12). Figuur 3.10 toon hierdie verhoogde antiliggaamproduksie van groep 5 duidelik. Geen verdere betekenisvolle verskille kon gevind word tussen die verskillende groepe, in terme van sekondêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, nie.

Tabel 3.12 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die gemiddelde sekondêre antiliggaamproduksie (1 week na uitdaging) van die verskillende groepe¹, aan te dui (p<0.05 is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.7363	0.5641	0.4863	0.8285	0.0366	0.6478
Groep 1	0.7363	.	0.8244	0.7393	0.9116	0.1011	0.9116
Groep 2	0.5641	0.8244	.	0.9116	0.7393	0.1538	0.9116
Groep 3	0.4863	0.7393	0.9116	.	0.6575	0.1873	0.8244
Groep 4	0.8285	0.9116	0.7393	0.6575	.	0.0809	0.8244
Groep 5	0.0366	0.1011	0.1538	0.1873	0.0809	.	0.1252
Groep 6	0.6478	0.9116	0.9116	0.8244	0.8244	0.1252	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.10 Gemiddelde sekondêre antiligaamproduksie teen perd eritrosiete (1 week na uitdaging) van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

3.4 SUPEROKSIDPRODUKSIE DEUR GESTIMULEERDE NEUTROFIELE

Die vlakke van superoksiedproduksie deur die gestimuleerde neutrofiele na supplementering met verskillende konsentrasies van organiese en anorganiese selenium, is opgesom in Tabel 3.13 en word grafies voorgestel in Figure 3.10 en 3.11.

Tabel 3.13 Gemiddelde superoksiedproduksie deur PMA¹ gestimuleerde neutrofiele (mV/s ± standaardfout) (sien tabelle 3.14 en 3.15 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen die groepe)

	Kontrole	Groep 1 Organiese Se 6 mg/dag	Groep 2 1.5 mg/dag	Groep 3 0.75 mg/dag	Groep 4 Anorganiese Se 6 mg/dag	Groep 5 1.5 mg/dag	Groep 6 0.75 mg/dag	p – waarde ² (R kwadraat)
Superoksied	107.80 ± 13.34	88.48 ± 6.76	80.25 ± 12.89	120.80 ± 27.18	85.85 ± 12.23	91.82 ± 12.17	57.23 ± 10.68	0.1333 (0.1885)
Superoksied / witbloedsel	13.73 ± 2.32	10.91 ± 2.11	9.553 ± 1.83	16.89 ± 4.94	15.33 ± 2.39	11.95 ± 2.43	11.20 ± 2.73	0.5532 (0.0996)

1. Forbol 12-miristaat 13-asetaat
2. P < 0.05 is betekenisvol

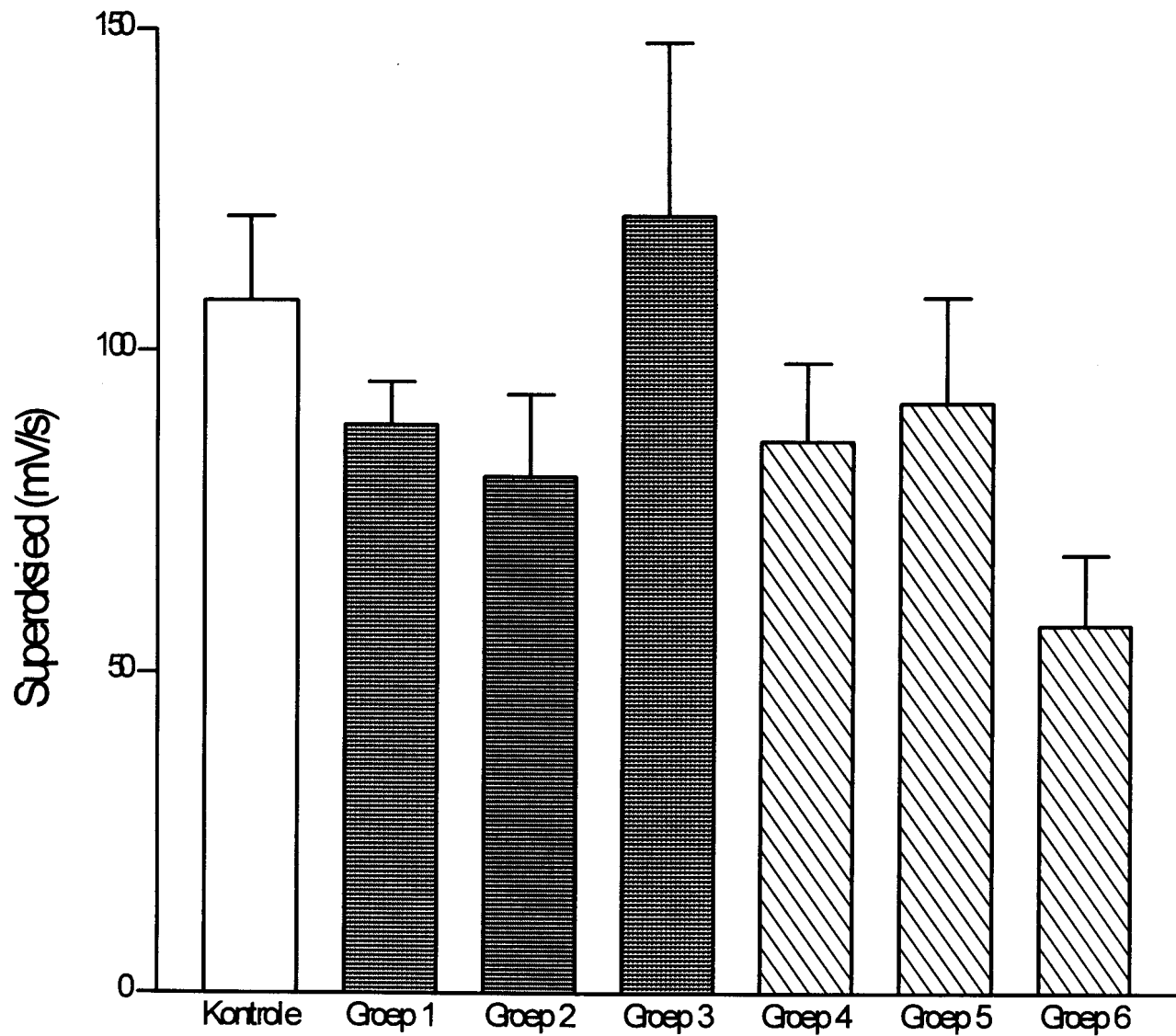
3.4.1 Superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofile

Die gestimuleerde neutrofile van groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, het betekenisvol laer superoksiedproduksie as beide die ongesupplementeerde kontrolegroep, sowel as groep 3, wat 0.75 mg/dag organiese selenium ontvang het, getoon (Tabel 3.14). Hierdie effek is ook sigbaar in Figuur 3.11. Geen verdere betekenisvolle onderlinge verskille tussen die verskillende groepe is gevind nie.

Tabel 3.14 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofile van die verskillende groepe¹, aan te dui (p<0.05 is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.3504	0.1853	0.5298	0.2895	0.4393	0.0174
Groep 1	0.3504	.	0.7128	0.1530	0.9064	0.8810	0.1664
Groep 2	0.1853	0.7128	.	0.0748	0.8021	0.6049	0.3056
Groep 3	0.5298	0.1530	0.0748	.	0.1229	0.1991	0.0064
Groep 4	0.2895	0.9064	0.8021	0.1229	.	0.7893	0.2042
Groep 5	0.4393	0.8810	0.6049	0.1991	0.7893	.	0.1264
Groep 6	0.0174	0.1664	0.3056	0.0064	0.2042	0.1264	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.11 Superoksiedproduksie deur PMA¹ gestimuleerde neutrofiel van die verskillende groepe² (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Forbol 12-miristaat 13-asetaat
2. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

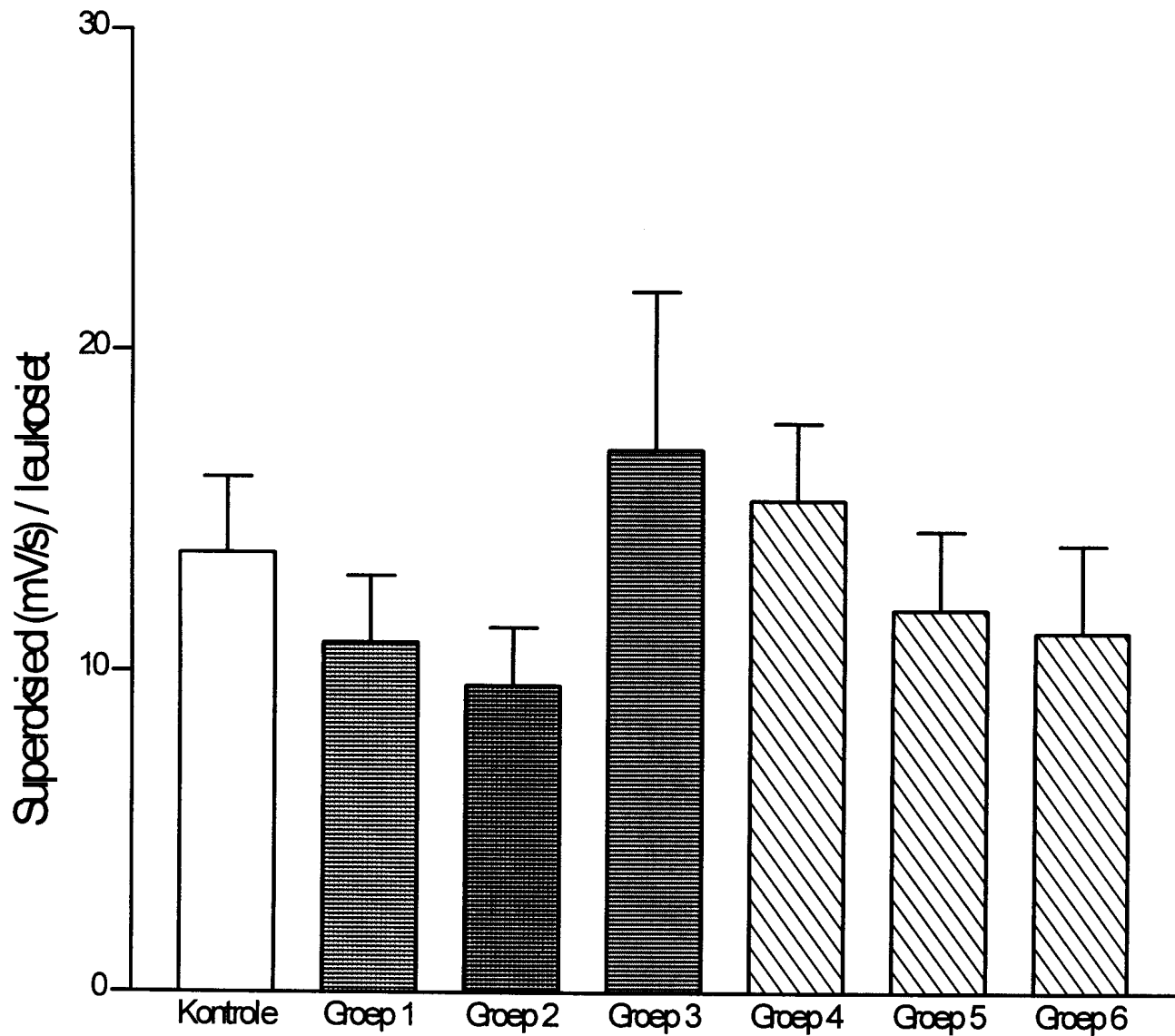
3.4.2 Superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiële, gekorrigeer vir leukosietelling

Die neiging van superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiële, gekorrigeer vir leukosiete was, alhoewel nie betekenisvol nie (Tabel 3.15), baie dieselfde gewees as vir die ongekorrigeerde waardes. 'n Dosisverwante afname in superoksiedproduksie deur die neutrofiële van die anorganiese selenium gesupplementeerde groepe, is sigbaar (Figuur 3.12).

Tabel 3.15 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die superoksiedproduksie deur neutrofiële, gekorrigeer vir witbloedseltelling, van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.4578	0.2739	0.4077	0.6753	0.6388	0.5057
Groep 1	0.4578	.	0.7424	0.1510	0.2863	0.8001	0.9430
Groep 2	0.2739	0.7424	.	0.0799	0.1654	0.5612	0.6891
Groep 3	0.4077	0.1510	0.0799	.	0.7045	0.2340	0.1717
Groep 4	0.6753	0.2863	0.1654	0.7045	.	0.4140	0.3192
Groep 5	0.6388	0.8001	0.5612	0.2340	0.4140	.	0.8558
Groep 6	0.5057	0.9430	0.6891	0.1717	0.3192	0.8558	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.12 Superoksiedproduksie deur PMA¹ gestimuleerde neutrofiele, gekorrigeer vir leukosiettellings van die verskillende groepe² (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Forbol 12-miristaat 13-asetaat
2. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

3.5 LIMFOSIETPOPULASIES AS PERSENTASIE VAN TOTALE LEUKOSIETE

Die verskillende limfosietspopulasies, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete, na supplementering met verskillende konsentrasies organiese en anorganiese selenium, is opgesom in Tabel 3.16. Die totale T limfosietspopulasie word grafies in Figuur 3.13 voorgestel. Geen betekenisvolle onderlinge verskille is aangetref vir CD4⁺, CD8⁺ T limfosiets, B limfosiets of totale limfosiets nie.

Tabel 3.16 Gemiddelde ($\pm$ standaardfout) CD4⁺- en CD8⁺ T limfosiets, B limfosiets en totale limfosiets van die verskillende groepe, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete (sien tabel 3.17 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen groepe vir T limfosiets)

	Kontrole Geen	Groep 1 6 mg/dag	Groep 2 1.5 mg/dag	Groep 3 0.75 mg/dag	Groep 4 6 mg/dag	Groep 5 1.5 mg/dag	Groep 6 0.75 mg/dag	p - waarde ¹ (R kwadraat)
CD4	18.67 $\pm$ 1.91	18.59 $\pm$ 4.65	21.36 $\pm$ 3.62	21.71 $\pm$ 6.22	25.69 $\pm$ 2.45	27.15 $\pm$ 3.72	27.77 $\pm$ 3.21	0.3823 (0.1411)
CD8	20.26 $\pm$ 3.19	20.74 $\pm$ 4.98	27.42 $\pm$ 3.52	22.42 $\pm$ 4.85	21.23 $\pm$ 1.69	26.41 $\pm$ 3.38	29.50 $\pm$ 4.81	0.5270 (0.1152)
T limfosiets ²	38.92 $\pm$ 4.35	39.32 $\pm$ 9.43	48.77 $\pm$ 4.22	44.13 $\pm$ 5.98	46.92 $\pm$ 3.63	53.56 $\pm$ 5.93	57.27 $\pm$ 7.65	0.2932 (0.1599)
B limfosiets	34.30 $\pm$ 6.12	39.33 $\pm$ 8.65	32.58 $\pm$ 4.33	27.69 $\pm$ 5.24	26.59 $\pm$ 4.23	31.20 $\pm$ 6.57	32.36 $\pm$ 5.29	0.8452 (0.0624)
Totale limfosiets ³	73.23 $\pm$ 5.97	78.66 $\pm$ 11.08	81.35 $\pm$ 4.73	71.81 $\pm$ 5.04	73.50 $\pm$ 4.63	84.76 $\pm$ 7.11	89.63 $\pm$ 7.97	0.5837 (0.1059)

1. P < 0.05 is betekenisvol

2. CD4 + CD8

3. T limfosiets + B limfosiets

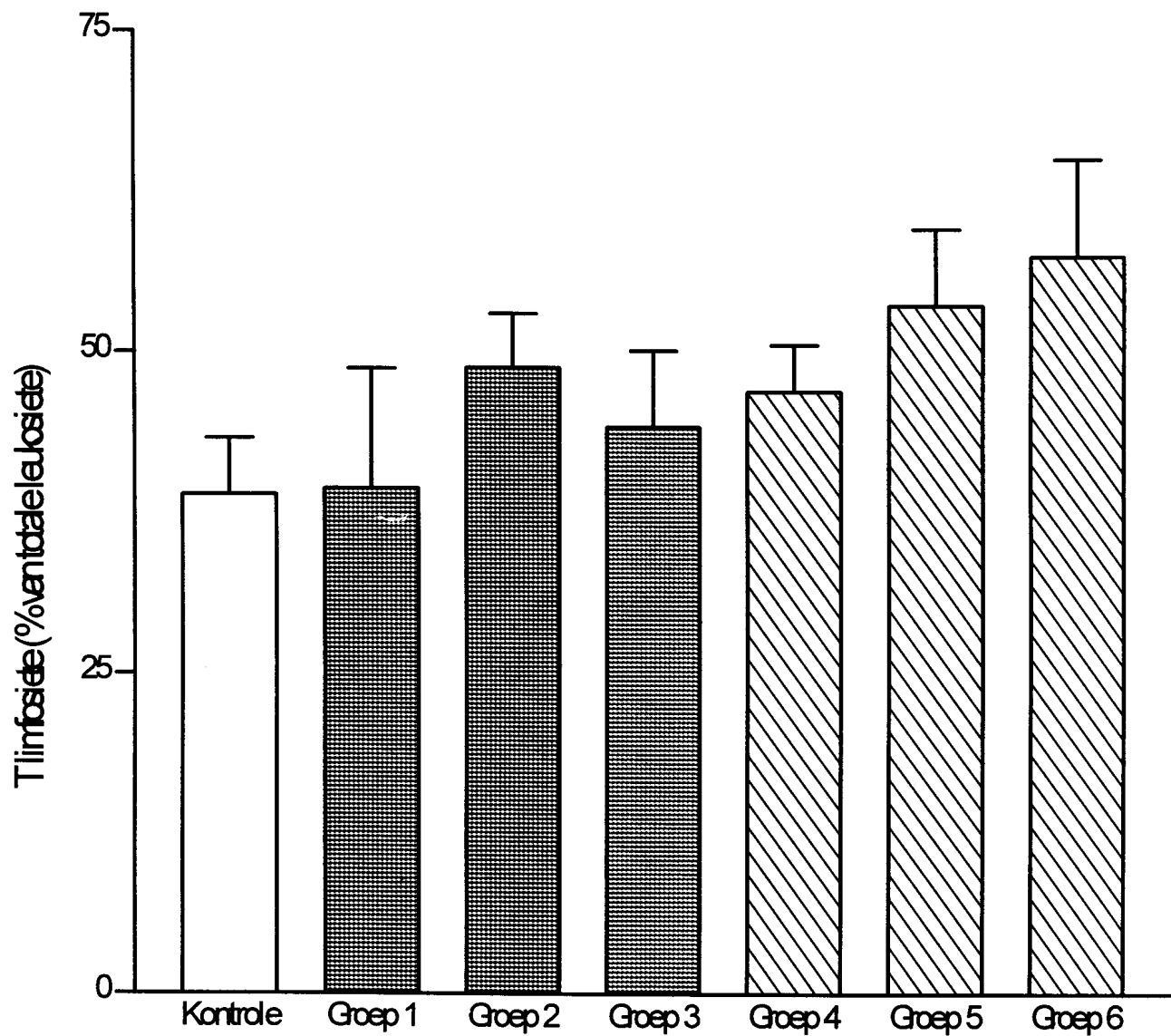
3.5.1 T limfosiete

Daar was 'n dosisverwante afname in T limfosiete, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete, met 'n toename in anorganiese selenium in die dieet, sigbaar gewees (Figuur 3.13). Groep 6, wat die laagste konsentrasie van 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, het 'n betekenisvolle hoër gemiddelde T limfosietelling as die kontrolegroep gehad (Tabel 3.17).

Tabel 3.17 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die totale T limfosiete, uitgedruk as persentasie van totale leukosiete, van die verskillende groepe¹ aan te dui (p<0.05 is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.9593	0.2367	0.5291	0.3355	0.0688	0.0412
Groep 1	0.9593	.	0.2912	0.5895	0.3952	0.1013	0.0607
Groep 2	0.2367	0.2912	.	0.6152	0.8405	0.5911	0.3821
Groep 3	0.5291	0.5895	0.6152	.	0.7627	0.2922	0.1793
Groep 4	0.3355	0.3952	0.8405	0.7627	.	0.4565	0.2879
Groep 5	0.0688	0.1013	0.5911	0.2922	0.4565	.	0.6918
Groep 6	0.0412	0.0607	0.3821	0.1793	0.2879	0.6918	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.13 Totale T limfosië, uitgedruk as persentasie van totale leukosie, van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

3.6 KREATIEN FOSFOKINASE

Die verskillende kreatien fosfokinase aktiwiteite in die serum, uitgedruk as μL , na supplementering met verskillende konsentrasies organiese en anorganiese selenium, is opgesom in Tabel 3.18. Die kreatien fosfokinase aktiwiteite na 1 maand en na 3 maande vandat seleniumplesmentering begin het, word grafies in Figuur 3.14 en Figuur 3.15 voorgestel.

Tabel 3.18 Gemiddelde kreatien fosfokinase, na 1 maand en 3 maande van seleniumplesmentering ($\mu\text{L} \pm$ standaardfout) (sien tabelle 3.19 en 3.20 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen die groepe)

	Kontrole Geen	Groep 1 6 mg/dag	Groep 2 1.5 mg/dag	Groep 3 0.75 mg/dag	Groep 4 6 mg/dag	Groep 5 1.5 mg/dag	Groep 6 0.75 mg/dag	p – waarde ¹ (R kwadraat)
Na 1 maand van	50.70 ± 3.22	40.86 ± 2.10	37.43 ± 4.06	38.57 ± 2.36	47.29 ± 6.94	39.57 ± 2.10	34.71 ± 3.13	0.0312 (0.2558)
Na 3 maande	41.80 ± 2.12	41.43 ± 2.14	41.71 ± 3.28	41.57 ± 4.19	58.29 ± 8.73	48.57 ± 12.21	36.00 ± 3.03	0.2299 (0.1587)

1. $P < 0.05$ is betekenisvol

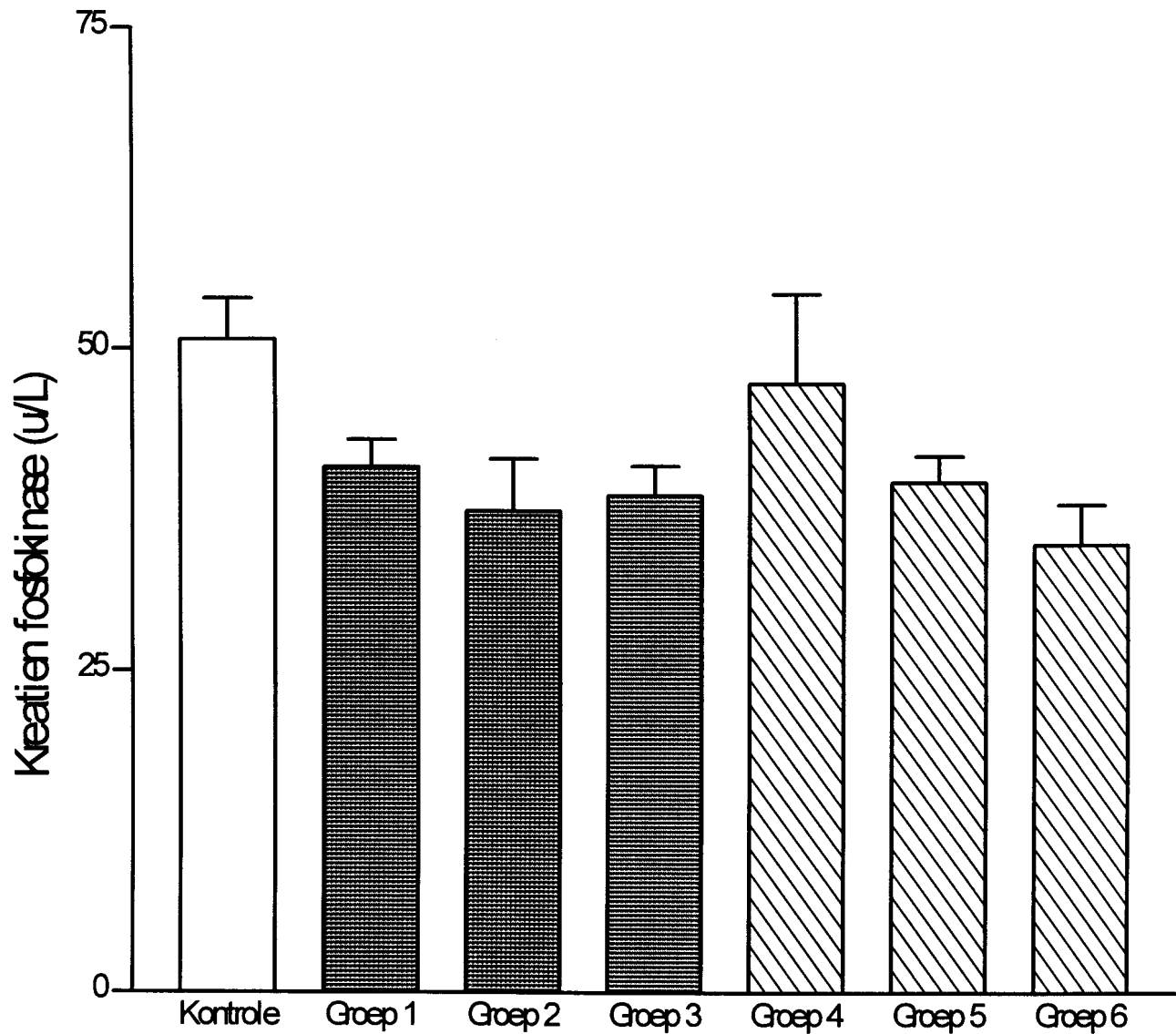
3.6.1 Kreatien fosfokinase aktiwiteit in serum, 1 maand na aanvang van selenium supplementering

Die ongesupplementeerde kontrolegroep het, een maand na die aanvang van die seleniumbehandelings, 'n betekenisvol hoër kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum getoon, in vergelyking met groepe 2 en 3, wat organiese selenium teen vlakke van onderskeidelik 1.5 en 0.75 mg/dag ontvang het, en ook groepe 5 en 6, wat anorganiese selenium teen vlakke van onderskeidelik 1.5 en 0.75 mg/dag ontvang het (Tabel 3.19). Die kontrolegroep het ook geneig om 'n betekenisvol hoër waarde te hê as groep 1, wat 6 mg/dag organiese selenium ontvang het ($p = 0.0559$). Vanuit Figuur 3.14 is 'n toename in die kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum sigbaar met 'n toename in die supplementeringsvlak van anorganiese selenium.

Tabel 3.19 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die kreatien kinase aktiwiteit in die serum, een maand na aanvang van seleniumsupplementering, van die verskillende groepe¹, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0559	0.0112	0.0197	0.4995	0.0316	0.0026
Groep 1	0.0559	.	0.5317	0.6764	0.2435	0.8142	0.2648
Groep 2	0.0112	0.5317	.	0.8345	0.0767	0.6955	0.6202
Groep 3	0.0197	0.6764	0.8345	.	0.1162	0.8550	0.4820
Groep 4	0.4995	0.2435	0.0767	0.1162	.	0.1631	0.0255
Groep 5	0.0316	0.8142	0.6955	0.8550	0.1631	.	0.3767
Groep 6	0.0026	0.2648	0.6202	0.4820	0.0255	0.3767	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.14 Kreatien fosfokinase aktiwiteit (μL) in serum, 1 maand na aanvang van selenium suplementering, van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

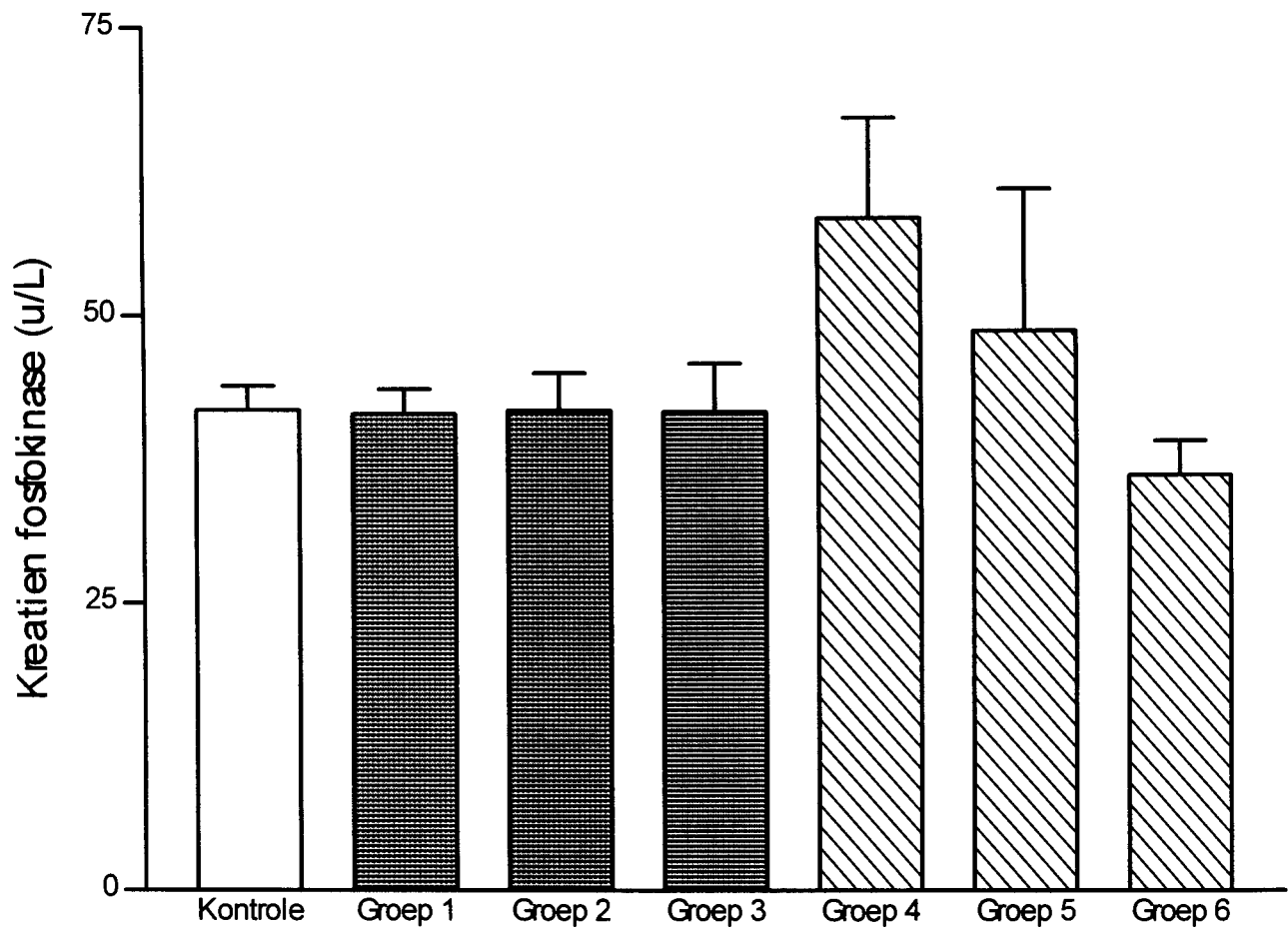
3.6.2 Kreatien fosfokinase aktiwiteit in serum, 3 maande na aanvang van selenium supplementering

Vanuit Tabel 3.20 is dit duidelik dat groep 4, wat 6 mg/dag anorganiese selenium in die dieet ontvang het, 'n betekenisvol hoër gemiddeld as die kontrolegroep ($p = 0.0432$), asook groep 6 ($p = 0.0128$) gehad. Groep 6 het 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang. 'n Duidelike toename in die serum aktiwiteit van kreatien fosfokinase met toename in anorganiese selenium is in Figuur 3.15 waarneembaar, terwyl die afwesigheid van enige effek van organiese selenium op kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum, opvallend is.

Tabel 3.20 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die kreatien kinase aktiwiteit in die serum, drie maande na aanvang van seleniump supplementering, van die verskillende¹ groepe, aan te dui ($p < 0.05$ is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.9628	0.9914	0.9771	0.0432	0.3973	0.4680
Groep 1	0.9628	.	0.9736	0.9868	0.0561	0.4103	0.5309
Groep 2	0.9914	0.9736	.	0.9868	0.0602	0.4292	0.5096
Groep 3	0.9771	0.9868	0.9868	.	0.0581	0.4197	0.5201
Groep 4	0.0432	0.0561	0.0602	0.0581	.	0.2644	0.0128
Groep 5	0.3973	0.4103	0.4292	0.4197	0.2644	.	0.1505
Groep 6	0.4680	0.5309	0.5096	0.5201	0.0128	0.1505	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.15 Kreatien fosfokinase aktiwiteit (μL) in serum, 3 maande na aanvang van selenium supplementering, van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

3.7 LEWERMASSA

Die leweremassa van die verskillende groepe, uitgedruk as persentasie van karkasemassa, word in Tabel 3.21 opgesom en in Figuur 3.16 grafies voorgestel.

Tabel 3.21 Gemiddelde leweremassa ($\pm$ standaardfout) met slag, uitgedruk as % van karkasemassa (sien tabel 3.22 vir betekenisvolheid van onderlinge verskille tussen die groepe)

Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6	
Geen	Organiese Se			Anorganiese Se			
	6	1.5	0.75	6	1.5	0.75	
	mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	mg/dag	p- waarde ¹ (R kwadraat)
1.754	2.046	1.865	1.975	2.096	2.076	1.737	0.0349*
± 0.033	± 0.081	± 0.121	± 0.154	± 0.103	± 0.113	± 0.061	(0.2511)

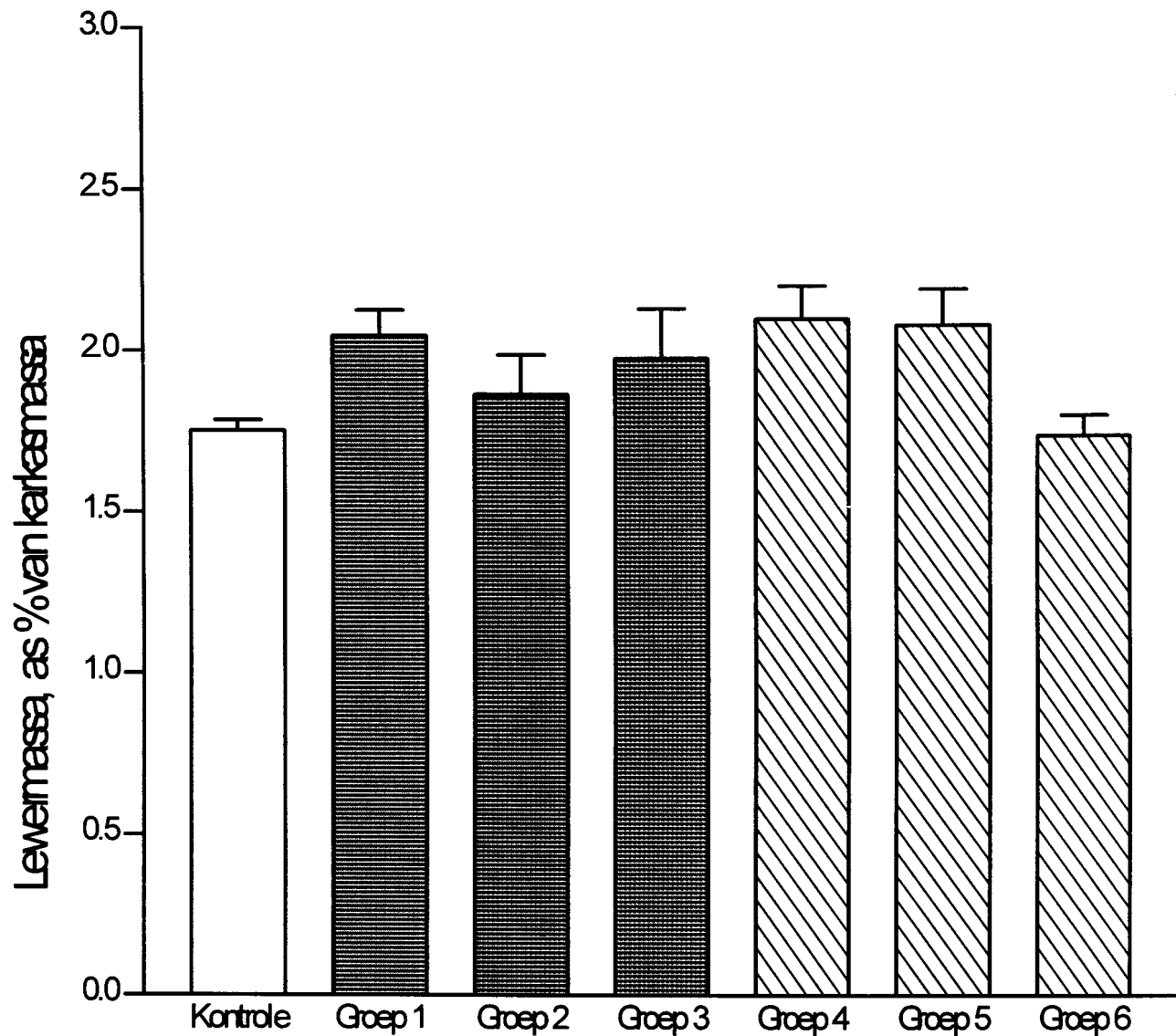
1. P < 0.05 is betekenisvol

Vanuit Tabel 3.22 is dit duidelik dat die gemiddelde leweremassa van groep 1, wat 6 mg/dag organiese selenium ontvang het, hoër as die leweremassas van beide die ongesupplementeerde kontrolegroep en ook groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, was. Groep 6 se leweremassa was ook betekenisvol laer gewees as groepe 4 en 5, wat onderskeidelik, 6 en 1.5 mg/dag anorganiese selenium in die dieet ontvang het. Groepe 4 en 5 het ook betekenisvolle hoër leweremassas as die kontrolegroep gehad.

Tabel 3.22 P-waardes om die betekenisvolheid van die onderlinge verskille tussen die leweremassa, as % van karkasemassa, van die groepe¹, aan te dui (p<0.05 is betekenisvol)

	Kontrole	Groep 1	Groep 2	Groep 3	Groep 4	Groep 5	Groep 6
Kontrole	.	0.0295	0.3978	0.0963	0.0116	0.0170	0.8982
Groep 1	0.0295	.	0.2050	0.6146	0.7250	0.8331	0.0336
Groep 2	0.3978	0.2050	.	0.4401	0.1080	0.1411	0.3699
Groep 3	0.0963	0.6146	0.4401	.	0.3938	0.4758	0.0990
Groep 4	0.0116	0.7250	0.1080	0.3938	.	0.8877	0.0144
Groep 5	0.0170	0.8331	0.1411	0.4758	0.8877	.	0.0204
Groep 6	0.8982	0.0336	0.3699	0.0990	0.0144	0.0204	.

1. Kontrole: geen selenium supplement;
 Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
 Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
 Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
 Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag



Figuur 3.16 Lewermassa met slag, uitgedruk as persentasie van karkasmassa van die verskillende groepe¹ (balkies dui standaardfout van die gemiddelde aan)

1. Kontrolle: geen selenium supplement;
Groep 1: 6 mg organiese selenium / dag; Groep 2: 1.5 mg organiese selenium / dag;
Groep 3: 0.75 mg organiese selenium / dag;
Groep 4: 6 mg anorganiese selenium / dag; Groep 5: 1.5 mg anorganiese selenium / dag;
Groep 6: 0.75 mg anorganiese selenium / dag

HOOFSTUK 4

BESPREKING

Na drie maande van seleniumsupplementering het die seleniumvlakke in die volbloed 'n konstante waarde bereik. Slegs 'n geringe, maar nie betekenisvolle styging het tussen die derde en vierde maand nog plaasgevind. Dit stem ooreen met die waarnemings van Alfthan *et al.* (1991) dat seleniumvlakke na 'n 11 weke aanvullingsperiode met 200µg Se/dag, 'n plato bereik het. Groep 1, wat 6 mg organiese selenium per dag ontvang het, was die enigste groep wat tussen die vierde en vyfde maand 'n skerp betekenisvolle daling ($p < 0.05$) getoon het.

Volgens die resultate van hierdie studie, is dit duidelik dat organiese selenium in 'n gisvorm, na supplementering in die dieet, tot 'n hoër mate in die volbloed, plasma, hart, lewer, niertokse en *Longissimus dorsi* spier akkumuleer as anorganiese selenium ($p < 0.0001$). Hierdie waarneming stem ooreen met heelwat data wat op 'n hoër mate van akkumulering van organiese seleniumverbindings teenoor anorganiese selenium, dui (Nève, 1994; Mahan & Parrett, 1996; Raisbeck *et al.*, 1996; Mahan, 1999; Wolfram, 1999). Hierdie verskynsel kan te wyte wees aan 'n hoër biobeskikbaarheid van organiese selenium in vergelyking met anorganiese selenium. Volgens Echevarria *et al.* (1988) is weefsel seleniumkonsentrasie nie 'n maatstaf van biobeskikbaarheid, wat ook metings van gebruik in biologiese prosesse insluit, in die ware sin van die woord nie. Anorganiese selenium word in die rumen gereduseer na meer onoplosbare selenied deur die rumenmikrobe (Van Ryssen *et al.*, 1989; Hakkarainen, 1993; Wolfram, 1999). Hierdie selenied word swak deur die rumen of spysverteringskanaal geabsorbeer. Organiese selenium, in die vorm van seleno-aminosure, vloei gewoonlik deur die rumen en word geabsorbeer terwyl die selenium behoue bly en doeltreffend benut word (Mahan, 1999). Aangesien selenium chemies nou verwant is aan swawel, word selenometionien nie-spesifiek vir metionien in 'n groot aantal proteïene (veral skeletspier proteïene), vervang. Selenosisteïene kan ook in plaas van sisteïene in proteïene ingesluit word (Behne, 1991; Daniels, 1996). Die hoër akkumulering van selenium in die volbloed, plasma en weefsels is nie noodwendig die gevolg van 'n hoër biobeskikbaarheid van organiese selenium nie, maar kan ook die gevolg wees van 'n hoër uitskeiding van anorganiese selenium in die uriene. Ehlig *et al.* (1976) het die absorpsie en retensie van selenometionien en natriumseleniet in lammers, wat teen 'n vlak van 0.4 mg/dag aan die skape gegee is, bepaal, en gevind dat die selenium retensie groter was vir selenometionien as vir seleniet. Hierdie verskil was veroorsaak deur 'n hoër tempo van urinêre ekskresie van selenium in die lammers wat seleniet ontvang het. Daar is geen verskil in die tempo van absorpsie van die twee seleniumverbindings gevind nie. Volgens Ehlig *et al.* (1976) word selenium hoofsaaklik deur die faeces uitgeskei wanneer die inname van selenium laag is (< 0.1 mg/kg DM). Wanneer seleniuminname toksiese vlakke nader (soos in die geval van hierdie

studie) word selenium egter teen dieselfde, of selfs hoër vlakke in die uriene as in die faeces, uitgeskei.

Die seleniumvlakke in die volbloed was betekenisvol hoër ($P < 0.05$) in die gevalle waar 6 en 1.5 mg organiese selenium aan die diere gesupplementeer was, teenoor die oorstemmende vlakke van anorganiese selenium. Dit stem ooreen met die waarnemings van Raisbeck *et al.* (1996) waar dieet selenometionien tot hoër bloedkonsentrasies gelei het as seleniet. In die geval waar 0.75 mg selenium vir supplementering gebruik is, was die verskille tussen die organiese en anorganiese groepe egter nie betekenisvol gewees nie. Hierdie waarneming mag voorstel dat organiese selenium slegs 'n betekenisvolle hoër biobeskikbaarheid, in terme van seleniumvlakke in die volbloed, by supplementeringsvlakke van meer as 0.75 mg per dag, het. Moksnes & Norheim (1983) het ook gevind dat daar nie eintlik 'n verskil in die vermoë van natriumseleniet en selenometionien om die vlakke van selenium in bloed te laat styg, wanneer die konsentrasie in die voer laer as 0.5 mg Se/kg DM, is nie. Wanneer die supplementering egter verhoog word na 1.0 mg/kg DM, het selenometionien die bloed seleniumvlakke hoër laat styg as seleniet. 'n Anorganiese seleniumsupplement van 6 mg per dag per skaap het nie die seleniumvlakke in die volbloed betekenisvol hoër laat toeneem as die groepe wat 1.5 mg en 0.75 mg organiese selenium ontvang het nie. Hierdie bevinding kan ook op die hoër biobeskikbaarheid van organiese selenium, teenoor anorganiese selenium, dui.

Die feit dat die verskil in volbloed seleniumkonsentrasie tussen die 1.5 en 0.75 mg anorganiese supplementeringsgroepe nie betekenisvol verskil het nie, kan voorstel dat volbloed nie 'n baie akkurate voorspeller van seleniuminname, waar selenium deur anorganiese bronne verskaf word, is nie. Die verskil in seleniumvlakke in die plasma tussen hierdie groepe was egter hoogs betekenisvol wat weer daarop kan dui dat plasma meer sensitief is vir verskillende anorganiese seleniumvlakke in die dieet as volbloed. Hierdie waarneming mag moontlik verband hou met die waarneming van Raisbeck *et al.* (1996) dat plasma selenium konsentrasies vinniger styg en gewoonlik meer labiel is as volbloed selenium, sodat volbloed 'n beter indeks mag wees van langtermyn seleniumstatus as plasma in soogdiere.

Supplementering van 0.75 mg anorganiese selenium het nie die selenium konsentrasie in die plasma betekenisvol laat verskil van die 0.75 mg organiese selenium supplementeringsgroep nie. Al die ander onderlinge verskille, in terme van seleniumkonsentrasie in die plasma, was egter hoogs betekenisvol. Hierdie bevindinge kan 'n hoër biobeskikbaarheid van organiese teenoor

anorganiese selenium by hoër supplementeringsvlakke weerspieël, maar nie by 'n supplementeringsvlak van 0.75 mg selenium per skaap per dag nie. Dit kan egter ook op 'n hoër en vinniger uitskeiding van selenium deur die uriene dui wanneer hoër vlakke van anorganiese selenium ingeneem word (Ehlig *et al*, 1976).

Dit is duidelik dat organiese selenium, in terme van seleniumvlakke in die hartspier, 'n hoër biobeskikbaarheid, in vergelyking met anorganiese selenium, het. Die verskil tussen die groepgemiddeldes van die 6 mg anorganiese (3 402 ng/g) en 6 mg organiese (16 400 ng/g) supplementeringsgroepe is veral opmerklik. Die feit dat 'n supplementering van 6 mg anorganiese selenium per dag, nie die gemiddelde seleniumvlak in die hartspier betekenisvol hoër laat styg het as 'n supplementering van 0.75 mg organiese selenium nie, staaf ook hierdie bewering.

Die seleniumvlakke in die lever het baie binne groepe gevarieer en kan as rede aangevoer word waarom die groepgemiddeldes van die 0.75 mg organiese (5432 ng/g) en anorganiese (4071 ng/g) supplementeringsgroepe nie betekenisvol hoër as die kontrole (975.5 ng/g) beskou kan word nie. By die hoër supplementeringsgroepe van organiese en anorganiese selenium (6 mg per skaap per dag) was daar 'n hoogs betekenisvolle verskil tussen die groepgemiddelde gewees. Die verskille tussen die groepgemiddeldes waar 1.5 mg organiese en anorganiese selenium gesupplementeer is en ook waar 0.75 mg organiese en anorganiese selenium gesupplementeer is, was egter nie betekenisvol gewees nie. Dit wil dus voorkom asof daar by laer supplementeringsvlakke nie 'n verskil tussen die akkumulasie van organiese en anorganiese selenium in die lever bestaan nie, maar wel by die hoër supplementeringsvlak van 6 mg per dag. Moksnes & Norheim (1983) het ook gevind dat, by laer vlakke van supplementering, daar nie 'n groot verskil is tussen organiese en anorganiese selenium om seleniumkonsentrasies in die lever te laat toeneem, nie. Volgens Van Ryssen *et al*. (1998) het die lever die grootste reaksie op 'n verhoging in seleniuminname van al die weefsels wat ondersoek is (volbloed, plasma, hart, lever, niere, skeletspier), getoon en beweer daarom dat veranderinge in die biobeskikbaarheid van selenium die beste in die lewers van diere gereflekteer sal word.

Die gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks was betekenisvol hoër ($P < 0.05$) vir die 6 mg en 1.5 mg organiese selenium supplementeringsgroepe, teenoor die 6 mg en 1.5 mg anorganiese selenium supplementeringsgroepe, respektiewelik, gewees. Die verskil tussen die gemiddelde seleniumvlakke in die nierkorteks van die 0.75 mg organiese en anorganiese

supplementeringsgroepe, was egter nie betekenisvol gewees nie. Dit kan moontlik daarop dui dat, by lae supplementeringsvlakke, daar nie betekenisvolle verskille tussen die biobeskikbaarheid van organiese en anorganiese selenium, in terme van die potensiaal om in die nierkorteks te akkumuleer, is nie. Moksnes & Norheim (1983) het ook gevind dat, by laer vlakke van supplementering, daar nie 'n groot verskil is tussen die vermoë van organiese en anorganiese selenium, om seleniumkonsentrasie in die niere te laat toeneem, nie. Verskeie studies (Kincaid *et al.*, 1977; Ullrey *et al.*, 1978; Van Ryssen *et al.*, 1998) het gevind dat seleniumkonsentrasie in die niere nie betekenisvol toeneem met 'n toename in seleniuminname nie. Echevarria *et al.* (1988) het egter ook, soos in hierdie studie, gevind dat seleniumkonsentrasies in die niere slegs by baie hoë selenium innames afhanklik van seleniuminname is.

Al drie die groepe wat organiese selenium in hul dieet ontvang het, het betekenisvol hoër seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier gehad, in vergelyking met die kontrole groep wat geen seleniumsupplement in hul dieet ontvang het nie. Die drie groepe wat anorganiese selenium ontvang het, se seleniumvlakke in die *Longissimus dorsi* spier was egter nie betekenisvol verskillend van die kontrolegroep se gemiddeld nie. Dit is dus duidelik dat daar 'n groot verskil bestaan in die vermoë van organiese en anorganiese selenium om in die spiere te akkumuleer. Die onderlinge verskille tussen die gemiddelde van die drie groepe wat anorganiese selenium ontvang het, was ook nie betekenisvol verskillend gewees nie, wat daarop kan dui dat seleniumvlakke in die spiere nie betekenisvol toeneem met 'n toename in anorganiese selenium in die dieet nie. Hierdie waarneming stem ooreen met die stelling van Mahan (1999) dat die inkorporering van selenium in skeletspiere grootliks afhanklik is van die vorm van selenium waarin dit verskaf word en ook van die vlak van selenium in die dieet. Die outeur toon aan dat daar slegs 'n klein toename in spier seleniumkonsentrasie plaasgevind het wanneer anorganiese selenium gevoer is, terwyl daar 'n lineêre toename in die seleniuminhoud van spierweefsel was, met die verskaffing van organiese selenium.

Die gemiddelde primêre produksie van antiliggamete teen per dier, 2 weke nadat die skape uitgedaag is, was die hoogste gewees vir die diere wat 1.5 mg/dag anorganiese selenium ontvang het (groep 5). Hierdie gemiddelde titerwaarde was betekenisvol hoër ($p < 0.05$) as die gemiddelde, wat vir die 1.5 mg/dag organiese selenium supplementeringsgroep verkry is, gewees. Groep 5 het 'n betekenisvol hoër primêre antiliggamteproduksie, 3 weke na uitdaging met per dier, as al die ander selenium gesupplementeerde groepe, sowel as die ongesupplementeerde kontrolegroep, gehad. Organiese en anorganiese supplementering van selenium het nie werklik 'n effek gehad op

sekondêre antiliggaamproduksie teen perd eritosiete nie, buiten groep 5 wat 'n betekenisvolle hoër produksie as die kontrolegroep gehad het. Uit bostaande resultate kan daar dus afgelei word dat die diere wat 1.5 mg anorganiese selenium per dag in hul dieet ontvang het, die beste gepestee het in terme van beide primêre (2 en 3 weke na uitdaging) en sekondêre produksie van antiliggame teen perd eritosiete. Dit was egter met die primêre antiliggaamproduksie, 3 weke na uitdaging met perd eritosiete, waar die suplementering van 1.5 mg natriumseleniet 'n baie duidelike positiewe effek getoon het. Daar kan dus, in 'n vergelyking tussen die effek van organiese en anorganiese selenium op antiliggaamproduksie, afgelei word dat anorganiese selenium, teen 'n suplementeringsvlak van 1.5 mg/dag, meer voordelig is.

Geen werk in die literatuur kon gevind word, waar die effek van organiese en anorganiese selenium op antiliggaamproduksie direk met mekaar vergelyk word, nie. Kincaid *et al.* (1999) kon wel geen betekenisvolle verskille in serum IgG en IgM vlakke, tussen ooie wat Sel-Plex ('n seleniumryke gis) ontvang het en dië wat seleniet ontvang het, vind nie. Hierdie outeurs het wel hoër konsentrasies van serum IgM in koeie, wat sout met 60 dpm Se as Sel-Plex, ontvang het, gevind, teenoor koeie wat dieselfde hoeveelheid selenium as seleniet ontvang het. Nicholson *et al.* (1993) het ook gevind dat organiese selenium meer effektief is in die bevordering van immunoglobulien sintese.

Die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie van groep 5, beide 2 weke en 3 weke na uitdaging, was betekenisvol hoër gewees as dië van groep 6, wat 0.75 mg anorganiese selenium ontvang het. Dit wil dus voorkom asof 'n suplementering van 1.5 mg natriumseleniet per dag die immuunsisteem meer bevorder as 'n suplementering van 0.75 mg natriumseleniet. Hierdie waarneming stem ooreen met die bewering van Swecker *et al.* (1989) dat die immuunsisteem hoër vlakke van selenium benodig as wat die geval is vir groei.

Larsen (1993) maak die gevolgtrekking dat die immunologiese effekte van seleniumsuplementering op die antiliggaamreaksies van beide ouderdom van die dier en van antigeen afhanklik is. Dieet seleniumkonsentrasies van 1 mg/kg, waar natriumseleniet as bron van selenium gebruik is, het die beste antiliggaamreaksies gelever in lammers tot die antigeen, tetanustoksoïed. Hierdie konsentrasie (1 mg/kg natriumseleniet) was egter minder doeltreffend as 0.1 mg Se/kg (natriumseleniet) in die stimulerings van antiliggame teen parainfluenza-3 virus en *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Larsen *et al.* 1988a). Die skape in groep 5 van huidige studie, wat die beste gepestee het in terme van antiliggaamproduksie teen perd eritosiete, se voer (hooi plus konsentraat) het 'n seleniumkonsentrasie van 1.73 mg/kg DM, waarvan ongeveer

1.2 mg/kg DM uit gesupplementeerde natriumseleniet bestaan het, bevat. Hoër konsentrasies van selenium was dus in hierdie studie nodig vir die maksimum produksie van antiligggame teen perd eritrosiete, as wat die geval was by Larsen *et al.* (1988a).

Daar is heelwat literatuur beskikbaar wat daarop dui dat 'n tekort aan selenium, primêre sowel as sekondêre antiliggaamproduksie beperk (Spallholz *et al.*, 1973; Martin & Spallholz, 1976; Baalsrud & Øvernes, 1986; Jelinek *et al.*, 1988; Larsen *et al.*, 1988a; Reffett *et al.*, 1988a; Reffett *et al.*, 1988b; Droke & Loerch, 1989; Hayek *et al.*, 1989; Stabel *et al.*, 1989; Swecker *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1990; Knight & Tyznik, 1990; Larsen, 1993). Ander outeurs is weer van mening dat lae seleniumstatus alleen nie immuniteit tot 'n groot mate beïnvloed nie (Jelinek *et al.*, 1988; Nicholson, *et al.* 1993). Aangesien die skape in hierdie projek nie aan 'n seleniumtekort onderworpe was nie, kan geen kommentaar gelewer word oor die effek van selenium byvoeding aan skape met 'n seleniumtekort, op die produksie van antiligggame nie.

Die gemiddelde primêre antiliggaamproduksie, 3 weke na uitdaging met perd eritrosiete, van groep 4, wat 'n suplementering van 6 mg natriumseleniet per dag in die dieet ontvang het, was betekenisvol laer gewees as die gemiddeld van die groepe wat 6 mg/dag organiese selenium ($p = 0.015$), 1.5 mg/dag organiese selenium ($p = 0.039$) en 1.5 mg/dag anorganiese selenium ($p = 0.0001$), ontvang het. Die gemiddeld van groep 4 het ook sterk geneig om betekenisvol laer te wees as die gemiddeld van die groep wat 0.75 mg/dag organiese selenium ontvang het ($p = 0.0527$). Hierdie duidelike onderdrukking van antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete, kan moontlik toegeskryf word aan 'n toksisiteitseffek van 'n hoë anorganiese seleniuminname.

Raisbeck *et al.* (1996) het hoë seleniumkonsentrasies aan osse gesupplementeer (ongeveer 5, 10 en 25 dpm). 'n Dosis-verwante afname in produksie van spesifieke antiligggame, in reaksie op vreemde proteïene uitdaging (heneier albumien), is gevind. 'n Afname in primêre antiliggaam reaksie is ook by wildsbokke gevind wat aan hoë seleniumvlakke blootgestel was.

Painter (1941) was die eerste persoon om voor te stel dat selenium (seleniet) toksisiteit die gevolg is van sy interaksie met tirole. Hierdie seleniumreaksies is later deur Ganther (1968) en Ganther (1971) ondersoek en gevind dat dit spontaan plaasvind en dat dit geen behoefte aan suurstof het nie. Hy beskryf die reaksies as volg:



Ganther (1968) vermoed dat selenium toksisiteit die gevolg is van die interaksie van selenium met die disulfiede van proteïene in die vorming van selenotrisulfiede (RSSeSR).

Selenotrisulfiede kan gereduseer word deur oormaat tiole of deur sellulêre glutatioon reduktase om hoogs reaktiewe selenopersulfiede (GSSeH) te vorm. Seko *et al.* (1989) het aangetoon dat seleniet met glutatioon reageer om H₂Se te vorm en daarna superoksied. Spallholz (1994) het skanderings elektron mikroskopiese bewyse dat seleniet, selenosisteïen en selfs glutatioon peroksidase *in vitro* skade kan aanrig aan die selmembrane van rot eritrosiete. Daar word vermoed dat vrye radikale die oorsaak van hierdie membraanskade kan wees. Soorgelyke skade aan membrane van *E. coli* en *B. subtilis* deur hierdie seleniumverbindings is ook waargeneem deur skanderings elektron mikroskopie. Yan & Spallholz (1991) het sekere hipoteses omtrent die meganisme van seleniumvergiftiging uit 'n reeks studies afgelei. Hulle is van mening dat seleniumverbindings, soos seleniet en seleniumdioksied, met glutatioon en ander tiole reageer om selenotrisulfiede te vorm en superoksied en waterstofperoksied te produseer. Daar is ook bepaal dat diseleniede, soos selenosistien en selenosistamien, in die teenwoordigheid van glutatioon en ander tiole, na selenole gereduseer word, wat katalities van aard is en superoksied en waterstofperoksied produseer. Selenium toksisiteit manifesteer homself wanneer oksidatiewe skade, hoofsaaklik breking en ontbinding van DNA kettings, veroorsaak deur die gevormde superoksied en waterstofperoksied, groter is as die antioksidant verdediging (Seko *et al.*, 1989). Sandholm (1993) beskryf ook hierdie pro-oksiant eienskappe van hoë vlakke van seleniet wat tot oksidatiewe skade en seleniumvergiftiging lei.

Aangesien dieselfde onderdrukkende effek nie by groep 1 gevind is, wat 6 mg/dag organiese selenium ontvang het, as groep 4, wat 6 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, nie, kan afgelei word dat anorganiese selenium 'n groter potensiaal inhou om die immuunsisteem, weens vergiftiging, te inhibeer. Martin & Hurlbut (1974) het gevind dat seleniet meer toksies is as Seleniëlselenosisteïen, wat meer toksies is as D,L-selenometionien. Hierdie resultate stem ooreen met die hipotese van Yan & Spallholz (1991) en Spallholz (1998) dat seleno-eters, soos selenometionien, *in vitro* nie katalities van aard is nie en dus nie superoksied of waterstofperoksied produseer nie, sodat dit slegs tot 'n geringe mate *in vivo* toksies is. Volgens Sandholm (1993) is selenometionien en selenosisteïen minder toksies as selenaat of seleniet, maar organiese vorme van selenium neig om meer toksies te wees in kroniese toksisiteitstudies. Dit vind plaas as gevolg van bio-akkumulering vanweë insluiting van selenium in proteïene, om 'n groter seleniumpoel te verskaf as seleniet (Waschulewski & Sunde, 1988; Sandholm, 1993; Raisbeck *et al.*, 1996). Alhoewel die skape vir 5 maande lank op die verskillende selenium

aanvullings was, is daar slegs tekens van vergiftiging, in terme van primêre antiliggaamproduksie, gevind by die groep wat 'n hoë inname van anorganiese selenium gehad nie. Dit is moontlik dat die kroniese toksisiteitseffekte van organiese selenium oor nog 'n langer periode eers sigbaar sou geraak het.

Die gemiddelde superoksiedproduksie deur PMA gestimuleerde neutrofiele van groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, was betekenisvol laer as die ongesupplementeerde kontrolegroep. Hierdie resultate stel voor dat selenium, wat as natriumseleniet teen 'n lae vlak (0.75 mg/dag), aan skape gesupplementeer word, as antioksidant optree. Hierdie antioksidatiewe eienskappe veroorsaak 'n opruiming van superoksied, wat deur die gestimuleerde neutrofiele geproduseer word. Spallholz & Boylan (1989) het inderdaad ook 'n hoër superoksiedproduksie by makrofage van muis wat aan 'n seleniumtekort blootgestel was gevind, soos gemeet deur lusigenien-versterkte chemiluminesensie. Daar dus afgelei word dat die kontrolegroep in die studie, in terme van superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele, nie voldoende selenium ingeneem het nie. Die kontrolegroep het 'n seleniuminname van 0.38 mg per dag gehad, met 'n seleniumkonsentrasie van 0.47 mg/kg in die voer (hooi plus konsentraat).

Die produksie van vrye radikale deur fagosiete is nodig vir die vernietiging van bakteriële patogene. Die vernietigingsproses word gewoonlik beperk tot intrasellulêre vakuoles wat die gefagosomeerde patogeen omring. Die reaktiewe molekules lek egter vanuit die fagolisosome in die omringende sitoplasma en intrasellulêre spasies uit. Hierdie produkte kan die sel beskadig indien dit nie gedetoksifiseer word nie. Neutrofiele bevat superoksied dismutase, katalase en glutatioon/glutatioon peroksidasie om die sel teen outo-oksidasie te beskerm. Tydens toestande van 'n antioksidant tekort, mag die selle egter deur die reaktiewe suurstof spesies beskadig word (Bendich, 1990; Larsen, 1993).

Aangesien 'n suplementering van 0.75 mg/dag anorganiese selenium, 'n betekenisvolle laer gemiddelde superoksiedtelling veroorsaak het as die kontrolegroep, in teenstelling met die groepe wat aan hoër supplementeringsvlakke van anorganiese selenium onderworpe was, wil dit dus voorkom asof hoër vlakke van anorganiese selenium homself teëwerk. Aan die eenkant tree die selenium op as 'n antioksidant (Spallholz, 1990), om gedeeltelik van die superoksied te verwyder, maar aan die anderkant het hoër vlakke van selenium ook pro-oksidatiewe eienskappe, om superoksied in die teenwoordigheid van tiol, te produseer (Seko et al., 1989; Yan & Spallholz, 1991; Spallholz, 1994).

Die gestimuleerde neutrofiele van groep 6 se gemiddelde superoksiedproduksie is verder ook betekenisvol laer as groep 3, wat, soos groep 6, ook 0.75 mg/dag per dag selenium ontvang het, maar in 'n organiese vorm. Hierdie waarneming stel voor dat organiese selenium nie dieselfde antioksidatiewe eienskappe, in terme van opruiming van superoksiede wat deur PMA gestimuleerde neutrofiele geproduseer word, in vergelyking met anorganiese selenium, toon nie. Geen literatuur kon gevind word wat hierdie verskil tussen organiese en anorganiese selenium, uitwys nie.

Wanneer die superoksiedproduksie deur die neutrofiele vir leukosietelling gekorrigeer is, kon geen betekenisvolle verskille tussen die gemiddelde van die verskillende groepe, gevind word nie. Dieselfde neiging kan egter waargeneem word, as vir die ongekorrigeerde superoksiedwaardes (Figuur 3.11).

Groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het, se gemiddelde totale T limfosiete, uitgedruk as 'n persentasie van totale leukosiete, was betekenisvol hoër as die ongesupplementeerde kontrolegroep gewees. Larsen (1993) maak die stelling dat die tekorte van die antioksidant mikro-nutriënte, T limfosiete, tot 'n groter mate as B limfosiete, mag beïnvloed. T limfosiet membrane is meer vloeibaar as die membrane van die B limfosiete en T limfosiet lipiede is ook meer sensitief vir peroksidase as B limfosiet lipiede. Die feit dat groep 6 die enigste groep waar 'n positiewe effek verkry is bo die kontrolegroep, kan daarop dui dat 0.75 mg/dag natriumseleniet meer doeltreffend is in die beskerming van die membrane van T limfosiete, in vergelyking met 'n 0.75 mg/dag organiese selenium aanvulling. 'n Duidelike dosisverwante afname is, alhoewel nie betekenisvol nie, in Figuur 3.14 sigbaar. Die T limfosiet populasie van die groepe wat met anorganiese selenium gesupplementeer is, neem af met 'n toename in anorganiese selenium inname. Hierdie tendens kan daarop dui dat 'n inname van 0.75 mg/dag natriumseleniet die T limfosiete beskerm, maar dat die inname van hoër vlakke van anorganiese selenium, in werklikheid nadelig vir die T limfosiet populasie kan wees, moontlik weens die pro-oksidatiewe eienskappe van natriumseleniet.

Kreatien fosfokinase in die serum word algemeen as 'n sensitiewe maatstaf vir spierskade beskou. Die onversadigde bindings in die lipiede van sellulêre membrane, is hoof teikens vir vrye radikaal reaksies deur die proses van lipiedperoksidase. Gevolglik is daar 'n verlies van membraanvloeibaarheid en reseptor rangskikking, met potensiële sellulêre afbraak (Bendich,

1990). Volgens Nockels (1996) is weefselmembraan skade een van die gevolge van 'n ophoping van vrye radikale. Die vernietiging van membrane lei tot uitlekking van ensieme vanuit selle wat dan die sirkulasie binnegaan.

Na een maand van seleniumsupplementering, het die ongesupplementeerde kontrolegroep 'n hoër gemiddelde kreatien fosfokinase aktiwiteit in die serum, teenoor die groepe wat organiese en anorganiese selenium aanvulling teen vlakke van 0.75 mg/dag en 1.5 mg/dag, ontvang het, gehad. Dit is dus duidelik dat, reeds na 'n periode van een maand waar skape met organiese en anorganiese selenium, teen vlakke van 0.75 en 1.5 mg/dag, gesupplementeer word, die spierselmembrane teen oksidasie beskerm word. Die aanvulling van 6 mg/dag organiese selenium het sterk geneig om 'n betekenisvolle laer kreatien fosfokinase aktiwiteit, in vergelyking met die kontrolegroep ($p = 0.059$), te veroorsaak. Die verskil tussen die kontrolegroep en groep 4 was egter nie betekenisvol gewees nie. Hieruit kan afgelei word dat 6 mg/dag natriumseleniet in die dieet, na 'n maand van supplementering, nie enige voordeel inhou nie, aangesien die pro-oksidasie effek van hoë selenietvlakke die antioksidatiewe eienskappe teëwerk.

Na 'n periode van drie maande na die aanvang van selenium byvoeding, het groep 4 'n betekenisvol hoër gemiddelde kreatien fosfokinase in die serum getoon as die kontrole en groep 6, en geneig om hoër te wees as groepe 1, 2 en 3. Daar kan dus aangeneem word dat 6 mg/dag anorganiese selenium, na 'n periode van 3 maande, tot spierskade lei, aangesien die vrye radikale wat deur die seleniet geproduseer word, veel meer is as wat deur die antioksidante vernietig kan word.

Daar word algemeen aanvaar dat 'n lewer wat onder groot druk geplaas word, vergroot. Fluharty & McClure (1997) het gevind dat lammers op ad libitum voerinname relatiewe groter lewers gehad het as lammers op 85% van ad libitum inname, wat moontlik toegeskryf kan word aan die hoër metaboliese aktiwiteit van die diere op ad libitum voerinname. Volgens Sandholm (1993) akkumuleer selenium vanaf anorganiese bronne binne enkele minute nadat dit die sirkulatoriese sisteem binnegegaan het. Die selenium word daarna weer vinnig vrygestel vanuit rooibloedselle, waarna dit opgeneem word deur die lewer, niere, milt en testis, waarna dit veral deur die uriene uitgeskei word. Met hoë selenietkonsentrasies in die bloed, vind daar tot 'n groot mate metileringsreaksies in die lewer plaas in 'n proses van detoksifisering van die seleniet. Seleno-aminosure akkumuleer egter tot 'n groter mate in die weefsels, veral skeletspiere, en detoksifisering vind tot 'n veel kleiner mate in die lewer plaas. Die lewermassa, uitgedruk as persentasie van karkasmassa, is aan die einde van die studie bepaal, sodat die mate van

stremming wat op die lewer geplaas is deur die verskillende seleniumvlakke en seleniumvorms in die dieet, ondersoek kon word. Die gemiddelde lewermassa van groepe 1, 4 en 5 was betekenisvol hoër gewees as die gemiddelde lewermassa van die ongesupplementeerde kontrolegroep en ook hoër as die gemiddelde lewermassa van groep 6, wat 0.75 mg/dag anorganiese selenium ontvang het. Hieruit kan afgelei word dat 6 mg/dag selenium, in beide organiese en anorganiese vorm, asook 1.5 mg selenium in anorganiese vorm, tot 'n vergroting van die lewer lei. Aangesien hierdie effek reeds by 'n veel laer vlak van anorganiese selenium aanvulling gevind word, kan aangeneem word dat anorganiese selenium 'n groter stremming op die lewer plaas en ondersteun die bevindinge van Sandholm (1993).

Daar bestaan 'n noue interaksie tussen die antioksidant, vitamien E, en selenium. Daar word dikwels gevind dat 'n hoë vitamien E inname die liggaam teen baie van die simptome van 'n seleniumtekort beskerm, en andersom. Hierdie sinergistiese aksies is as gevolg van die vermoë van beide tokoferol en selenium-afhanklike glutatioon peroksidase, om die produksie van lipied peroksidase produkte, soos waterstof peroksied, te verminder (Bendich, 1990). Dit sou dus raadsaam gewees het om deur die loop van die studie ook die vitamien E vlakke in die voer en serum van die diere te bepaal het. Daardeur sou bepaal kon geword het of vitamien E enige rol gespeel het in die uitkoms van die resultate. Aangesien al die diere van die verskillende groepe egter op identiese diëte was, met slegs wisselende seleniumaanvullings, kan aangeneem word dat die diere almal ongeveer dieselfde vitamien E vlakke ingeneem het. Verder is daar ook nie na effekte van seleniumtekorte gekyk nie, sodat vitamien E nie seleniumtekort simptome kon verdoesel het nie. Dit is dus onwaarskynlik dat vitamien E 'n groot effek op die uitkoms van hierdie studie gehad het.

'n Ander tekortkoming van hierdie studie is die uitlating van die bepaling van glutatioon peroksidase aktiwiteit in die verskillende groepe. Selenium is 'n belangrike komponent van die antioksidant ensiem, selenium-afhanklike glutatioon peroksidase (Nockels, 1996). Glutatioon peroksidase is belangrik in die afbraak van waterstofperoksied en lipiedperoksiede deur gereduseerde glutatioon te oksideer na geoksideerde glutatioon. Volgens Bendich (1990) kan selenium nie as 'n antioksidant beskou word voordat dit nie in die antioksidant ensieme ingesluit is nie. Spallholz (1990) maak egter die stelling dat, bykomend tot die antioksidant funksie van glutatioon peroksidase, selenium ook ander funksies in die immuunselle mag vervul, direk of indirek verwant aan die verhoogde endogene vrystelling van waterstofperoksied. Die vraag ontstaan dus tot watter mate die effekte wat in hierdie studie op die immuunsisteem waargeneem

is, 'n funksie van glutatioon peroksidase was, en tot watter mate dit 'n funksie van hierdie “ander funksies” van selenium, was. Pehrson *et al.* (1989) het gevind dat selenometionien ongeveer twee maal meer aktief as seleniet was in die verhoging van glutatioon peroksidase aktiwiteit in die eritrosiete van selenium-arme verse. Mahan (1999) het ook gevind dat anorganiese vorme van selenium gewoonlik tot hoër glutatioon peroksidase vlakke gelei het teen laer dieet seleniumvlakke as organiese selenium. Beide die chemiese vorme het egter maksimum glutatioon peroksidase aktiwiteitsvlakke teen laer konsentrasies as wat gewoonlik aan varke gevoer word, d.i. 0.3 dpm Se behaal. Daar is ook getoon dat hoër dieetvlakke nie verdere produksie van glutatioon peroksidase stimuleer nie. Indien glutatioon peroksidase in hierdie projek gemeet was, kon daar ook bepaal word tot watter mate die verskillende vorme van selenium vir die liggaam beskikbaar is om in die ensiem, glutatioon peroksidase, ingesluit te word om sodoende die belangrike funksie as antioksidant te vervul.

Ter afsluiting, kan die resultate soos volg opgesom word:

Die suplementering van organiese selenium in 'n gisvorm by skape, het tot 'n hoër mate van selenium akkumulering in die volbloed, plasma en weefsels, veral skeletspiere, gelei. By die volbloed, plasma, lewer en nierkorteks was hierdie verskil egter nie betekenisvol gewees by 'n organiese en anorganiese seleniumpuplementering van 0.75 mg/dag nie. Die skape wat 1.5 mg/dag natriumseleniet as supplement ontvang het, het die hoogste primêre en sekondêre antiliggaamproduksie teen perd eritrosiete getoon. Die gemiddelde superoksiedproduksie deur gestimuleerde neutrofiele was betekenisvol laer vir die groep met 'n 0.75 mg/dag anorganiese selenium supplementering. Dit, saam met die hoër T limfosietstelling en laer kreatien fosfokinase aktiwiteit van hierdie groep, dui op die antioksidant eienskappe van 'n laer vlak seleniet teenoor die pro-oksidant eienskappe van 'n hoë vlak van seleniet. Hierdie pro-oksidant eienskappe van hoë vlakke van natriumseleniet inname word ondersteun deur die definitiewe spierskade en die onderdrukte primêre antiliggaamproduksie, wat 'n supplementering van 6 mg/dag natriumseleniet veroorsaak het. 'n Inname van 6 mg/dag selenium, in beide organiese en anorganiese vorm, asook 1.5 mg selenium in anorganiese vorm, het tot 'n vergroting van die lewer gelei. Aangesien hierdie effek reeds by 'n veel laer vlak van anorganiese selenium aanvulling gevind word, kan aangeneem word dat anorganiese selenium 'n groter stremming op die lewer plaas.

Daar word, na aanleiding van hierdie projek, aanvaar dat anorganiese seleniumpuplementering teen 'n vlak van 0.75 mg/dag per skaap, voordelig vir die immuunsisteem is en membraanskade doeltreffend beperk. Die totale seleniuminname van hierdie groep (seleniumpuplement plus

selenium in die voer) was 0.99 mg Se/dag gewees, of 'n konsentrasie van 0.80 mg Se/kg DM. Aangesien die skape teen die einde van die projek 'n gemiddelde massa van 44 kg gehad het, word voorgestel dat 'n skaap ongeveer 0.44 mg selenium/kg gewig/dag moet inneem, waarvan minstens 75% uit 'n anorganiese selenium bestaan. Geen toksiese effekte is by hierdie vlak waargeneem, soos in die geval by die hoër vlakke van anorganiese selenium, nie. Die suplementering van 1.5 mg anorganiese selenium was nou wel meer effektief by antiliggaaamproduksie gewees, maar dit was minder effektief by ander parameters gewees en daar was tekens van toksisiteit gewees. Alhoewel die suplementering van organiese selenium nie werklik toksiese effekte, buiten die vergroting van die lewer, getoon het nie, is daar ook geen positiewe effekte op die immuunsisteem en beskerming van selmembrane, gevind nie. Organiese selenium blyk slegs doeltreffend te wees as voersupplement waar die doel is om dierlike produkte, vir mensegebruik, met selenium te verryk. Hierdie suplementering kan dan ook met 'n hoër mate van veiligheid uitgevoer word as wat die geval met anorganiese selenium is.

Verdere studies word aanbeveel waar anorganiese selenium teen kleiner intervalle rondom die 0.75 mg/dag vlak, gesupplementeer word, sodat 'n meer akkurate aanbeveling gemaak kan word omtrent die vlak van anorganiese selenium wat maksimum voordeel aan die immuunsisteem bied, sonder dat enige teken van toksisiteit sigbaar is.

HOOFSTUK 5

VERWYSINGS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. 1994. *Cellular and Molecular Immunology*. Second Edition. W.B. Saunders Company. USA.

ALFARO, E., NEATHERY, M.W., MILLER, W.J., GENTRY, R.P., CROWE, C.T., FIELDING, A.S., ETHERIDGE, R.E., PUGH, D.G. & BLACKMON, D.M. 1987. Effects of varying the amounts of dietary calcium on selenium metabolism in dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 70, 831 – 836.

ALFTHAN, G., ARO, A., ARVILOMNI, H. & HUTTUNEN, J. 1991. Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite and selenate. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53, 120 – 125.

ARDÜSER, F., WOLFFRAM, S. & SCHARRER, E. 1985. Active absorption of selenate by rat ileum. *Journal of Nutrition*. 115, 1203 – 1208.

ARTHUR, J.R. & BOYNE, R. 1985. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sciences*. 36, 1569 – 1575.

ASPILA, P. 1991. Metabolism of selenite, selenomethionine and feed-incorporated selenium in lactating goats and dairy cows. *Journal of Agricultural Science in Finland*. 63, 1 – 74.

AZIZ, C.S. & KLESIUS, P.H. 1985. The effect of selenium deficiency in goats on lymphocyte production of leukocyte migration inhibitory factor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 10, 381 – 390.

AZIZ, C.S. & KLESIUS, P.H. 1986. Depressed neutrophil chemotactic stimuli in supernatants of ionophore-treated polymorphonuclear leukocytes from selenium-deficient goats. *American Journal of Veterinary Research*. 47, 148 – 151.

AZIZ, E.S., FRANDSEN, P.H. & KLESIUS, P.H. 1984. Effect of selenium on polymorphonuclear leukocyte function in goats. *American Journal of Veterinary Research*. 45, 1715 – 1718.

- BAALSRUD, K.J. & VERNES, G. 1986. Influence of vitamin E and selenium supplement on antibody production in horses. *Equine Veterinary Journal*. 18, 472 – 474.
- BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A., SCHEID, S. & GESSNER, H. 1991. Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *Journal of Nutrition*. 121, 806 – 814.
- BEILSTEIN, M.A. & WHANGER, P.D. 1986a. Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. *Journal of Nutrition*. 116, 1701 – 1710.
- BEILSTEIN, M.A. & WHANGER, P.D. 1986b. Chemical forms of selenium in rat tissues after administration of selenite or selenomethionine. *Journal of Nutrition*. 116, 1711.
- BENDICH, A. 1990. Antioxidant nutrients and immune functions. In *Advances in experimental medicine and biology*. Edited by N. Back, *et al.* Published by Plenum Press. Volume 262.
- BOYNE, R. & ARTHUR, J.R. 1979. Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *Journal of Comparative Pathology*. 89, 151 – 158.
- BUTLER, J.A., WHANGER, P.D. & KANEPS, A.J. & PATTON, N.M. 1990. Metabolism of selenite and selenomethionine in the rhesus monkey. *Journal of Nutrition*. 120, 751 – 759.
- CERONE, S., SANSINANE, A. & AUZA, N. 1995. Copper deficiency alters the immune response of bovine. *Nutrition Research*. 15 (9), 1333 – 1341.
- DANIELS, L.A. 1996. Selenium metabolism and bioavailability. *Biological Trace Element Research*. 54, 185 – 199.
- DROKE, E.A. & LOERCH, 1989. Effects of parenteral selenium and vitamin E on performance, health and humoral immune response of steers new to the feedlot environment. *Journal of Animal Science*. 67, 1350 – 1359.

- DROKE, E.A., SPEARS, J.W., BROWN, T.T., Jr. & QURESHI, M.A. 1993. Influence of dietary zinc and dexamethasone on immune responses and resistance to *Pasteurella hemolytica* challenge in growing lambs. *Nutrition Research*. 13, 1213 – 1226.
- ECHEVARRIA, M.G., HENRY, P.R., AMMERMAN, C.B. & RAO, P.V. 1988. Effects of time and dietary selenium concentration as sodium selenite on tissue selenium uptake by sheep. *Journal of Animal Science*. 66, 2299 – 2305.
- ELLIS, T.M., MASTERS, H.G., HUSTAS, L., SUTHERLAND, S.S. & EVANS, R. 1990. The effect of selenium supplementation on antibody response to bacterial antigens in Merino sheep with a low selenium status. *Australian Veterinary Journal*. 67, 226 – 228.
- ESKEW, M.L., SCHOLZ, R.W., REDDY, C.C., TODHUNTER, D.A. & ZARKOWER, A. 1985. Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function. *Immunology*. 54, 173 – 180.
- FAULKNER, K. & FRIDOVICH, I. 1993. Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\bullet -}$. *Free Radical Biology & Medicine*. 15, 447 - 451.
- FINCH, J.M. & TURNER, R.J. 1986. Selenium supplementation in lambs: Effects on antibody responses to a salmonella vaccine. *The Veterinary Record*. 119, 430 – 431.
- FINCH, J.M. & TURNER, R.J. 1989. Enhancement of ovine lymphocyte responses: a comparison of selenium and vitamin E supplementation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 23, 245 – 256.
- FINCH, J.M. & TURNER, R.J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*. 60, 97 – 106.
- FLUHARTY, F.L. & McCLURE, K.E. 1997. Effects of dietary energy intake and protein concentration on performance and visceral organ mass in lambs. *Journal of Animal Science*. 75, 604 – 610.

- FRANK, L., IQBAL, J., HASS, M. & MASSARO, D. 1989. New “rest period” protocol for inducing tolerance to high O² exposure in adult rats. *American Journal of Physiology*. 257, L226 – 231.
- GANTHER, H.E. 1968. Selenotrisulfides. Formation by reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*. 7, 2898 - 2905.
- GANTHER, H.E. 1971. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochemistry*. 10, 4089 - 4098.
- GLEICH, G.J. & ADOLPHSON, C.R. 1986. The eosinophilic leukocyte: Structure and function. *Advance Immunology*. 39, 177 – 253.
- GRASSO, P.J., SCHOLZ, R.W., ERSKINE, R.J. & EBERHART, R.J. 1990. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. *American Journal of Veterinary Research*. 51, 269 – 274.
- GYANG, E.O., STEVENS, J.B., OLSEN, W.G., TSITSAMIS, S.D. & USENIK, E.A. 1984. Effects of selenium-vitamin E injection on bovine polymorphonucleated leukocyte phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Veterinary Research*. 45, 175 – 178.
- HAKKARAINEN, J. 1993. Bioavailability of selenium. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. Suppl 11, 21 – 35.
- HALLIWELL, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. 52 (8), 253 – 265.
- HARRISON, J.H. & CONRAD, H.R. 1984. Effect of dietary calcium on selenium absorption by the nonlactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 67, 1860 – 1864.
- HAYEK, M.G., MITCHELL Jr., G.E., HARMON, R.J., STAHLY, T.S., CROMWELL, G.L. TUCKER, R.E. & BARKER, K.B. 1989. Porcine immunoglobulin transfer after prepartum treatment with selenium or vitamin E. *Journal of Animal Science*. 67, 1299 – 1306.

HILL, H.A.O. 1981. Oxygen, oxidases, and the essential trace minerals. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 294, 119 – 128.

HUMALOJA, T. & MYKKÄNEN, H.M. 1986. Intestinal absorption of ⁷⁵Se-labeled sodium selenite and selenomethionine in chick: Effect of time, segment, selenium concentration and method of measurement. *Journal of Nutrition*. 116, 142 – 148.

IQBAL, J., CLERCH, L.B., HASS, M.A., FRANK, L. & MASSARO, D. 1989. Endotoxin increases lung Cu, Zn superoxide dismutase mRNA: O² raises enzyme synthesis. *American Journal of Physiology*. 257, L61 – 64.

JANEWAY, C.A. & TRAVERS, P. 1996. *Immuno Biology. The Immune System in Health and Disease. Second Edition*. Current Biology Ltd./ Garland Publishing Inc.

JEFFERIS, R. & POUND, J.D. Immunoglobulins. In *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press. New York.

JELINEK, P.D., ELLIS, T., WROTH, R.H., SUTHERLAND, S.S., MASTERS, H.G. & PETTERSON, D.S. 1988. The effect of selenium supplementation on immunity, and the establishment of an experimental *Haemonchus contortus* infection, in weaner Merino sheep fed a low selenium diet. *Australian Veterinary Journal*. 65, 214 – 217.

KARLMARK, B. 1993. Relation of selenium to other antioxidants, with special reference to free radicals. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. Suppl. 11, 11 – 20.

KEAST, D., CAMERON, K. & MORTON, A.R. 1988. Exercise and the immune response. *Sports Medicine*. 5, 248 – 267.

KELLEY, D.S., DAUDU, P.A., TAYLOR, P.C., MACKEY, B.E. & TURNLUND, J.R. 1995. Effects of low-copper diets on human immune response. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62, 412 – 416.

KELLY, F.J. 1993. Glutathione content of the small intestine – regulation and function. *British Journal of Nutrition*. 69, 589 – 596.

- KIKER, K.W. & BURK, R.F. 1974. Production of urinary selenium metabolites in the rat following $^{75}\text{SeO}_3$ administration. *American Journal of Physiology*. 227, 643 – 646.
- KINCAID, R.L., MILLER, W.J., NEATHERY, M.W., GENTRY, R.P. & HAMPTON, D.L. 1977. Effect of added dietary selenium on the metabolism and tissue distribution of radioactive and stable selenium in calves. *Journal of Animal Science*. 44, 147 – 151.
- KINCAID, R.L. ROCK, M. & AWADEH, F. 1999. Selenium for ruminants: comparing organic and inorganic selenium for cattle and sheep. In *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium*. Edited by Lyons, T.P. & Jacques, K.A. 537 – 545.
- KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., ROY, M., WISHE, H.I., COHEN, M.W. & STOTZKY, G. 1990. Selenium and immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*. 193, 136 – 142.
- KLEBANOFF, S.J. & CLARK, R.A. 1978. *The neutrophil: Function and Clinical Disorders*. Amsterdam: North-Holland.
- KOENIG, K.M., RODE, L.M., COHEN, R.D.H. & BUCKLEY, W.T. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *Journal of Animal Science*. 75, 817 – 827.
- KOLLER, L.D., EXON, J.H., TALCOTT, P.A., OSBORNE, C.A. & HENNINGSEN, G.M. 1986. Immune response in rats supplemented with selenium. *Clinical and experimental Immunology*. 63, 570 – 576.
- KNIGHT, D.A. & TYZNIK, W.J. 1990. The effect of dietary selenium on humoral immuno-competence of ponies. *Journal of Animal Science*. 68, 1311 – 1317.
- LARSEN, H.J.S. 1993. Relations between selenium and immunity. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. Supplement. 11, 105 – 119.

- LARSEN, H.J., MOKSNES, K. & ØVERNES, G. 1988a. Influence of selenium on antibody production in sheep. *Research in Veterinary Science*. 45, 4 – 10.
- LARSEN, H.J., ØVERNES, G & MOKSNES, K. 1988b. Effect of selenium on sheep lymphocyte responses to mitogens. *Research in Veterinary Science*. 45, 11 – 15.
- LARSEN, H.J. & TOLLERSRUD, S. 1981. Effect of dietary vitamin E and selenium on the phytohaemagglutinin response of pig lymphocytes. *Research in Veterinary Science*. 31, 301 – 305.
- LESSARD, M., YANG, W.C., ELLIOTT, G.S., REBAR, A.H., VAN VLEET, J.F., DESLAURIERS, N., BRISSON, G.J. & SCHULTZ, R.D. 1991. Cellular immune responses in pigs fed a vitamin E- and selenium-deficient diet. *Journal of Animal Science*. 69, 1575 – 1582.
- LYONS, T.P. & OLDFIELD, J.E. 1996. The case for organic selenium. *The Bulletin of Selenium-Tellurium Development Association*. June, 1 – 3.
- MACARULLA, M.T., MARCOS, R.B., MARTÍNEZ, J.A. & LARRALDE, J. 1992. Humoral and cellular mediated immune responses in legume fed mice after zinc supplementation. *Nutrition Research*. 12, 905 – 914.
- MADDOX, J.F., REDDY, C.C., EBERHART, R.J. & SCHOLZ, R.W. 1991. Dietary selenium effects on milk eicosanoid concentrations in dairy cows during coliform mastitis. *Prostaglandins*. 42, 369 – 378.
- MAHAN, D.C. 1999. Organic selenium: using nature's model to redefine selenium supplementation for animals. In *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium*. Edited by Lyons, T.P. & Jacques, K.A. 523 – 535.
- MAHAN, D.C. & PARRETT, N.A. 1996. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. *Journal of Animal Science*. 74, 2967 – 2974.

- MANDELL, G.L. 1974. Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infectious Immunology*. 9, 337 – 341.
- MARTIN, J.L. & HURLBUT, J.A. 1976. Tissue selenium levels and growth responses of mice fed selenomethionine, Se-methylselenocysteine or sodium selenite. *Phosphorus and Sulfur*. 1, 295 - 300.
- MARTIN, J.L. & SPALLHOLZ, J.S. 1976. Selenium in the immune response. *Proceedings of Symposium Se-Te in the Environment. University of Notre Dame, Indiana*. 204 – 211.
- McKENZIE, R.C., RAFFERTY, T.S. & BECKETT, G.J. 1998. Selenium: an essential element for immune function. *Trends. Immunology Today*. 19 (8), 342 – 345.
- MOKSNES, K. & NORHEIM, G. 1983. Selenium and glutathione peroxidase levels in lambs receiving feed supplemented with sodium selenite or selenomethionine. *Acta Veterinary Scand*. 24, 45 – 58.
- MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annual Reviews of Biochemistry*. 57, 321 – 347.
- MYKKÄNEN, H.M. & WASSERMAN, R.H. 1989. Uptake of ⁷⁵Se-selenite by brush border membrane vesicles from chick duodenum stimulated by vitamin D. *Journal of Nutrition*. 119, 242 – 247.
- NEBBIA, C., SOFFIETTI, G., ZITTLAU, E. & FINK-GREMMELS, J. 1991. Pathogenesis of sodium selenite and dimethylselenide acute toxicosis in pigs: Cardiovascular changes. *Research of Veterinary Science*. 50, 269 - 272.
- NEMEC, M., HIDIROGLOU, M., NIELSEN, K. & PROULX, J. 1990. Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *Journal of Animal Science*. 68, 4303 – 4309.

- NÈVE, J. 1994. Assessing the biological activity of selenium supplements: Interest of blood selenium and glutathione peroxidase. *Proceedings of STDA's Fith International Symposium. Brussels.* 123 – 130.
- 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. *Canadian Journal of Animal Science.* 73, 355 – 365.
- NOCKELS, C.F. 1996. Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Animal Feed Science Technology.* 62, 59 – 68.
- OLDFIELD, J.E. 1997. Efficacy of various forms of selenium for livestock. A review. *The Bulletin of Selenium-Tellurium Development Association.* Special Issue, 1 – 8.
- PAINTER, E.P. 1941. The chemistry and toxicity of selenium compounds with special reference to the selenium problem. *Chemical reviews.* 28, 179 - 213.
- PAUL, W.E. 1992. Development and function of lymphocytes. In *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates.* Raven Press. New York.
- PAYNTER, D.K. 1979. Glutathione peroxidase and selenium in sheep I. Effect intramunal selenium selenium pellets on tissue glutathione peroxidase activities. *Australian Journal of Agricultural Research.* 30, 695.
- PEAKMAN, M. & VERGANI, D. 1997. *Basic and Clinical Immunology.* Published by Churchill Livingstone.
- PEHRSON, B.G. 1993. Countering selenium deficiency. Organic versus inorganic sources. *Feed International.* October, 16 – 22.
- PEHRSON, B., KNUTSSON, M. & GYLLENSWARD, M. 1989. Glutathione peroxidase activity in heifers fed diets supplemented with organic and inorganic selenium compounds. *Swedish Journal of Agricultural Research.* 19, 53 – 57.

- POLITIS, I., HIDIROGLOU, M., BATRA, T.R., GILMORE, J.A., GOREWIT, R.C. & SCHERF, H. 1995. Effects of vitamin E on immune function in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*. 56, 179 – 184.
- POLLOCK, J.M., McNAIR, J., KENNEDY, S., KENNEDY, D.G., WALSH, D.M., GOODALL, E.A., MACKIE, D.P. & CROCKARD, A.D. 1994. Effects of dietary vitamin E and selenium on in vitro cellular immune responses in cattle. *Research in Veterinary Science*. 56, 100 – 107.
- PORTER, E.K., KARLE, J.E. & SCHRIFT, A. 1979. Uptake of selenium-75 by human lymphocytes in vitro. *Journal of Nutrition*. 109, 1901 – 1908.
- PROHASKA, J.R. 1988. Biochemical functions of copper in animals. In *Essential and Toxic Elements in Human Health and Disease*. Edited by A.S. Prasad. Published by Alan R. Liss, Inc. New York. 105 – 124.
- PROHASKA, J.R. & Lukasewycz, A. 1990. Effects of copper deficiency on the immune system. In *Advances in experimental medicine and biology*. Edited by N. Back, *et al.* Published by Plenum Press. Volume 262.
- RAISBECK, M.F., BELDEN, E.L., O'TOOLE, D. & WAGGONER, J.W. 1996. Toxicologic Evaluation of Chronic Selenosis in Wyoming Herbivores. Abandoned Coal Lands Research Program. Final Report. University of Wyoming.
- REDDY, P.G., MORRILL, J.L., MINOCHA, H.C., MORRILL, M.B., DAYTON, A.D. & FREY, R.A. 1986. Effect of supplemental vitamin E on the immune system of calves. *Journal of Dairy Science*. 69, 164 – 171.
- REDDY, P.G., MORRILL, J.L. & FREY, R.A. 1987. Vitamin E requirements of dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 70, 123 – 129.
- REFFETT, J.K., SPEARS, J.W. & BROWN, T.T., Jr. 1988a. Effect of dietary selenium on the primary and secondary immune response in calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Journal of Nutrition*. 118, 229 – 235.

- REFFETT, J.K., SPEARS, J.W. & BROWN, T.T., Jr. 1988b. Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza virus. *Journal of Animal Science*. 66, 1520 – 1528.
- REINHOLD, U., PAWELEC, G., ENCZMANN, J. & WERNET, P. 1989. Class-specific effects of selenium on PWM-driven human antibody synthesis in vitro. *Biological Trace Element Research*. 20, 45 – 49.
- ROSENFELD, I. & BEATH, O.A. 1964. In: *Selenium. Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition*. Academic Press, New York.
- SANDHOLM, M. 1993. Acute and chronic selenium toxicity. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. Suppl. 11, 37 - 50.
- SCHOLZ, R.W. & HUTCHINSON, L.J. 1979. Distribution of glutathione peroxidase activity and selenium in the blood of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*. 10, 245.
- SCHWARZ, K. & FOLTZ, C.M. 1957. Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary liver degeneration. *Journal of American Chemical Society*. 79, 3292.
- SEKO, Y., SAITO, Y., KITAHARA, J. & IMURA, N. 1989. Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: *Selenium in Biology and Medicine*. Edited by Wendel, A. Springer-Verlag, Berlin. 70 - 73.
- SINGH, A., FAILLA, M.L. & DEUSTER, P.A. 1994. Exercise-induced changes in immune function: effects of zinc supplementation. *Journal of Applied Physiology*. 76 (6), 2298 – 2303.
- SPALLHOLZ, J.E. 1990. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. In *Advances in experimental medicine and biology*. Edited by N. Back, *et al.* Published by Plenum Press. Volume 262.
- SPALLHOLZ, J.E. 1998. The negative effect of excessive amounts of naturally occurring selenium. *The Bulletin of Selenium-Tellurium Development Association*.

- SPALLHOLZ, J.E. & BOYLAN, L.M. 1989. Effects of dietary selenium on peritoneal macrophage chemiluminescence. *Federation Journal*. 3, A778.
- SPALLHOLZ, J.E., MARTIN, J.L., GERLACH, M.L. & HEINZERLING, R.H. 1973. Enhanced immunoglobulin M and immunoglobulin G antibody titers in mice fed selenium. *Infection and Immunity*. 8, 841 – 842.
- SPALLHOLZ, J.E., MARTIN, J.L., GERLACH, M.L. & HEINZERLING, R.H. 1975. Injectable selenium: Effect on the primary immune response of mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 148, 37 – 40.
- STABEL, J.R., REINHARDT, T.A. & NONNECKE, B.J. 1991. Effect of selenium and reducing agents on in vitro immunoglobulin M synthesis by bovine lymphocytes. *Journal of Dairy Science*. 74, 2501 – 2506.
- 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 hemolytica*. *Journal of Animal Science*. 67, 557 – 564.
- STADTMAN, T. 1991. Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 16257 - 16260.
- SWECKER, W.S., EVERSOLE, D.E., THATCHER, C.D., BLODGETT, D.J., SCHURIG, G.G. & MELDRUM, J.B. 1989. Influence of supplemental selenium on humoral immune responses in weaned beef calves. *American Journal of Veterinary Research*. 50, 1760 – 1763.
- SWECKER, W.S., THATCHER, C.D., EVERSOLE, D.E., BLODGETT, D.J. & SCHURIG, G.G. 1995. Effect of selenium supplementation on colostral IgG concentration in cows grazing selenium deficient pastures and on post-suckle serum IgG concentration in their calves. *American Journal of Veterinary Research*. 56, 450 – 453.
- THOMSON, C. & ROBINSON, M. 1986. Urinary and fecal excretion and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *American Journal of Clinical Nutrition*. 44, 659 – 663.

- TURNER R.J. & FINCH, J.M. 1990. Immunological malfunctions associated with low selenium-vitamin E diets in lambs. *Journal of Comparative Pathology*. 102, 99 – 109.
- TURNER R.J. & FINCH, J.M. 1991. Selenium and the immune response. *Proceedings of the Nutrition Society*. 50, 275 – 285.
- TURNER, R.J., WHEATLY, L.E. & BECK, N.F.G. 1985. Stimulatory effects of selenium on mitogen responses in lambs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 8, 119 – 124.
- TWOMEY, T., CRINION, R.A.P. & GLAZIER, D.B. 1977. Selenium Toxicity in cattle in Co. Meath. *Irish Veterinary Journal*. 31 (3), 41 - 46.
- VAN RYSSSEN, J.B.J., DEAGEN, J.T., BEILSTEIN, M.A. & WHANGER, P.D. 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37, 1358 – 1363.
- VAN RYSSSEN, J.B.J., VAN MALSEN, P.S.M. & HARTMANN, F. 1998. Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep. *Journal of Agricultural Science*. 130, 107 – 114.
- ULLREY, D.E., LIGHT, M.R., BRADY, P.S., WHETTER, P.A., TILTON, J.E., HENNEMAN, H.A. & MAGEE, W.T. 1978. Selenium supplementation in salt for sheep. *Journal of Animal Science*. 46, 1515 – 1521.
- WARD, J.D., GENGELBACH, G.P. & SPEARS, J.W. 1997. The effects of copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. *Journal of Animal Science*. 75, 1400 – 1408.
- WARD, J.D., SPEARS, J.W. & KEGLEY, E.B. 1993. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulfate) on copper status, performance, and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulfur. *Journal of Animal Science*. 71, 2748 – 2755.

WASCHULEWSKI, I.H. & SUNDE, R.A. 1988. Effect of dietary methionine on tissue selenium and glutathione peroxidase activity in rats given selenomethionine. *British Journal of Nutrition*. 60, 57 – 68.

WINDHAUSER, M.M., KAPPEL, L.C., McCLURE, J. & HEGSTED, M. 1991. Suboptimal levels of dietary copper vary immunoresponsiveness in rats. *Biological Trace Element Research*. 30, 205 – 209.

WOLFFRAM, S. 1999. Absorption and metabolism of selenium: differences between inorganic and organic sources. In *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium*. Edited by Lyons, T.P. & Jacques, K.A. 547 – 566.

WOLFFRAM, S., ARDÜSER, F. & SCHARRER, E. 1985. *In vivo* intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *Journal of Nutrition*. 115, 454 – 459.

YOUNG, V.R., NAHAPETIAU, A. & JANGHORBANI, M. 1982. Selenium bio-availability with reference to human nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 35, 1076 - 1088.