

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Additie van selenium-methionine en N-acetyl-L-cysteïne bij hittegestresseerde vleeskippen en hun effect op oxidatieve stress.

**Elise Rosseel**

Promotor: Dr. ir. J. Michiels

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van

Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

Additie van selenium-methionine en N-acetyl-L-cysteïne bij hittegestresseerde vleeskippen en hun effect op oxidatieve stress.

**Elise Rosseel**

Promotor: Dr. ir. J. Michiels

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van

Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde

# Auteursrecht

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te

stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik.

Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

The author and the promoter give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use.

Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis.

3 juni 2016

Promotor Joris Michiels Auteur Elise Rosseel

# Woord vooraf

Met trots kijk ik terug op het afgelopen jaar. Na het lopen van stage in de plantaardige productie, wilde ik de boeg even omdraaien en mijn masterproef schrijven over een onderwerp in de dierlijke productie. Ik heb veel bijgeleerd over pluimvee in het algemeen en over hittestress en oxidatieve stress in het bijzonder. In augustus 2015 werden de kuikens gehuisvest op de proefhoeve van Lanupro, die ik sindsdien nauw heb opgevolgd. Om deze ervaring mogelijk te maken wil ik graag een aantal mensen bedanken.

In eerste plaats wil ik Dr. Ir. J. Michiels bedanken voor het mooie onderwerp en voor de motivatie. Ik kende de pluimveesector niet en u hebt me steeds geholpen waar nodig. Bedankt om te helpen in de stal, bij het slachten van de kippen, bij het berekenen van resultaten en bij het nalezen van deze masterproef. Ook Ing J. Degroote wil ik bedanken voor het vele werk in het labo. Ik kon steeds op hem rekenen bij alle praktische zaken van deze masterproef!

Ook een dankjewel aan Sabien, Daisy, Eric en Ann voor de helpende en ondersteunende hand in het labo. Ook wanneer het te druk was voor mij, kon ik beroep doen op jullie! Tevens nog een speciale dank aan Tessa en Marjam, die me hielpen bij het werk in de stal. Samen met jullie heb ik de momenten in de stal steeds met plezier beleefd!

Tot slot wil ik nog een dankjewel zeggen aan mijn ouders en mijn vriend die me steeds steun en vertrouwen gaven tijdens moeilijkere momenten. Bedankt Charlotte en Emmy voor het nalezen van de tekst.

# Abstract

**Nederlands**

De laatste jaren is er grote interesse in het onderzoek naar hittestress bij pluimvee, en de daarmee gepaard gaande oxidatieve stress. In warme zomermaanden kunnen hoge temperaturen aanleiding geven tot hittestress bij vleeskippen in de afmestfase. Er is sprake van hittestress als de warmteproductie in het dier niet voldoende kan afgevoerd worden waardoor de lichaamstemperatuur stijgt. Tijdens hittestress wordt vastgesteld dat er een verhoogde lekkage van elektronen is in de elektronentransportketen van de mitochondriën, waardoor zuurstofmoleculen niet volledig gereduceerd worden tot water, maar aanleiding geven tot reactieve zuurstofverbindingen (ROS). Deze radicalen kunnen schade toebrengen aan lipiden, proteïnen, carbohydraten en DNA, waardoor celdood en weefselbeschadiging kan ontstaan. Oxidatieve stress treedt op wanneer er een onevenwicht bestaat tussen de ROS productie en de beschikbare antioxidanten.

In deze scriptie werd het effect van twee additieven (2 x 4 factoriële proef) op groei- en antioxidantparameters, met bijzondere aandacht voor glutathion, bij vleeskippen onder hittestress nagegaan. Selenium-methionine (Se-Met) is een organische vorm van selenium en selenium is een essentiële cofactor in verschillende enzymen, zoals glutathionperoxidase. Se-Met werd toegevoegd aan 0 en 0,20 mg Se per kg voeder en dit voor de ganse proef (d0-41). N-acetyl-L-cysteïne (NAC) is een stabiele vorm van het aminozuur cysteïne en is bijgevolg een precursor voor eiwitsynthese en het antioxidant glutathion. Het werd gesupplementeerd aan 0, 500, 1000 en 2000 mg/kg enkel in de afmestfase (d25-41). Vanaf d28 werden de vleeskippen onderworpen aan een chronisch cyclisch hittestressmodel. Dagelijks werd de staltemperatuur opgevoerd tot 34°C gedurende 7 uur. Op d29 (acute hittestress) en d41 (chronische hittestress) werden vleeskippen bemonsterd voor fysiologische parameters. Se-Met verhoogde de groei in de starterfase (P=0,012). Daarnaast werd een trend waargenomen voor hogere voederopname en lagere voederconversie. NAC had een negatief effect op de dagelijkse voederopname (P=0,006) en een positief effect op de voederconversie (P<0,001) in de afmestfase, terwijl groei- en eindgewicht een trend tot verhoging vertoonden. Se-Met en NAC hadden geen effect op de GSH-concentratie in diverse weefsels. Ook voor hematocrietwaarde, rectale temperatuur, kleurparameters en MDA-waarden werden geen significante verschillen aangetroffen. Wellicht kan het positieve effect van NAC op de dierprestaties in de afmestfase verklaard worden door een methionine-sparend effect, temeer daar het geanalyseerde ruw eiwitgehalte van het afmestvoeder zeer laag was.

Kernwoorden: vleeskippen, hittestress, oxidatieve stress, glutathion, selenium-methionine en N-acetyl-L-cysteïne.

# Abstract

**English**

In recent years, many research has been dedicated to heat stress in poultry, and its relation to oxidative stress. High summer temperatures can give rise to heat stress problems in finishing broilers. Heat stress occurs when the body heat production exceeds the ability to dissipate heat, resulting in an increased body core temperature. Increased leakage of electrons in the electron transport chain residing in the mitochondria has been reported during episodes of heat stress. As a consequence, molecular oxygen is not reduced to water, rather to reactive oxygen species (ROS). These radical species can damage lipids, proteins, carbohydrates and DNA, ultimately leading to apoptosis and tissue damage. When the production of ROS surpasses the antioxidant capacity, oxidative stress takes place.

In the current thesis, the effect of two feed additives (2 x 4 factorial design) on growth and parameters of oxidative status, with particular emphasis on glutathione, in heat stressed broilers chickens was studied. Selenium-methionine (Se-Met) is an organic source of selenium and Se is an essential cofactor for various enzymes, such as glutathione-peroxidase. Se-Met was added to the diet for the whole rearing period (d0-41) at 0 and 0.20 mg Se per kg feed. N-acetyl-L-cysteine (NAC) is a stable form of the amino acid cysteine, and as such is a precursor for protein synthesis and the antioxidant glutathione. NAC was added to the finisher diet (d25-41) at 0, 500, 1000 and 2000 mg/kg. Starting at d28, a chronic cyclic heat stress model was implemented. Daily, the barn temperature was raised to 34°C for 7h. On d29 (acute heat stress) and d41 (chronic heat stress), broilers were sampled to determine physiological parameters. Se-Met icreased growth in the starter phase (P=0.012). In addition, feed intake and feed conversion showed a trend to be improved by Se-Met. NAC exhibited a negative and positive effect on feed intake (P=0.006) and feed conversion (P<0.001) in the finisher period, respectively; while growth and final body weight showed a trend to be elevated. Se-Met and NAC had no effect on GSH in various tissues. Nor was hematrocrite, rectal temperature, breast meat colour and MDA affected by additive supplementation. Likely, the positive effect of NAC on animal performance in the finisher phase can be explained by its methionine sparing effect, considering the very low analyzed crude protein level of the finisher diet.

Keywords: broilers, heat stress, oxidative stress, glutathione, selenium-methionine and N-acetyl-L-cysteine

# Inhoudstabel

[Hoofdstuk 1: Literatuurstudie 6](#_Toc451445741)

[1.1 Inleiding 6](#_Toc451445743)

[1.2 Hittestress 6](#_Toc451445744)

[1.2.1 Interactie van hittestress in elektronentransportketen 9](#_Toc451445745)

[1.2.2 Indicatoren hittestress 9](#_Toc451445746)

[1.3 Relatie tussen oxidatieve stress en hittestress 11](#_Toc451445747)

[1.3.1 Oxidatieve stress 11](#_Toc451445748)

[1.3.2 Defensiemechanismes van het lichaam tegen oxidatieve stress 12](#_Toc451445749)

[1.3.3 Relatie hittestress en mitochondriale dysfunctie 13](#_Toc451445750)

[1.3.4 Relatie hittestress en oxidatieve stress 14](#_Toc451445751)

[1.4 Antioxidanten 15](#_Toc451445752)

[1.4.1 Strategieën om hittestress geïnduceerde oxidatieve stress te verlagen 15](#_Toc451445753)

[1.4.2 Glutathion als antioxidant 16](#_Toc451445754)

[1.5 Toevoegen van voederadditieven 19](#_Toc451445755)

[1.5.1 Selenium-methionine 19](#_Toc451445756)

[1.5.2 N-acetyl-L-cysteïne 23](#_Toc451445787)

Hoofdstuk 2: [Materialen en methode 31](#_Toc451445788)

[2.1 Inleiding 31](#_Toc451445789)

[2.2 Dierproef 31](#_Toc451445790)

[2.3 Voeders 33](#_Toc451445791)

[2.4 Litter score 36](#_Toc451445792)

[2.5 Staalnameprocedure 37](#_Toc451445793)

[2.6 Analyses 38](#_Toc451445794)

[2.6.1 Fysiologische parameters van oxidatieve stress 38](#_Toc451445795)

[2.6.2 Bepaling van parameters op vlees 40](#_Toc451445796)

[2.7 Statistische analyse 42](#_Toc451445797)

[2.7.1 Zoötechnische factoren 42](#_Toc451445798)

[2.7.2 Andere parameters 42](#_Toc451445799)

Hoofdstuk 3: [Resultaten 43](#_Toc451445801)

[3.1 Resultaten voederanalyses 43](#_Toc451445802)

[3.2 Zoötechnische prestaties 44](#_Toc451445803)

[3.3 Effect op fysiologische parameters van oxidatieve stress 45](#_Toc451445804)

[3.3.1 GSSG/GSH redox status in lever- en hartweefsel 45](#_Toc451445805)

[3.3.2 MDA 48](#_Toc451445806)

[3.3.3 Histomorfologie van de dunne darm 49](#_Toc451445807)

[3.3.4 Hematocriet 50](#_Toc451445808)

[3.3.5 Rectale temperatuur 50](#_Toc451445809)

[3.3.6 litter score 51](#_Toc451445810)

[3.4 Vleeskwaliteit 51](#_Toc451445811)

[3.4.1 Oxidatie van vers vlees: TBARS-analyse 51](#_Toc451445812)

[3.4.2 Kleur en pH 52](#_Toc451445813)

Hoofdstuk 4: [Discussie 54](#_Toc451445815)

[4.1 Voeders 54](#_Toc451445816)

[4.2 Zoötechnische prestaties 56](#_Toc451445817)

[4.3 Fysiologische parameters van oxidatieve stress 57](#_Toc451445818)

[4.3.1 GSSG/GSH 57](#_Toc451445819)

[4.3.2 MDA 58](#_Toc451445820)

[4.3.3 Villus en crypten 59](#_Toc451445821)

[4.3.4 Hematocriet 59](#_Toc451445822)

[4.3.5 Rectale temperatuur 60](#_Toc451445823)

[4.3.6 Litter score 60](#_Toc451445824)

[4.4 Effect van oxidatieve stress op vlees 60](#_Toc451445825)

[4.4.1 TBARS-analyse 60](#_Toc451445826)

[4.4.2 Kleur en pH 61](#_Toc451445827)

[Algemeen besluit 62](#_Toc451445829)

[Bibliografie 63](#_Toc451445830)

Lijst met afkortingen

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ADFI | gemiddelde voederopname | NAC | N-acetyl-L-cysteïne |
| ADG | gemiddelde gewichtstoename | NDC2 | Newcastle Disease |
| ATP | adenosinetrifosfaat | OH\*- | hydroxyderadicaal |
| avUCP | aviair ontkoppelingseiwit | PCA | perchloric acid solution |
| AZ | aminozuren | PUFA’s | poly-onverzadigde vetzuren |
| BHT | 2.6-di-tertiair-butyl-4-methylfenol | Ras | ruw as |
| BPDS | bathofenanthroline disulfonzuur | RE | ruw eiwit |
| BW | lichaamsgewicht | ROS | reactieve zuurstofspecies |
| CAT | catalase | RV | relatieve vochtigheid |
| DS | droge stof | SAH | S-adenosylhomocysteïne |
| EDTA | ethyleendiaminetetra-azijnzuur | SAM | adenosylmethionine |
| FC | voederconversie | SCH | Se-chlorella |
| GPx | glutathion peroxidase | SDS | sodium dodecyl sulphate |
| GSH | glutathion | Se | selenium |
| GSSG | glutathiondislufide | Se-Met | selenium-methionine |
| GSR | glutathion reductase | SOD | dismutase |
| HPLC | high-performance liquid chromatography | SP | Sel-Plex |
| IBMAS | infectieuze bronchitis | TBARS | thiobarbituur reactieve species |
| IgG | immunoglobuline G | TMP | tetramethoxypropaan |
| IgM | immunoglobuline M | VCp | verteerbaar cysteïne |
| MDA | malondialdehyde | Vlysp | verteerbaar lysine |
| MnSOD | Mangaan superoxide dismutase | VM+Cp | verteerbaar methionine en cysteïne |
| MORM | minimum obligatory requirement  for methionine |  |  |

Lijst met tabellen en figuren

[Tabel 1: Verband tussen RV, temperatuur, leeftijd en gewicht (Gansbeke & Bogaert, 2011). 7](#_Toc452664100)

[Tabel 2: Overzichtstabel van beschreven effecten van Selenium 23](#_Toc452664101)

[Tabel 3: beschreven effecten van NAC bij vleeskippen. 25](#_Toc452664102)

[Tabel 4: Aminozuurbehoeften bij vleeskippen in de verschillende fasen. 28](#_Toc452664103)

[Tabel 5: Se-Met en NAC volgens de verschillende behandelingen 32](#_Toc452664104)

[Tabel 6: Grondstoffen en berekende samenstelling voor starter-, groei- en eindvoeder. 34](#_Toc452664105)

[Tabel 7: De berekende waarden van aminozuren in het voeder in de afmestfase 36](#_Toc452664106)

[Tabel 8: Beoordeling van strooiselkwaliteit 36](#_Toc452664107)

[Tabel 9: Parameters methionine-, cysteïne- en seleniumgehalten, droge stof (DS), ruw eiwit (RE) en ruw vet (RV) aanwezig in het voeder tijdens starter-, groei- en eindfase voor behandeling T1 en T5 (T1 = zonder Se-Met; T5 = 0,20 mg/kg Se-Met). 44](#_Toc452664108)

[Tabel 10: Resultaten van zoötechnische prestaties voor lichaamsgewicht (BW), dagelijkse groei (ADG), dagelijkse voederopname (ADFI), voederconversie (FC) en mortaliteit voor de periode d0-d10, d10-d25 en d25-d41. 45](#_Toc452664109)

[Tabel 11: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de concentratie van glutathion (GSH) in de lever van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 46](#_Toc452664110)

[Tabel 12: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de glutathion redox status (GSSG/GSH) in de lever van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 46](#_Toc452664111)

[Tabel 13: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine (Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de concentratie van glutathion (GSH) in de hart van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress. 47](#_Toc452664112)

[Tabel 14: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de glutathion redox status (GSSG/GSH) in het hart van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 48](#_Toc452664113)

[Tabel 15: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de concentratie van malondialdehyde (MDA) in het bloedplasma van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 48](#_Toc452664114)

[Tabel 16: Resultaten MDA-concentratie (nmol/mL) voor interactieterm (Se-Met \* NAC). 49](#_Toc452664115)

[Tabel 17: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de cryptendiepte (µm), villuslengte (µm) en crypten/villi verhouding van vleeskippen na chronische (d41) hittestress 49](#_Toc452664116)

[Tabel 18: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de hematocrietwaarde van het bloed van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 50](#_Toc452664117)

[Tabel 19: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de rectale temperatuur van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress 51](#_Toc452664118)

[Tabel 20: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de strooiselkwaliteit 51](#_Toc452664119)

[Tabel 21: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op het Tbars-getal (µg malonaldehyde/g vers vlees) van vleeskippen op dag 42 52](#_Toc452664120)

[Tabel 22: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de Lab-waarden en pH-verschil van vleeskippen na chronische (d42) hittestress 53](#_Toc452664121)

[Tabel 23: % ruw eiwit behoefte aanwezig in iedere fase volgens iBBT en ROSS308 richtlijnen 55](#_Toc452664122)

[Figuur 1: Verdeling van zones op basis van RV en temperatuur (Gansbeke & Bogaert, 2011). 7](#_Toc452655435)

[Figuur 2: Rectale temperatuur na aantal uren hittestress (Altan et al., 2003). 10](#_Toc452655436)

[Figuur 3: Elektron lekkage tijdens elektronentransport (Ma et al., 2012). 13](#_Toc452655437)

[Figuur 4: Gereduceerde en geoxideerde vorm van glutathion (GSH en GSSG) (Fukagawa et al., 1996). 17](#_Toc452655438)

[Figuur 5: Rol van glutathionperoxidase en glutathionreductase en de interactie met superoxide dismutase (Pinto et al., 2002). 18](#_Toc452655439)

[Figuur 6: Omzetting van SAM in SAH via afsplitsing van CH3 (Linse, 2013). 26](#_Toc452655440)

[Figuur 7: Methionine cyclus (Best). 27](#_Toc452655441)

[Figuur 8: Proefoverzicht met starter-, groei- en eindfase. 33](#_Toc452655442)

[Figuur 9: villi en crypten van jejunum bij vleeskippen (Juxing Chen, 2015). 40](#_Toc452655443)

# Hoofdstuk 1

# Literatuurstudie

## 1.1 Inleiding

Door vaak hogere productie-eisen en efficiënte voederconversies worden kippen vatbaarder voor hittestress. Hittestress kan hyperthermie veroorzaken en uiteindelijk leiden tot de dood van de kip. Het is geweten dat in warme zomermaanden het dodental in de kippenindustrie soms hoog kan oplopen. Daarom is er nood aan procedures en methodes om deze stress te vermijden in warmere perioden van het jaar. Een fenomeen dat gepaard gaat met hittestress is oxidatieve stress. Dit is een verstoring tussen oxidatieproducten en antioxidanten, waardoor een verhoogde dysfunctie van cellen en organellen ontstaat.

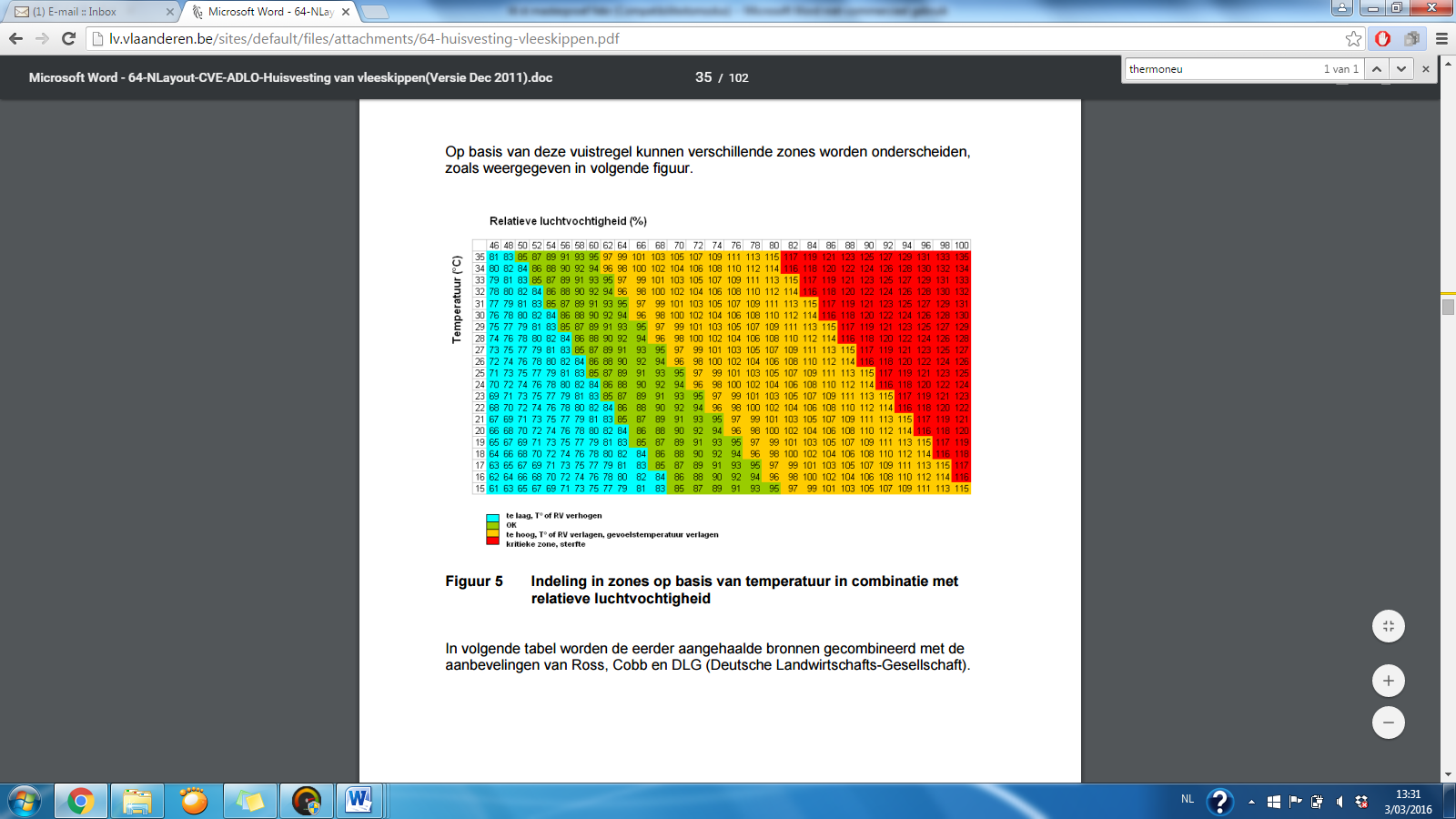
In deze literatuurstudie worden hittestress en oxidatieve stress en hun onderlinge relatie besproken bij vleeskippen. Er wordt gezocht naar indicatoren die hittestress aangeven en tevens komen enkele oplossingen aan bod. Het belang van antioxidanten bij vleeskippen wordt uitgelegd en de additieven selenium-methionine en N-acetyl-L-cysteïne worden aangekaart.

## 1.2 Hittestress

Vandaag de dag moet elke landbouwer rekening houden met het dierenwelzijn van zijn landbouwhuisdieren. Deze dieren zijn in staat hun lichaamstemperatuur goed onder controle te houden ondanks de soms wisselende omgevingstemperaturen. Vleeskippen beschikken over een thermoneutrale zone, waarbij de dieren geen aangepast gedrag vertonen om hun lichaamstemperatuur te behouden. Bij jonge kuikens is dit bereik zeer klein en wordt er op dag 1 een temperatuur ingesteld van 32°C. Deze temperatuur daalt elke week 3 graden tot week 4. Vanaf dan wordt er onder normale omstandigheden een temperatuur van 20°C aangehouden tot aan het slachten (Gansbeke & Bogaert, 2011). In deze masterproef werden de kippen echter blootgesteld aan hittestresstemperaturen. In Tabel 1 worden de gewenste temperaturen en relatieve vochtigheid (RV) opgesomd volgends de leeftijd en het gewicht van de dieren (Gansbeke & Bogaert, 2011). Dit zijn doelstellingen, want de temperatuur kan wijzigen volgens de bezetting en het gedrag van de dieren. Temperatuur en RV zijn omgekeerd evenredig. Bij 10% lagere RV, moet de temperatuur met 1°C stijgen. Wanneer de RV laag is, zal de gevoelstemperatuur afnemen. Als de temperaturen te hoog zijn, kunnen kippen afkoelen door verdamping van vocht via de ademhaling. Hoe kleiner de RV, hoe meer vocht er kan uitgewisseld worden en dus hoe groter het verkoelend effect zal zijn. Met een lage luchtvochtigheid kunnen de dieren gemakkelijker hun lichaamstemperatuur regelen. Een te lage RV is dan weer nadelig voor stofvorming. De ideale relatie tussen temperatuur en RV wordt weergegeven in Figuur 1 (Gansbeke & Bogaert, 2011).

Tabel 1: Verband tussen RV, temperatuur, leeftijd en gewicht (Gansbeke & Bogaert, 2011).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Leeftijd (dgn) | Gewicht (g) | Gewenste staltemp. (°C) | %RV |
| 0 | 50 | 33-35 | 50-60 |
| 3 | 80 | 33-35 | 50-60 |
| 7 | 160 | 30-31 | 55-65 |
| 14 | 400 | 26-28 | <70 |
| 21 | 750 | 23-26 | <70 |
| 28 | 1200 | 20-24 | <70 |
| 35 | 1700 | 20-23 | <75 |
| 42 | 2300 | 20-22 | <75 |



Figuur : Verdeling van zones op basis van RV en temperatuur (Gansbeke & Bogaert, 2011).

De ideale temperatuur nabootsen in de stal is vaak moeilijk. Kippen zijn in staat een balans te vinden tussen warmteproductie en warmteverlies. Dit wordt aangeduid met de term thermoregulatie. Bij toenemende hitte zullen deze dieren proberen minder warmte te produceren en meer warmte af te voeren (Renaudeau et al., 2012). In warme zomermaanden kan er sprake zijn van hittestress wanneer het dier de warmte onvoldoende kan afvoeren en bijgevolg de lichaamstemperatuur in kleine mate toeneemt. Aangezien de warmteafvoer de warmtetoevoer niet meer kan volgen, is de thermoregulatie verstoord. Dit fenomeen wordt erger naarmate de RV hoger is. De hitte zorgt voor een verminderde voederopname en dit laatste zorgt dan weer voor een verlaging van productieresultaten (Lara & Rostagno, 2013). In een onderzoek van twaalf dagen hitte werd aangetoond dat de hittestress een dagelijkse voedervermindering van 28,58 g/dier kan veroorzaken. Dit zorgt ervoor dat de groei sterk vertraagd wordt (Prieto & Campo, 2010).

Onder de verschillende vormen van hittestress is de acute vorm de belangrijkste doder bij pluimvee. Acute hittestress zorgt voor de oxidatie van de substraten in het membraan en de moleculen in het cytosol en de kern. Het verhoogt tevens de werking van de elektronentransportketen in de mitochondriën. Hierdoor is er meer kans op de productie van het superoxide O2˙. In een later stadium van acute stress zal de downregulatie van avUCP (avian uncoupling protein) de oxidatieve stress versterken. Dit leidt tot weefselschade. (Mujahid et al., 2006).

Chronische hittestress treedt dan weer op wanneer het pluimvee voor een langere periode aan hoge temperaturen wordt blootgesteld. Hierdoor ontstaat acclimatisatie bij de vleeskippen. Op langere termijn doen zich echter heel wat problemen voor. Zo is geweten dat een chronische blootstelling van hitte een negatieve invloed heeft op de vleeskwaliteit en de vetafzetting van slachtkuikens (Lu et al., 2007). In een andere recente studie werd aangetoond dat het percentage borstspier daalde door chronische hittestress. Ook het eiwitgehalte was lager en er was meer vetopslag (Zhang et al., 2012). Chronische hittestress zorgt op zijn beurt voor een opregulatie van avUCP. In vergelijking met acute stress zorgt het voor een verminderde oxidatieve capaciteit in de mitochondriën en het zorgt voor een verandering in antioxidantenwerking, omdat het dier zich kan aanpassen aan de chronische stress. Tevens zorgt deze chronische hittestress voor een uitputting in antioxidantenreserves, waardoor superoxides minder geneutraliseerd worden (Mujahid et al., 2006).

Hoe de kippen reageren op hittestress is sterk afhankelijk van de duur en de intensiteit van de hitte. Tijdens warmere perioden zijn de dieren in staat om fysiologische, immunologische en gedragsveranderingen te ondergaan. Wanneer de warmte voor langere tijd wordt aangehouden ondergaan de dieren acclimatisatie. Toch zijn er symptomen die kunnen aantonen dat het dier nog stress heeft. Dit heet men fysiologische stress. In de studie van Renaudeau et al. (2012) wordt een verminderde stofwisseling en veranderingen in het cardiovasculair systeem vastgesteld.

De algemene gevolgen van hittestress zijn een verminderde voederopname, verlaagde immuniteit, verstoring van de bloed pH (alkalose door overmatig hijgen), vermindering van de reproductiecapaciteit, veranderde activiteit van het neuro-endocrien systeem en verhoogde corticosterongehaltes. Ook verminderde werking van transcriptie, RNA processen, translatie en verschillende membraanstructuren en -functies komen voor (Lara & Rostagno, 2013; Renaudeau et al., 2012).

### 1.2.1 Interactie van hittestress in elektronentransportketen

Tijdens de oxidatieve fosforylering in de mitochondriën wordt via overdracht van elektronen doorheen verschillende complexen ATP verkregen. Elektronen worden doorgegeven van elektronendonor naar elektronenacceptor via redoxreacties. Door de transfer van elektronen worden protonen van de matrix van de mitochondriën naar de intermembraanruimte gebracht en ontstaat een protonengradiënt. De protonen gaan terug naar de matrix via het ATP-ase waardoor ADP omgezet wordt in het energierijke ATP.

Tijdens de overdracht van elektronen in de elektronentransportketen, kunnen elektronen ontsnappen bij de overdracht van het ene complex op het andere. Deze elektronen reageren met moleculair zuurstof, waardoor superoxide ontstaat. Bij overmatige productie kan dit resulteren in oxidatieve stress. Op het einde van de elektronentransportketen bevindt zich ook het avUCP. Dit aviair ontkoppelingseiwit doet dienst als transporteiwit. Protonen kunnen via avUCP van de intermembraanruimte naar de matrix worden gevoerd, waardoor de protonengradiënt daalt. De elektronentransportketen wordt zo ontkoppeld van de ATP productie, waardoor de energie vrijkomt als warmte in plaats van ATP. Bij acute hittestress wordt een significante daling van avUCP vastgesteld (Mujahid et al., 2006). avUCP speelt een rol bij thermogenese en het beschermen van mitochondria tegen schadelijke effecten van reactieve zuurstofspecies (ROS). Deze ontkoppelingseiwitten zorgen voor een daling van de ROS productie, zonder een zichtbare daling van superoxide dismutase activiteit (Criscuolo et al., 2005). Een neerregulatie van avUCP leidt dan tot een overproductie van ROS in hittestress situaties (Rolfe & Brand, 1997).

Naast de neerregulatie van avUCP veroorzaakt door acute hittestress, bestaat ook een opregulatie van avUCP die veroorzaakt wordt door chronische hittestress. Chronische stress verlaagt de oxidatie van nutriënten door feedback regulatie (Azad et al., 2010). Dit wil zeggen dat de avUCP-gehalten verhogen en deze zorgen dan voor ontkoppeling van de elektronentransportketen met ATP productie. Op deze manier kan acclimatisatie ontstaan (Raimbault et al., 2001).

### 1.2.2 Indicatoren hittestress

Door de aanhoudende hitte vertonen kippen verschillende gedragingen om de thermoregulatie en homeostase in evenwicht te houden. Zo zullen de dieren de warmteafvoer verhogen door vaatverwijding (Mutaf et al., 2009). Kippen zullen in hittestresscondities vaker hijgen, wat leidt tot een verhoogde CO2 afgifte en pH van het bloed (alkalose). De dieren gaan verder uit elkaar gaan zitten en spreiden hun veren. Ook de rectale temperatuur kan een indicatie geven voor een te warm klimaat. De rectale temperatuur bij thermoneutrale condities bedraagt ongeveer 41,4°C. Deze temperatuur kan stijgen tot 42,2°C en zelfs tot 42,6°C, zoals weergegeven in Figuur 2 (Chen et al., 2013). Echter, volgens Altan et al. (2003) bedraagt de normale rectale temperatuur ongeveer 40,2°C, terwijl hittestress gerelateerde rectale temperaturen rond de 41°C – 41,5°C bedragen. Vervolgens zijn ook erytrocyten gevoelig aan oxidatieve stress door de hoge poly-onverzadigde vetzuurgehalten in de membranen (Campo & Carnicer, 1994). Hittestress resulteert in een significante afname van de hematocrietwaarde van 34,57% naar 31,35% (Altan et al., 2003).



Figuur 2: Rectale temperatuur na aantal uren hittestress (Altan et al., 2003).

In de studie van (Sandercock et al., 2001) werd het effect op de pH van het vlees nagegaan bij kippen die hittestress hebben ondergaan. De pH werd gemeten direct na het slachten en nog eens na 24 uur bij 4°C. 24 uur later was de pH overal lager dan de pH direct na slachting. Bij hitte gestresseerde kippen kon er een snellere pH-daling gemeten worden. Dit was ook het geval in een studie van (McKee & Sams, 1997). De pH-daling verliep tot 24u na de slachting, waarbij het verschil met de controlegroepen het grootst was tussen 15 min en 2u na de slachting. Een daling in pH is het gevolg van de afbraak van glycogeen in melkzuur tijdens de postmortale glycolyse. Hierdoor zal melkzuur accumuleren in de spieren. Door de warme temperaturen van het vlees versnelt de eiwitdenaturatie, waardoor de kleur van het vlees beïnvloed wordt (McKee et al., 1997). Het is belangrijk het vlees zo snel mogelijk te verwerken en in de koelkast te bewaren. Bij vlees dat onderhevig is aan hittestress gebeurt er gemakkelijker denaturatie van sarcoplasmatische eiwitten. Dit zorgt voor een verhoogde lichtverstrooiing in de spieren, waardoor de helderheid, aangegeven door de L-waarden, verhoogt (Vanhoof, 1979). In de studie van McKee et al. (1997) werden de L-waarden opgedeeld in waarden <53 en waarden >53. Deze werden aangeduid met respectievelijk normale en abnormale resultaten. Hittestress zorgde vaak voor hogere L-waarden, waardoor deze vaak bij PSE-vlees geklasseerd werden.

Meervoudige onverzadigde vetzuren zijn heel gevoelig aan oxidatie. Vetzuurperoxidatie kan aangetoond worden via malondialdehyde (MDA). MDA is een organische verbinding die de mate van oxidatieve stress weergeeft. ROS reageren in de celmembranen met meervoudig onverzadigde vetzuren wat aanleiding geeft tot peroxidatieproducten, waaronder MDA. De mate van lipidenperoxidatie kan dus geschat worden door de hoeveelheid MDA (Bar-Or et al., 2015). In een studie van Altan et al. (2003) werd de MDA-waarde in het bloed bij ROSS kippen onder hittestress met 1.02 ± 0.11 nmol/mL verhoogd. Een MDA bepaling omvat een derivatisering met thiobarbituurzuur gevolgd door spectrofotometrische bepaling (Esterbauer & Zollner, 1989). De MDA assays hebben echter wel een lage specificiteit, waardoor het resultaat niet altijd gemakkelijk te interpreteren is. Het kan in vivo worden aangemaakt door bijvoorbeeld vetverbranding. In de praktijk wordt deze methode wel nog steeds gebruikt voor het meten van oxidatieve schade (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Ook glutathion (GSH) en de hoeveelheid geoxideerde vorm glutathiondislufide (GSSG) kunnen door middel van HPLC analyse achterhaald worden. De werking van GSH en de bijproducten komen later aan bod.

## 1.3 Relatie tussen oxidatieve stress en hittestress

### 1.3.1 Oxidatieve stress

Hoge temperaturen veroorzaken schadelijke effecten op de celstructuren. Dit heeft, naast flinke waardevermindering van transcriptie en translatie, RNA-processing en oxidatieve metabolisme, een verandering van structuur en functie van de celmembranen tot gevolg. Deze processen spelen zich af ter hoogte van het membraan van de mitochondriën, waardoor een mitochondriale dysfunctie aan de basis van oxidatieve stress ligt. De door hittestress geïnduceerde oxidatieve stress kan gedefinieerd worden als een verstoord evenwicht tussen oxidantia en antioxidanten waarbij oxidantia de bovenhand krijgen (Habibian et al., 2015). Alle levende cellen onder aerobe omstandigheden worden continu blootgesteld aan grote aantallen oxidanten afkomstig van endogene en exogene bronnen. Externe factoren zoals hittestress stimuleren de productie van vrije radicalen en ROS (Altan et al., 2003). Deze geoxideerde instabiele moleculen bezitten ongepaarde elektronen in het buitenste orbitaal die schade aan de weefsels kunnen aanbrengen. Oxidanten kunnen ook endogene signaalmoleculen zijn, die betrokken zijn bij apoptose en ontstekingen. Oxidatieve stress heeft dus niet altijd oxidatieve schade tot gevolg (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Elektronen in de elektronentransportketen in de mitochondriën die lekken ter hoogte van complex I en complex III, kunnen ervoor zorgen dat zuurstofmoleculen niet volledig gereduceerd worden tot water, maar aanleiding geven tot ROS. Cellen genereren tijdens hun normale metabolische functies kleine hoeveelheden ROS zoals het superoxide anion, waterstofperoxide, het hydroxylradicaal en ook reactieve stikstofspecies zoals stikstofoxide (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Wanneer deze ROS accumuleren, brengen ze schade toe aan lipiden, proteïnen, carbohydraten en DNA. Oxidatieve modificatie van DNA leidt tot een incorporatie van foute basen, mutaties en breuken in de DNA-strengen. Deze schade kan uiteindelijk leiden tot celdood (Poulsen, 2005). Lipiden, waaronder poly-onverzadigde vetzuren (PUFA’s) zijn uiterst vatbaar voor oxidatie. De peroxiden lokken een kettingreactie uit die verdere oxidatieve schade als gevolg heeft (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Oxidatieve stress wijzigt tevens het redoxevenwicht van verschillende cellulaire redoxkoppels. Zo wordt GSH geoxideerd tot GSSG. Er is reeds aangetoond dat externe factoren zoals een overmaat aan stof, NH3 en een te lage omgevingstemperatuur oxidatieve stress kunnen induceren. Een te hoge omgevingstemperatuur veroorzaakt een stijging van de lipidenperoxidatie (Altan et al., 2003).

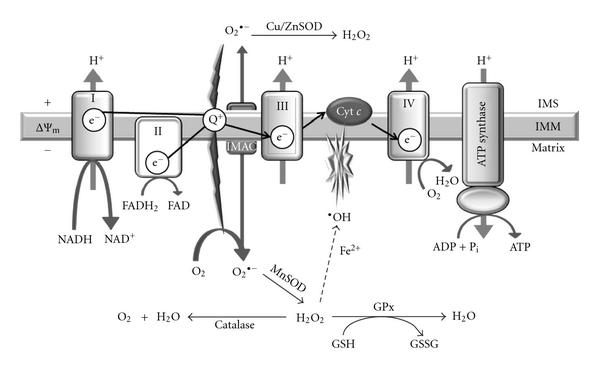
### 1.3.2 Defensiemechanismes van het lichaam tegen oxidatieve stress

Door de frequente blootstelling van oxidanten hebben aerobe organismen een aangepaste cellulaire afweer ontwikkeld. Cellen bezitten een antioxidanten defensiesysteem die de ROS kunnen neutraliseren (Halliwell & Whiteman, 2004). Het lichaam beschikt over twee antioxidantensystemen: enerzijds het enzymatische antioxidantensysteem die onder andere de enzymen superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GPx) en catalase (CAT) bevat en anderzijds het niet-enzymatisch defensiesysteem dat bestaat uit laag-moleculaire verbindingen zoals vitamine C, vitamine E en GSH (Halliwell & Whiteman, 2004). Deze laag-moleculaire verbindingen beschermen de cel en herstellen beschadigde cellen door de accumulatie van oxidatieve species te voorkomen. Deze antioxidanten kunnen elektronen vangen, waardoor de antioxidanten op hun beurt ook radicalen worden. Deze zijn echter veel stabieler, waardoor er geen kettingreacties en cellulaire schade optreden. Via energie afkomstig van NADPH worden de gereduceerde antioxidanten gerecycleerd (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Het lichaam beschikt nog over een ander verdedigingsmechanisme dat geoxideerde cellen opspoort en herstelt of verwijdert. DNA reparatie enzymen detecteren geoxideerde basen of verkeerde incorporaties die worden uitgesneden en door nieuwe onbeschadigde basen worden vervangen. Er bestaan ook enzymen die instaan voor de afbraak van niet-functionele of gemodificeerde eiwitten en lipiden. Wanneer de omvang van de oxidatieve schade echter groter is dan het reparatiemechanisme, dan rest er ten slotte nog één mechanisme: apoptose. Deze geprogrammeerde celdood staat onder controle van verschillende signaalwegen zoals oxidatieve stress (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

### 1.3.3 Relatie hittestress en mitochondriale dysfunctie

Cellulaire energie wordt verkregen door oxidatieve fosforylatie in de mitochondriën. Dit proces vereist de werking van vier complexen. Hierbij worden elektronen verstuurd van elektronendonor naar elektronenacceptor, waarbij zuurstof de laatste elektronenacceptor is. Dit zorgt ervoor dat zuurstofgas wordt gereduceerd tot water en bijgevolg een protonengradiënt wordt gecreëerd. Deze protonengradiënt zorgt uiteindelijk voor de aanmaak van ATP via het ATP-synthase. Doordat de elektronen passeren van donor naar acceptor, verliezen zij energie die gebruikt wordt voor de opbouw van de protonengradiënt. De membraanproteïnen sturen deze protonen naar de intermembraanruimte. De protonengradiënt drijft de ATP-synthase aan, waardoor ADP wordt omgezet naar de energierijke molecule ATP. Dit proces heet oxidatieve fosforylering, zoals weergegeven in Figuur 3 (Ma et al., 2012).



Figuur 3: Elektron lekkage tijdens elektronentransport (Ma et al., 2012).

Zo’n 1-2% tot 2-4% van de totale zuurstof wordt tijdens het elektronentransport niet gereduceerd tot water, maar wordt door cytochroom c oxidase (complex IV) gereduceerd tot superoxide (O2˙). Dit is te wijten aan de elektronen lekkage in complex I en III (Chen et al., 2003). Componenten zoals CuZnSOD die aanwezig zijn in de intermembraanruimte en MnSOD aanwezig in de matrix, zetten dit superoxide om in waterstofperoxide (H2O2). In aanwezigheid van ijzer- en koperionen wordt H2O2 omgezet in het schadelijke hydroxyderadicaal (OH˙). In tegenstelling tot O2˙ en OH˙ die in de matrix aanwezig blijven, bereikt H2O2 het cytosol. In het cytosol worden deze ROS gecontroleerd door antioxidanten. Hittestress zorgt voor een versnelde werking van de elektronentransportketen. Hierdoor is de kans op elektronenlekkage groter, waardoor meer ROS ontstaat.

### 1.3.4 Relatie hittestress en oxidatieve stress

Oxidatieve stress leidt in serum, plasma en weefsel tot een verhoogd gehalte aan lipiden peroxidatieproducten, waardoor dit als index voor oxidatieve stress kan gebruikt worden. Hoeveel lipidenperoxidatie aanwezig is in de cellen kan achterhaald worden met MDA. Acute en chronische hittestress vertonen geen gelijke stijging van het MDA-gehalte. Volgens (Wang et al., 2009) zorgt acute hittestress voor een viervoudige stijging van MDA, terwijl chronische hittestress slechts een stijging teweegbrengt van 1,5 maal. Ook het antioxidantensysteem toont verschillen in werking bij beide situaties. Acute stress verhoogt de activiteit van CAT, SOD en GPx waardoor de cellen worden beschermd tegen superoxide anionen. Bij chronische hittestress worden daarentegen tegenstrijdige resultaten bekomen. (Pamok et al., 2009) stelden een verhoging van GPx vast in de erytrocyten tot dag 11 van chronische hittestress, terwijl (Seven et al., 2009) een GPx daling interpreteerden in het bloed, de lever en het hart. Verschillen in antioxidantenenzym activiteiten zouden te wijten zijn aan diverse hittestresscondities, acute of chronische hittestress en de weefsels die worden aangetast. Acute hittestress resulteert in een neerregulatie van de avUCP synthese met een overproductie van ROS als gevolg. Chronische hittestress werkt daarentegen in de tegenovergestelde richting door een opregulatie van UCP met een daling in ROS. In een studie van Willemsen et al. (2011) werd aangetoond dat chronische hittestress een stijging van homocysteïne teweegbracht en een daling van foliumzuur en vitamine B12. Transmethylatie zorgt voor de omzetting van methionine in homocysteïne. Te grote hoeveelheden van homocysteïne kunnen leiden tot verschillende ziekten (Sahin et al., 2004; Willemsen et al., 2011). De verhoging van homocysteïne is te wijten aan de verhoogde omzetting van methionine tot cysteïne dat één van de drie aminozuren van het endogeen antioxidant GSH is. Willemsen et al. (2011) startten een studie met mannelijke ROSS vleeskippen in een vier weken hittestressmodel bij 32°C. Er werden verhoogde GSH waarden gevonden en verlaagde GSSG/GSH waarden. Ook in andere studies kon besloten worden dat chronische stress verhoogde waarden van GSH veroorzaakt (Michiels et al., 2014).

## 

## 1.4 Antioxidanten

### 1.4.1 Strategieën om hittestress geïnduceerde oxidatieve stress te verlagen

Er zijn drie strategieën beschreven om mitochondriale dysfunctie tegen te gaan. Ten eerste kan getracht worden om het membraanpotentiaal te verlagen. Ten tweede kan een efficiëntere elektronentransport bekomen worden. Ten derde kan een verhoogde ROS detoxificatie op punt gesteld worden.

Er bestaat een correlatie tussen het membraanpotentiaal en de ROS productie. De membraanpotentiaal (ΔΨ) toont het verschil in elektrisch potentiaal tussen de matrix en de intermembraanruimte die noodzakelijk is voor de ATP-synthese. Zo kan gesteld worden dat een verhoging van het membraanpotentiaal een verhoging van H2O2 teweegbrengt. Omgekeerd brengt een verlaging van het membraanpotentiaal lagere waarden van H2O2 met zich mee (Miwa & Brand, 2003). Een reductie van het membraanpotentiaal kan bekomen worden door milde ontkoppeling via avUCP. Dit mechanisme werkt als natuurlijk antioxidant. De substraten worden geoxideerd zonder productie van ATP, maar met productie van warmte. Dit mechanisme lijkt echter contra-productief, aangezien warmte kan leiden tot hyperthermie, wat één van de voornaamste problemen is bij kippen onder hittestress. Er is tevens geweten dat hittestress een verminderde voeder- en energieopname teweegbrengt en dus verhoogde ontkoppeling via verlaging van het membraampotentiaal via deze manier ook contra-productief zou moeten zijn. (Azad et al., 2013) vonden echter tegenstrijdige resultaten. In deze studie werd een verhoogde voederopname geconstateerd door de cashew nutshell liquid ontkoppelaar. Deze ontkoppelaar was wel niet in staat de hoeveelheid MDA in de spieren en het percentage H2O2 te doen dalen. Er kan dus niet met 100% zekerheid besloten worden dat selectieve ontkoppeling hittegestresseerde kippen van oxidatieve stress kan verhelpen. Verder onderzoek omtrent dit onderwerp is noodzakelijk.

Co-enzym Q of ubiquinon is een elektronen carrier in de elektronentransportketen en is tevens een olie oplosbare antioxidant in membranen en lipofiele matrices. Het speelt een cruciale rol als elektronencarrier van complex I en II naar complex III. Co-enzym Q doet dienst als cofactor in verschillende processen voor de productie van ATP, waardoor het een belangrijke antioxidant is. Het remt de lipiden- en proteïnenoxidatie en regenereert andere antioxidanten zoals vitamine E. Co-enzym Q wordt hoofdzakelijk aangemaakt in het lichaam, maar kan ook via het voeder worden opgenomen. Co-enzym Q toedienen via het dieet zorgt voor een dalende mortaliteit door een verbeterde elektronentransport en een hogere antioxidanten capaciteit bij vleeskippen (Geng et al., 2007). Co-enzym Q is nog niet getest in hittestresscondities.

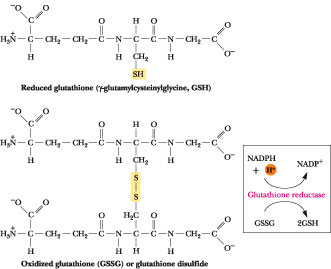
Een verbeterde ROS detoxificatie kan op diverse manieren worden verkregen. Zo kan ROS door antioxidanten geëlimineerd worden. Ook een opregulatie van antioxidant enzymen kan voor verbeterde detoxificatie van ROS zorgen. GSH is de belangrijkste endogene antioxidant als verdediging tegen ROS. L-cysteïne is het meest limiterende aminozuur voor de synthese van GSH. Het kan verkregen worden uit methionine. Een voeder met hogere toevoeging van methionine zal verminderde oxidatieve schade tot gevolg hebben (Del Vesco & Gasparino, 2013). Foliumzuur speelt een belangrijke rol in de remethylering van homocysteïne naar methionine, waardoor de toevoeging van dit bestanddeel aan het voeder verlaagde MDA-gehaltes veroorzaakt in de weefsels (Sahin et al., 2004). Veelal worden vitamine C en E als belangrijke antioxidanten toegevoegd aan respectievelijk het drinkwater en voeder in hittestress omstandigheden.

### 1.4.2 Glutathion als antioxidant

#### 1.4.2.1 Synthese en transport

Verschillende antioxidanten hebben een werking tegen ROS in het mitochondriaal systeem. Glutathion (γ-glutamyl-cysteïnyl-glycine; GSH) is een belangrijke endogene thiol antioxidant dat wordt aangemaakt uit drie verschillende aminozuren: glutamaat, cysteïne en glycine (Wu et al., 2004). Voor de synthese van GSH zijn twee cytosolische enzymen, γ-glutamylcysteïnesynthase en GSH-synthetase, noodzakelijk. Het eerst vernoemde enzym hecht glutamaat en cysteïne aan elkaar (Mazza, 2009). Het GSH-synthetase enzym katalyseert de volgende stap: γ-glutamylcysteïne en glycine vormen het tripeptide GSH. Het is belangrijk steeds voldoende precursoren in het voeder aanwezig te stellen om aan de behoefte voor GSH-synthese te voldoen. GSH wordt hoofdzakelijk aangemaakt in de lever en wordt van daaruit vervoerd via het plasma. GSH verlaat de lever ofwel intact ofwel als γ-Glu-Cys 2 na hydrolyse door γ-glutamyltranspeptidase dat plasmamembraan gebonden is. Hierdoor ontstaat een concentratiegradiënt dat heel nadelig is voor het transport. Deze γ-Glu-Cys 2 worden door extrahepatische cellen opgenomen en verder gesynthetiseerd tot GSH (Wu et al., 2004). Ook kunnen kleine hoeveelheden GSH via het dieet worden toegevoegd en via de darm worden geresorbeerd. Vanuit het plasma wordt GSH via een carrier mechanisme getransporteerd naar de nieren, longen en darmen waar het hoofdzakelijk verbruikt wordt. Aangezien GSH slechts in beperkte mate kan opgenomen worden door de cellen, wordt GSH extracellulair meestal afgebroken door γ-glutamyltranspeptidase. Daardoor kunnen afzonderlijke dipeptiden/aminozuren doorheen de cel worden geadsorbeerd (Wu et al., 2004; Garcia & Stipanuk, 1992). Dit enzym is vooral werkzaam in de organen waar veel GSH gebruikt wordt. ROS ontstaan in de mitochondriën en komen door lekkage terecht in het cytosol. Daarom is het interessant dat GSH zowel aanwezig is in de mitochondriën als het cytosol. Aangezien de mitochondriën dubbel omkapseld zijn en de adsorptie van GSH naar de mitochondriën daarom minder goed verloopt, wordt GSH eerst afgebroken tot γ-Glu-Cys 2, geadsorbeerd en daarna terug omgevormd tot GSH. GSH in het cytosol kan aanwezig zijn in een vrij zuur oplosbare gereduceerde vorm en een geoxideerde vorm (Figuur 4) (Fukagawa et al., 1996).

Naast de synthese pathway voor GSH zijn ook precursors voor GSH-synthese van uiterst belang. Cystine, methionine, N-acetyl-cysteïne en L-2-oxothiazolidine-4-carboxylaat zijn alternatieve precursors van cysteïne. Cysteïne is namelijk het meest beperkende aminozuur in de synthese van GSH en bepaalt dus mede de synthese van GSH (Wang et al., 1997). Cysteïne is echter een semi-essentieel aminozuur. Dit betekent dat het lichaam deze zelf kan aanmaken uit een essentieel aminozuur. Cysteïne kan hierbij aangemaakt worden uit het essentiële aminozuur methionine via de transsufuratie en transmethylatiepathway (Bauchart-Thevret et al., 2009). De beschikbaarheid van cysteïne in het lichaam is daarom vooral afhankelijk van de opname van methionine en cysteïne via het voeder.



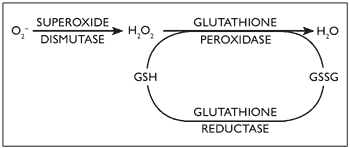
Figuur 4: Gereduceerde en geoxideerde vorm van glutathion (GSH en GSSG) (Fukagawa et al., 1996).

#### 1.4.2.2 Werking van glutathion, glutathion peroxidase en glutathion reductase

GSH wordt vervoerd naar verschillende weefsels, waar het in de cellen vrije radicalen reduceert, al dan niet via de katalyse door het seleniumhoudende enzyme glutahion peroxidase (GPx). De vrije thiolgroep kan namenlijk elektronen overdragen naar ROS, waardoor ze gereduceerd worden. Als gevolg van deze reductie-halfreactie vindt ook een oxidatie-halfreactiereactie plaats. GSH verliest namelijk één elektron en wordt dus zelf geoxideerd (Lei, 2002). Twee geoxideerde GSH moleculen vormen daarna een geoxideerde dimeer, zijnde glutathione disulfide (GSSG). Aangezien er bij de reductie van een vrij radicaal telkens ook een oxidatie plaatsvindt van GSH, spreken we strikt genomen over een redoxreactie. Hierbij beschouwen we GSH en GSSG als een redoxkoppel. Zo geeft de relatieve concentratie van deze twee stoffen ten opzichte van elkaar (GSSG/GSH verhouding) een inzicht over de oxidatieve status van het weefsel. Wanneer er relatief meer GSSG aanwezig is, ten opzichte van GSH, dan kan men stellen dat meer oxidatie heeft plaats gevonden (Jones, 2002) .

De hoofdrol van GSH is de mogelijkheid tot het teweegbrengen van oxidatie-reductiereacties. Het wordt aanzien als de grootste intracellulaire thiol-dislufide buffer (Schafer & Buettner, 2001). GSH creëert zijn bufferende werking via oxidatie en reductie ter vorming van GSSG en GSH. Het redoxpotentiaal ziet er als volgt uit: GSSG + 2H+ + 2e- -> 2GSH. De hoogste concentraties aan GSH zijn terug te vinden in het cytosol.

Hoewel GSH als dusdanig rechtreeks kan reageren met verschillende vrije radicalen, zal GSH vooral worden gebruikt bij het reduceren van peroxideverbindingen zoals waterstofperoxide of vetzuurperoxiden. Bij deze reacties doet GPx dienst als katalysater, waardoor op deze manier de reactiesnelheid sterk wordt verhoogd (Jurkovič et al., 2008). De reactie die GPx katalyseert, wordt hieronder weergegeven in Figuur 5. In deze reactie reduceert GPx een molecule waterstofperoxide in twee molecules water aan de hand van GSH als reductans. GPx is echter een seleniumhoudend enzym, en vereist met andere woorden selenium als cofactor voor een goede werking van het enzyme. Voldoende selenium moet dus worden opgenomen om in deze behoefte te voorzien (Rotruck et al., 1973). Zoals reeds meegegeven ontstaat uit deze reactie het geoxideerde dimeer GSSG. Cellen zijn echter in staat GSSG terug te regenereren tot GSH. Ook hier spreekt men terug over redoxreacties. In dit geval worden deze gekatalyseerd door het enzyme glutathion reductase (GSR). Bij de reductie van GSSG tot GSH wordt NADPH geoxideerd tot NADP+. De aanvoer van NADPH is afkomstig van de pentosefosfaatcyclus.



Figuur 5: Rol van glutathionperoxidase en glutathionreductase en de interactie met superoxide dismutase (Pinto et al., 2002).

GPx werd eerst ontdekt als een enzym aanwezig in erytrocyten die hemoglobine beschermde tegen oxidatieve stress. Later werd ontdekt dat GPx ook een mitochondriaal eiwit is dat de gevormde radicalen, die tijdens de elektronentranportketen worden gevormd, kunnen reduceren tot minder schadelijke producten. Zonder de bescherming door een antioxidant systeem zouden deze vrije radicalen bijvoorbeeld vetperoxiden induceren ter hoogte van de binnenste mitochondriale membraan.

Oxidatieve stress kan opgespoord worden door het meten van gereduceerde GSH. Bij de reductie van ROS wordt GSH namelijk omgezet tot GSSG. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat poly-onverzadigde vetzuren gemakkelijk oxidatieve stress kunnen induceren, waardoor de concentratie aan GSH daalt. Er is een verhoogde vetperoxidatie waargenomen in de weefsels en de uitstroom van GSSG uit de cellen is groter, waardoor de hoeveelheid GSH daalt. Via een GSSG/GSH analyse kan de mate van oxidatieve schade worden nagegaan (D'Aquino et al., 1991). GSSG/GSH is een belangrijk redoxkoppel die de antioxidante werking van cellen kan bepalen. De werking kan echter worden beïnvloed door andere redoxkoppels, zoals NADPH/NADP+. NADPH wordt namelijk verbruikt bij de reductie en regeneratie van GSSG tot GSH via het enzyme GSR. Verder zijn ook nog andere redoxkoppels in de cel aanwezig, zoals gereduceerde thioredoxine/geoxideerde thioredoxine, de mee de redoxpotentiaal van de omgeving bepalen (Jones, 2002).

## 1.5 Toevoegen van voederadditieven

In deze masterproef worden de additieven selenium-methionine (Se-Met) en N-acetyl-L-cysteïne (NAC) bestudeerd. Selenium wordt na adsorptie doorheen de darm ingebouwd in onder andere GPx. NAC is een precursor van cysteïne die wordt ingebouwd in GSH. In onderstaande paragrafen worden de functies en eigenschappen van Se-Met en NAC besproken.

### 1.5.1 Selenium-methionine

Bij de toevoeging van Se-Met aan het voeder wordt selenium (Se) ingebouwd in GPx. Het is de bedoeling om 0,20 mg Se per kg voeder toe te voegen via Se-Met, waardoor kan gesteld worden dat de hoeveelheid methionine die hiermee aangebracht wordt, ten opzichte van de synthetisch toegevoegde methionine aanwezig in het voeder, te verwaarlozen is. Deze synthetische methionine bedraagt 0,2 tot 0,5% in vleeskippenvoeders. Toevoeging van Se-Met heeft dus als bedoeling om de Se beschikbaarheid in het dier te verhogen.

#### 1.5.1.1 Seleniuminvloeden op oxidatieve stress

Se speelt een rol in verschillende metabolische processen en is een onderdeel van 25 Se-eiwitten die tal van enzymatische functies volbrengen (Zhou et al., 2013). Het Se-enzym, thioredoxine reductase, is verantwoordelijk voor de reductie van nucleotiden in DNA synthese en controleert de intracellulaire redoxtoestand (Naziroglu, 2009). Se dat wordt ingebouwd in GPx zorgt voor de reductie van H2O2 en schadelijke lipiden- en fosfolipiden hydroperoxiden tot ongevaarlijke producten (Ozgul & Naziroglu, 2012). Se beschermt de prostacycline productie en vermindert de verdere spreiding van oxidatieve schade van biomoleculen. Aangezien Se vaak onvoldoende aanwezig is in voeders, wordt het meestal als supplement toegevoegd. Er kunnen organische vormen zoals Se-Met en Se-gist, maar ook anorganische vormen zoals natriumseleniet en natriumselenaat worden toegediend (Choct et al., 2004). De chemische vorm van het element heeft een invloed op het adsorptiepercentage. Organisch toegediend Se wordt efficiënter geadsorbeerd dan de anorganische vormen. Zo wordt Se-Met voor 90% geadsorbeerd, terwijl seleniet slechts een adsorptiepercentage heeft van 60%. Se-Met wordt ook beter behouden in het lichaam dan seleniet en selenaat (Fairweather-Tait, 1997).

Bij een tekort aan Se neemt de enzymatische werking van Se-eiwitten af. Een tekort zorgt tevens voor een verminderde appetijt, waardoor een verlaagde voederopname en dus een tragere groei optreedt (Bunk & Combs, 1980; Turan et al., 1997). Se deficiënte ratten waren niet in staat hemoglobine tegen oxidatieve stress te beschermen. Door het tekort aan Se werd er nauwelijks GPx opgebouwd, waardoor radicalen zoals H2O2 minder werden afgebroken tot water (Rotruck et al., 1973).

Uit verschillende studies kan afgeleid worden dat Se een verbeterde immuniteit, groei, reproductie en een verhoogde resistentie tegen ziektes teweegbrengt. Desondanks bestaat hierover nog steeds discussie. Studies rond Se respons kunnen positief, maar ook een negatief resultaat bieden. Zo vond Yang (2012) dat de supplementatie van zowel organische als anorganische Se zich uit in een versnelde groei, betere vleeskwaliteit en een verbeterde antioxidantenstatus bij vleeskippen. De organische vorm zorgt voor een verhoging van 3.99% dagelijkse gewichtstoename en een daling van 4,84% voederconversie. Heindl et al. (2010) bewezen dat het lichaamsgewicht van 21 en 35 dagen oude kuikens sterker steeg bij Se additie onder de vorm van Sel-Plex SP, een Se-rijke gist. Ribeiro et al. (2008) testten natriumseleniet (0.3 mg/kg) en Se-Met (0.3 mg/kg) samen met vitamine E en C en organische zink. Ook hier werd een verbeterde voederconversie en hogere gewichtstoename vastgesteld. In een andere studie werd 0.4 mg/kg Se toegevoegd aan het voeder dat een verhoogde concentratie Se in het bloed en duodenale mucosa en een verhoogde activiteit van thioredoxine reductase en GPx tot gevolg had (Placha et al., 2014). Se beschermt dus de dunne darm tegen oxidatieve stress. Ook het pancreasweefsel werd beschermd en de verteerbaarheid van vetten en eiwitten werd verhoogd (Ribeiro et al., 2008). Daarnaast zijn verschillende studies bekend, waarbij geen significant verschil in lichaamsgewicht en voederconversie vast te stellen is na toevoeging van Se aan het voeder. Rao et al. (2013) testten verschillende gehalten van Se bij kippen in tropische omstandigheden. Zij stelden geen verschil vast in lichaamsgewicht en voederconversie. Ook bij combinatie van Se met vitamine E (125 mg/kg) bleek er geen verhoogde groei te zijn. Wel werd een verbeterde voederconversie geconstateerd (Habibian et al., 2014). Ook Chen et al. (2013) vonden geen significante verschillen in groei, slachtrendement, immunologische toestand, drip loss en vlees.

#### 1.5.1.2 Selenium als antioxidant

Een verhoging van temperatuur brengt oxidatieve stress met zich mee, waardoor een daling van antioxidanten wordt geïnduceerd. Hittestress wordt gerelateerd met een veranderd evenwicht in redoxpotentiaal die zich uit in verhoogde MDA gehalten in de spieren. Dit fenomeen kan door Se verminderd worden (Xu et al., 2014). Door toevoeging van Se supplementen worden de GPx gehalten verhoogd, waardoor de MDA-concentratie verlaagd wordt (Harsini et al., 2012). Na toevoeging van L-Se-methionine en D-Se-methionine wordt de Se-concentratie in het serum verhoogd en verbetert de antioxidanten capaciteit in de weefsels. Er wordt een verminderde drip loss en MDA vastgesteld (Wang et al., 2011). In een andere studie worden Se-chlorella (SCH) en natriumseleniet getest. Bij beide supplementen werd een verhoging van het lichaamsgewicht waargenomen en bij SCH werd tevens een verhoogde Se-concentratie waargenomen in de borstspieren, waardoor MDA vermindert. De activiteit van GPx in het vlees was significant (P>0.05) (Dlouha et al., 2008). Wanneer twee stoffen (0.3 mg/kg) werden getest, natriumseleniet en Se gist, werd de hoogste GPx activiteit gemeten bij natriumseleniet, terwijl Se gist en de combinatie van beide stoffen een verhoogde catalase activiteit, superoxide dismutase en antioxidanten capaciteit induceerden. Ook lipiden oxidatie was meer gedaald bij het gebruik van Se gist of de combinatie van beiden. Se als gistvorm is dus efficiënter in het verminderen van oxidatieve schade (Ahmad et al., 2012).

Ook thioredoxine reductase heeft een antioxidante werking. Se is een cofactor voor dit enzym en speelt daardoor een belangrijke rol bij het verwijderen van vrije radicalen (Sun et al., 1999). Naast het gebruik van Se in stoffen met antioxidante werking, zoals GPx en thioredoxine reductase, interageert Se ook met vitamine E, die een belangrijke functie uitoefent in het antioxidantendefensiesysteem (Khan et al., 2011). Vitamine E beschermt poly-onverzadigde vetzuren van oxidatie. Veel gebruik van vitamine E kan de nood aan Se sparen. Wanneer een tekort aan Se ontstaat, kan vitamine E worden verbruikt in het lichaam (Almeida et al., 2012).

#### 1.5.1.3 Immunocompetentie

Er bestaat een verband tussen hittestress en niet-specifieke immunoreactieve cellen. Zo zal een te hoge temperatuur zorgen voor verminderde antilichamenvorming en minder fagocytische macrofagen. Se heeft een positieve invloed op het immuunsysteem (Arthur et al., 2003). Bij een tekort verminderen het aantal macrofagen en wordt een reductie van CD4+T helper cellen verkregen. Hierdoor wordt een verminderde resistentie verkregen. Hittestress induceert een verminderde hoeveelheid van primaire en secundaire antilichamen, macrofagen en hoeveelheid lymfoïd weefsel. Kippen die Se als supplement toegediend kregen, hadden een verhoogde hoeveelheid aan immunoglobuline M (IgM) en immunoglobuline G (IgG) in hun lichaam (Niu et al., 2009). De celgemedieerde immuniteit stijgt lineair met de Se-concentratie in het voeder (Rao et al., 2013). Se verbetert het immunorespons door verhoogde cytokinine gehaltes. Vit E bevordert de efficiëntie van Se, waardoor een combinatie van deze twee stoffen een significante verbetering van het immuunrespons teweegbrengt (0.5 mg/kg Se en 125 mg/kg vit E). Door een verbeterde immuniteit ten gevolge van Se worden ook minder ziektes in het vlees aangetroffen (Silva et al., 2010).

#### 1.5.1.4 Overzichtstabel van beschreven effecten van Selenium.

Een aantal effecten van Se zijn door meerdere mensen reeds beschreven. Andere effecten worden door de ene auteur als positief ervaren, terwijl deze in andere studies negatieve resultaten geven.

Tabel 2: Overzichtstabel van beschreven effecten van Selenium

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Effect | Resultaat | | |
| Bestanddeel van GPx waardoor een reductie van H2O2 verkregen wordt. | Ja | (Ozgul & Naziroglu, 2012)  (Placha et al., 2014) | |
| Bestanddeel van thioredoxine reductase | Ja | (Naziroglu, 2009)  (Placha et al., 2014) | |
| Bestanddeel van verschillende enzymen | Ja | (Zhou et al., 2013) | |
| Beschermd prostacycline | Ja | (Choct et al., 2004) | |
| Verhoogd de immuniteit (IgM en IgG) en verhoogde weerstand | Ja | (Niu et al., 2009) | |
| Verbeterde groei | Ja (Yang, 2012) | | Neen (Rao et al., 2013) |
| Verbeterde vleeskwaliteit | Ja (Yang, 2012) | | Neen (Chen et al., 2013) |
| Voederconversie daalt | Ja (Yang, 2012) | | Neen (Rao et al., 2013) |
| Gewichtstoename | Ja (Yang, 2012)  (Heindl et al., 2010) | | Neen (Rao et al., 2013) |
| Verteerbaarheid van eiwitten en vetten stijgt | Ja | (Ribeiro et al., 2008) | |

### 1.5.2 N-acetyl-L-cysteïne

#### 1.5.2.1 Functie van N-acetyl-L-cysteïne

GSH wordt aangemaakt uit aminozuren glutamaat, cysteïne en glycine. GSH bevat een thiol of sulfhydrylgroep. Aangezien cysteïne een zwavelhoudend aminozuur is, draagt cysteïne bij tot deze groep. Hierdoor is cysteïne het meest cruciale van de drie bouwstenen. Bij voldoende cysteïne kan GSH snel worden aangemaakt (Mazza, 2009). GSH wordt niet of weinig rechtstreeks toegevoegd aan het voeder, aangezien het de cellen niet goed kan passeren. Het lichaam haalt cysteïne uit het eiwit van het voeder. Als alternatief kunnen de precursoren van GSH ook aan het voeder worden toegediend, zoals NAC. NAC wordt beschouwd als een stabiele vorm van cysteïne. Het is de α-amino groep van cysteïne die geacetyleerd is, waardoor er geen Maillard vernietiging kan ontstaan (Baker et al., 1984). Uit NAC kan cysteïne verkregen worden na het verwijderen van de acetylgroep via aminoacylase I (Dilger & Baker, 2007). Een andere reden voor het toevoegen van NAC is de vergrote stabiliteit en oplosbaarheid in vergelijking met cysteïne die weinig stabiel is. L-cysteïne is heel gevoelig aan oxidatie door zijn vrije thiolgroep en ook L-cystine is niet ideaal voor gebruik door zijn lage oplosbaarheid (Yang, 1970). NAC doet tevens dienst als directe antioxidant, zodat ROS worden uitgeschakeld. De reactiesnelheid is wel veel kleiner dan wanneer NAC gebruikt wordt voor de aanmaak van intracellulaire cysteïne en GSH (Ribeiro, 2011). NAC zorgt zo voor minder ziektes zoals kanker, diabetes, bloedvergiftiging en hartziekten (Ahola et al., 1999). Ten slotte is N-acetyl-L-cysteïne veel minder toxisch dan cysteïne. In een studie werden verschillende hoeveelheden van NAC toegediend, uitgedrukt in de hoeveelheid cysteïne. Een hoeveelheid van 20g NAC per kg voeder was onschadelijk voor de groei van de kippen, terwijl 30 g/kg en 40 g/kg NAC een reductie van de groei veroorzaakten van respectievelijk 13% en 34% (Dilger en Baker, 2007). Een overmaat aan cysteïne door toevoeging van NAC is minder schadelijk dan een overmaat aan cysteïne op zich (Dilger et al., 2007).

Cysteïne is belangrijk voor de aanmaak van GSH. Homeostase van GSH wordt beter bereikt door directe aanwezigheid van cysteïne in plaats van methionine, die nog omvormingsreacties moet ondergaan. GSH wordt aanzien als reservoir voor cysteïne. Bij een overmaat aan NAC en dus een overmaat aan cysteïne, wordt er een sparend effect verkregen van methionine. Deze methionine kan dan gebruikt worden voor de vorming van eiwitten (Ball et al., 1986).

#### 1.5.2.2 Overzichtstabel van beschreven effecten van NAC

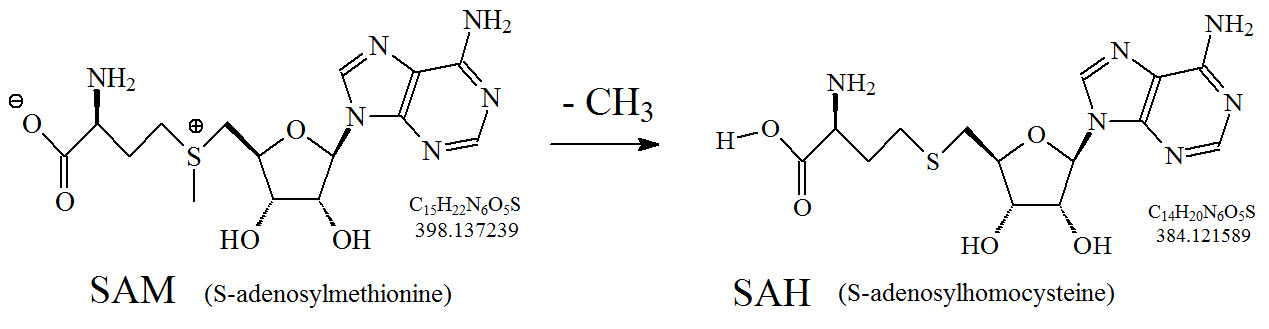
NAC heeft bij de mens reeds heel wat beschreven effecten. NAC kan ingezet worden tegen chronische bronchitis, longaandoeningen en kanker. Het wordt tevens gebruikt om epileptische aanvallen tegen te gaan, sportblessures aan te pakken, enzovoort (Faculty, 2009). Bij pluimvee is echter nog niet zoveel geweten over de effecten van NAC. Toch kunnen enkele basiskenmerken opgelijst worden (Tabel 3).

Tabel 3: beschreven effecten van NAC bij vleeskippen.

|  |  |
| --- | --- |
| Effecten van NAC | |
| Precursor van cysteïne voor GSH synthese | (Matera et al., 2016) |
| Slijmoplossend en anti-ontstekingsmiddel | (Matera et al., 2016) |
| Verbeterde eiwitaanmaak en groei | (Shoveller et al., 2006) |
| Vermindering van homocysteïne door verwijderering van de thiolgroep. | (Shoveller et al., 2006) |
| Voorkomt chronisch obstructieve longziekte veroorzaakt door oxidatieve stress. | (Matera et al., 2016) |
| Verhoogde cellulaire proliferatie noodzakelijk bij wondheling. | (Mao et al., 2016) |
| Verhoogde activiteit van mangaansuperoxidedismutase MnSOD. | (Mao et al., 2016) |
| Complexvorming van zware metalen via de thiolgroep. | (Samuni, 2013) |

#### 1.5.2.3 Transmethylatie en transsulfuratie reacties

Methionine is het uitgangsmateriaal voor tal van biochemische moleculen en speelt een belangrijke rol bij de uiteindelijke inbouw van cysteïne in GSH. In de eerste plaats wordt methionine als bouwsteen gebruikt in eiwitten. Daarnaast kan methionine nog andere (niet-eiwit) functies vervullen. De cyclus start met methionine die wordt omgezet door methionine adenosyltransferase ter vorming van S-adenosylmethionine (SAM) (Figuur 7 (1)). SAM is één van de belangrijkste cofactoren in het lichaam en wordt gevormd uit methionine en ATP (Mischoulon, 2002). SAM is de geactiveerde methyldonor die vereist is bij diverse methyleringsreacties. Belangrijk hierbij is het sulfonium ion (SR3) dat aanwezig is op SAM (Figuur 6). Hierbij draagt zwavel een positieve lading. Zo kan de aanwezige zwavel in SAM elektronen aantrekken vanuit het dichtstbijzijnde koolstofatoom, waardoor S-adenosylhomocysteïne (SAH) ontstaat en de methylgroep CH3 wordt afgesplitst. De methylgroep is noodzakelijk in vele metabolische reacties, zoals bij methylering van DNA of omzetting van guanidinoacetaat tot creatine. (Mato et al., 2002; Mazza, 2009).

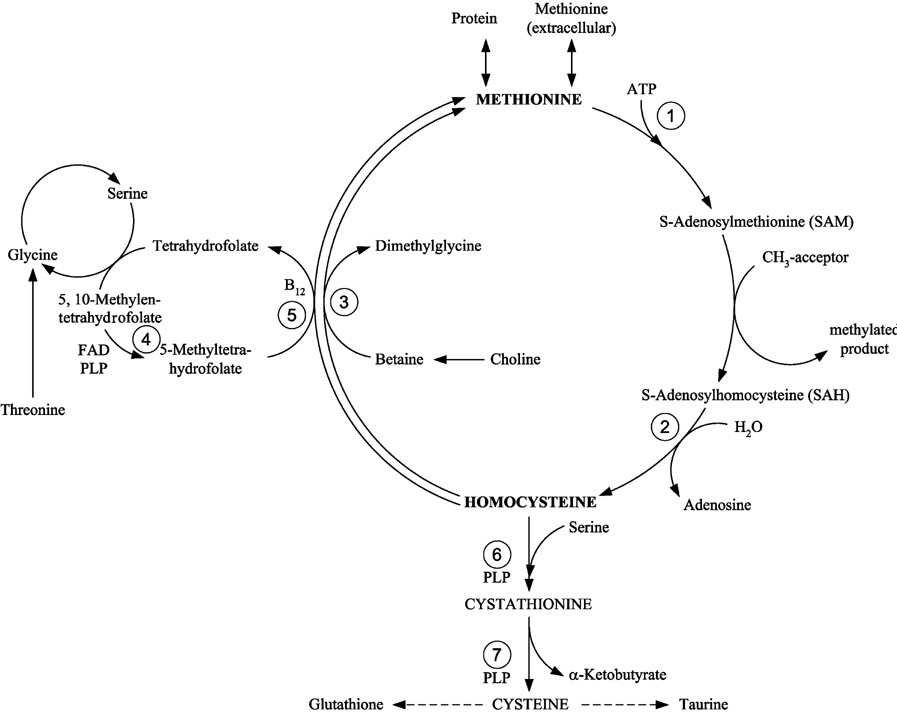


Figuur 6: Omzetting van SAM in SAH via afsplitsing van CH3 (Linse, 2013).

Nadat SAM zijn methylgroep afgeeft ter vorming van SAH, wordt homocysteïne gevormd na verwijdering van adenosine door SAH-hydrolase (Figuur 7 (2)). Homocysteïne kan op drie verschillende manieren worden omgezet. Homocysteïne kan omgevormd worden naar cysteïne via transsulfuratie waarbij vitamine B6 een belangrijke katalysator is (Ulrey et al., 2005). Transsulfuratie brengt de sulfur groep, aanwezig in homocysteïne, over op het serine residu ter vorming van cystathionine (Figuur 7 (6)). Deze reactie is irreversibel (Mazza, 2009). Daarnaast kan homocysteïne gerecycleerd worden naar methionine door de toevoeging van een methylgroep. Deze methylgroep kan op twee verschillende manieren worden toegevoegd. Het kan enerzijds afkomstig zijn van gemethyleerd foliumzuur (=methyltetrahydrofolaat) waarbij methionine synthase de overdracht van de methylgroep bewerkstelligt (Figuur 7 (4)). Anderzijds zorgt betaïne voor de additie van een methylgroep aan homocysteïne (Figuur 7 (3)) (Davis & Uthus, 2003). De omzetting van methionine naar homocysteïne is dus wel reversibel (Mazza, 2009). Uiteindelijk wordt cystathionine nog gesplitst in cysteïne en α-ketobutyraat o.i.v. cystathionine-γ-lyase (Figuur 7 (7)) (Ulrey et al., 2005). De volledige methionine cyclus is weergegeven in Figuur 7.

Cysteïne kan ten slotte worden omgevormd naar taurine of kan bijdragen in de synthese van GSH. Taurine is een belangrijke membraan stabilisator, calcium flux regulator en modulator bij diverse immuunfuncties. De hoeveelheid aanwezige methionine en serine zijn heel belangrijk bij de synthese van cysteïne. Bij onvoldoende aanwezigheid van deze aminozuren is het noodzakelijk deze toe te voegen via het voeder of precursors van cysteïne te voorzien, zoals NAC. Een teveel aan homocysteïne kan atherosclerose bevorderen en schade berokkenen aan de endotheelcellen (Werstuck, 2001). Het is dus belangrijk om correcte hoeveelheden S-aminozuren en nuttige cofactoren toe te voegen aan het voeder.

In een studie werd tevens aangetoond dat een tekort aan Se een verminderde homocysteïne methyltransferase door betaïne teweegbrengt en een verhoging van plasma GSH-concentraties veroorzaakt. Een Se tekort verhoogt dus als het ware de transsulfuratieweg van homocysteïne in cysteïne, waardoor verhoogde GSH-waarden een feit zijn (Davis & Uthus, 2003).

**

Figuur 7: Methionine cyclus (Best).

#### 1.5.2.4 Ideale behoeften van methionine en cysteïne

Sedert enkele jaren wordt het concept van ‘ideaal eiwit’ meer en meer gebruikt. Ook in pluimvee kan het ideaal eiwit bepaald worden als correcte behoefte van aminozuren (AZ). Het AZ lysine wordt als referentieaminozuur aangesteld en de andere AZ worden tegenover dit AZ beoordeeld (Baker, 2009). De ileale AZ ratio’s zijn gemeten in het ileum (‘darmverteerbare aminozuren’), waardoor rekening wordt gehouden met vertering en absorptie van de AZ in de maag en de dunne darm. AZ bij vleeskippen zijn belangrijk voor verschillende lichaamsfuncties en veergroei. Er is steeds een behoefte nodig voor basisonderhoud dat gecombineerd wordt met de behoefte voor groei per kg toenemend levend gewicht (Baker, 2009). Vandaar dat het ideale aminozuurprofiel verschilt per leeftijd. De leeftijd kan opgedeeld worden in drie perioden (starter, grower, finisher). Vleeskippen van het mannelijk geslacht hebben hogere voedereisen en daardoor moet het gehalte aan lysine stijgen (Mack, 1999). Om een maximale voederconversie te behalen, zijn voldoende hoeveelheden methionine en lysine vereist. Het ideale eiwitconcept wordt gebruikt bij het samenstellen van het rantsoen. Verschillende bronnen geven de aminozuurbehoeften weer in een andere eenheid. Zo spreken ROSS 308 en CVB van de schijnbare verteerbare AZ, terwijl Fefana werkt met de werkelijke verteerbare AZ. Het NRC geeft de totale hoeveelheden in het voeder weer. In Tabel 4 worden de ideale behoeftenormen weergegeven tegenover lysine.

Tabel 4: Aminozuurbehoeften bij vleeskippen in de verschillende fasen.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Ross 308 (2014) \*** | | | **Fefana publication (2014) \*\*** | | | **CVB (1998) \*\*\*** | | | **NRC (1994) \*\*\*\*** | | |
| **requirements** | apparent digestable amino acids | | | true ileal digestable amino acids | | | apparent digestable amino acids | | | contents in diet | | |
| **phase** | STARTER | GROWER | FINISHER | STARTER | GROWER | FINISHER | STARTER | GROWER | FINISHER | STARTER | GROWER | FINISHER |
| **days** | 0-10 | 11-24 | 25-39 |  |  |  |  |  |  | 0-21 | 0-21 | 21-39 |
| **ME (kcal/kg)** | 3000 | 3100 | 3200 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **CP (g/kg)** | 23 | 21,5 | 19,5 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **dLYS (g/kg)** | 1,28 | 1,15 | 1,02 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ***LYS %*** | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* | *100* |
| ***M+C %*** | *74* | *76* | *78* | *73* | *75* | *77* | *73* | *73* | *73* | *82* | *82* | *72* |
| ***THR %*** | *67* | *67* | *67* | *65* | *67* | *68* | *65* | *65* | *65* | *73* | *73* | *74* |
| ***VAL %*** | *75* | *76* | *76* | *79* | *80* | *81* | *80* | *80* | *80* | *82* | *82* | *82* |
| ***ARG %*** | *107* | *107* | *107* | *103* | *105* | *107* | *105* | *105* | *105* | *114* | *114* | *110* |
| ***ILE %*** | *67* | *68* | *69* | *67* | *67* | *67* | *66* | *66* | *66* | *73* | *73* | *73* |
| ***GLY+SER %*** |  |  |  |  |  |  |  |  |  | *114* | *114* | *114* |
| ***% M in M+C*** | *54* | *54* | *54* | *53,4* | *54,7* | *55,8* | *52,1* | *52,1* | *52,1* | *55,6* | *55,6* | *52,8* |
| ***TRY %*** | *16* | *16* | *16* | *16* | *17* | *17* | *16* | *16* | *16* | *18* | *18* | *18* |
| ***LEU %*** | *110* | *110* | *110* | *105* | *105* | *105* |  |  |  | *109* | *109* | *109* |

\*Aviagen (2014)  
\*\*Dalibard et al. (2014)  
\*\*\*Centraal Veevoeder Bureau, Nederland (1998)  
\*\*\*\*Nutrient Research Council, VS (1994)

Het is belangrijk de juiste hoeveelheden AZ toe te voegen. Een teveel aan AZ kan leiden tot toxische effecten. Zo zal een overmatige inname van methionine de meest schadelijke effecten vertonen en zorgt het tevens voor een snelle groeivermindering (Baker, 2006). Bij een teveel aan methionine zal ook de productie van homocysteïne vergroten en kunnen problemen zoals homocysteinemia en cardiovasculaire ziekten zich voordoen (Toue et al., 2006; Ueland & Refsum, 1989). De schadelijkheid van een teveel aan methionine kan ook te wijten zijn aan de labiele methylgroep op methionine (Harper et al., 1970). Toevoeging van serine kan zo de toxiciteit van methionine verminderen, doordat methionine minder beschikbaar wordt voor oxidatie (Harper et al., 1970). Bij een tekort aan methionine zal meer homocysteïne geremethyleerd worden en wordt er minder cysteïne gevormd. (Finkelstein & Martin, 1984). Ook overmatige inname van cysteïne kan leiden tot toxische effecten. Deze zijn echter veel moeilijker te achterhalen, aangezien cysteïne sterk afhankelijk is van de hoeveelheid methionine. Een teveel kan leiden tot verminderde voederopname, gewichtstoename, weefselschade en mortaliteit (Dilger et al., 2007; Klavins, 1963). Correcte hoeveelheden cysteïne zorgen voor een verminderde methionine benutting en een verhoogde GSH productie (Ball et al., 2006).

De behoeft aan zwavelhoudende AZ wordt steeds als één geheel aanzien, daar er een link bestaat tussen methionine en cysteïne. Methionine kan via SAM worden omgezet in homocysteïne, waaruit cysteïne ontstaat na transulfuratie. De omzetting van methionine in cysteïne gebeurt op molaire basis met 100% efficiëntie (Baker, 2006). Bij een overmaat aan methionine wordt logischerwijs meer cysteïne geproduceerd. Echter, bij een tekort aan methionine wordt dit AZ volledig gebruikt voor eiwitvorming. Als er naast een tekort aan methionine ook een tekort aan cysteïne aanwezig is, dan wordt 50% van methionine gebruikt voor eiwitaanzet en 50% wordt toegekend aan de vorming van cysteïne. Bij een tekort van beide AZ zal er dus geen groeirespons waarneembaar zijn (Baker, 2006). Om na te gaan hoeveel de behoefte bedraagt aan AZ in het voeder worden proeven uitgevoerd. De hoeveelheid methionine nodig voor het lichaam kan bepaald worden als er een overmaat aan cysteïne aanwezig is. Zo wordt er geen methionine omgezet in cysteïne en is methionine volledig ter beschikking voor eiwitvorming. De hoeveelheid benodigde cysteïne kan worden bepaald als methionine minimaal aanwezig is. Dit wil zeggen dat er geen omzetting gebeurt van methionine in cysteïne en de cysteïne voorziening volledig afhangt van toevoer via het voeder (Ball et al., 2006; Baker, 2009). Het sparende effect van cysteïne op methionine kan nagegaan worden door cysteïne gradueel toe te voegen aan het voeder bij voldoende aanwezig methionine. Dit gehalte aan methionine is afhankelijk van MORM (minimum obligatory requirement for methionine). MORM bepaalt de hoeveelheid methionine die nodig is bij een overmaat aan cysteïne. Door de toevoeging van cysteïne wordt het deel dat anders door methionine wordt omgezet nu ook gebruikt voor de eiwitaanzet, waardoor een verbeterde groei waargenomen kan worden. Ook kunnen bij stijgende dosissen methionine in het rantsoen verhoogde groeicijfers waargenomen worden (Ball et al., 2006).

Om te achterhalen hoeveel AZ effectief aan het voeder moeten worden toegevoegd, moet men rekening houden met de verteringsefficiëntie. Methionine is het efficiëntst verteerbare AZ. Cysteïne is het slechtst verteerbare AZ (Mazza, 2009). Ook kan een deel van de AZ verloren gaan door hydrolyse. Aangezien methionine en cysteïne nauw verwant zijn, is het belangrijk beide AZ in voldoende mate aanwezig te stellen in het voeder. Een tekort aan één van de twee AZ leidt tot een deficiëntie van zwavelaminozuren (Mazza, 2009).

# Hoofdstuk 2

# Materialen en methode

## 2.1 Inleiding

In warme zomermaanden kan hittestress bij vleeskippen een groot probleem vormen. Aangezien hittestress ook oxidatieve stress kan induceren, moet er op zoek gegaan worden naar antioxidant factoren die de stresswaarden naar beneden kunnen halen. De aandacht ging in deze proef naar additieven die toegevoegd kunnen worden in het voeder. Se-methionine (Se-Met), van het bedrijf Orffa, en N-actetyl-L-cysteïne (NAC) werden getest in een 2x4 factoriële proef. Se-Met is een organische bron van Se en is een belangrijke cofactor in verschillende enzymes, waaronder het enzym GPx. NAC is een stabiele vorm van cysteïne en doet dienst als precursor voor GSH. Het effect van deze stoffen wordt vervolgens opgevolgd in het borstvlees, de lever en het hart. Staalname gebeurt in acuut stressstadium (dag 2 van hittestress) en in chronisch stadium (dag 14 van hittestress) op respectievelijk dag 29 en dag 41 leeftijd. Indien de proef naar wens verloopt en de resultaten positief zijn, kunnen deze additieven toegevoegd worden aan de voeders. Hierdoor kan verminderde oxidatieve schade als gevolg worden opgemerkt.

## 2.2 Dierproef

De proef bestaat uit acht behandelingen. Het experiment werd opgevat als een 2 x 4 factoriële proef. Hierbij is de eerste factor het al dan niet toedienen van Se-Met, waarbij dosissen van 0 en 0,2 mg Se-Met / kg voeder werden vergeleken. Se-Met werd hierbij reeds vanaf d0 toegediend en werd dus al dan niet toegevoegd in drie verschillende voederfases. Het toedienen van Se-Met gebeurde steeds bovenop de reeds aanwezige hoeveelheid Se in het voeder. Zowel de de grondstoffen als de anorganische Se-bron (natriumseleniet) uit de mineralenpremix brengen Se in het voeder aan. De tweede factor bestond uit het toedienen van 4 verschillende dosissen NAC vanaf dag 25. Dit additief werd rechtstreeks in het voeder gemengd, zodat dosissen van 0, 500, 1000 en 2000 mg NAC / kg voeder werden bekomen . In Tabel 5 is weergegeven hoe de verschillende studiefactoren over de acht verschillende behandelingen werden verdeeld (T1 –T8). De acht behandelingen werden at random over de 34 hokken verdeeld. Elk hok bevatte telkens 20 kippen bij de start van het experiment. Behandelingen T1 en T2 werden vijf keer herhaald, terwijl de overige behandelingen in viervoud werden uitgevoerd omwille van het totaal aantal hokken in de stal. Het aantal hokherhalingen per behandeling wordt ook weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5: Se-Met en NAC volgens de verschillende behandelingen

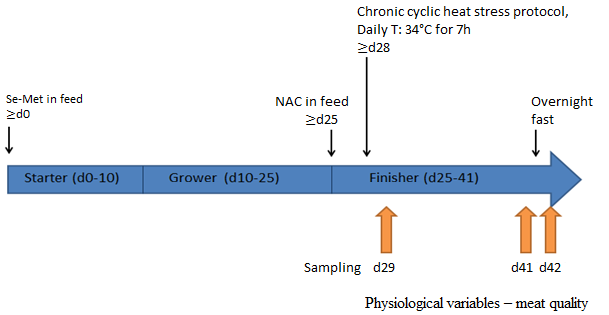
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| Se-Met (≥d0; mg Se/kg) |  |  |  |  | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| NAC (≥d 25; mg/kg) |  | 500 | 1000 | 2000 |  | 500 | 1000 | 2000 |
| Aantal hokherhalingen (n) | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

De 680 kuikens waren afkomstig uit de broeierij Vervaeke-Belavi uit Tielt. Het waren allemaal haantjes van het type ROSS 308 met een startersgewicht tussen de 40g en 48g. De ééndagskuikens werden overgebracht naar de proeflocatie te Melle. De dieren werden gecontroleerd op misvormingen en vervolgens willekeurig verdeeld over 34 hokken met een densiteit van 14,7 kippen per m². De kuikens werden zo verdeeld zodat het gemiddelde lichaamsgewicht van de kuikens per hok niet meer dan ±0,3g van het totaal gemiddeld lichaamsgewicht van de kuikens afweek.

Bij de start van de proef werd er gebruik gemaakt van infrarood lampen gedurende de eerste vijf dagen. Er werd een temperatuur aangehouden van 34°C van d0 tot en met d3. Daarna daalde de temperatuur lineair omlaag tot 22°C op dag 28. Vanaf dag 28 werd het hittestressmodel opgezet waarbij de volgende 15 dagen een temperatuur van 34°C gedurende 7 uur per dag werd aangehouden. Tussen 8u en 9u ’s morgens werd de temperatuur verhoogd van 22°C naar 34°C en dit gedurende 7 uur. Op de dagen van staalname werd de temperatuur reeds om 6u ’s morgens verhoogd. De vleeskippen moesten zeker 3 uur hittestress hebben ondergaan voor het slachten. De RV werd tussen de 55% en 65% gehouden. Indien de vochtigheid te laag werd, werd water gesproeid op de muren en verwarmingsinstallatie. De lichtintensiteit bedroeg 23L:1D en 16L:8D, respectievelijk tijdens d 0-7 en d 8-41. De kuikens werden de eerste dag gevaccineerd tegen Newcastle Disease (NDC2) en infectieuze bronchitis (IBMAS). Op dag 17 werd de inenting tegen NDC2 herhaald en een vaccinatie tegen Nobilis ND clone 30 werd tevens uitgevoerd.

De dieren werden dagelijks verzorgd door de dierenverzorgers ter plaatse. Elke dag werd het voeder gecontroleerd en de waterstanden werden bijgehouden. De dieren werden geobserveerd via camerabeelden en een datalogger werd geplaatst om temperatuur en RV op te volgen. Naast de vaccinaties werd geen andere medicatie in het voeder of drinkwater toegevoegd.

De slachting van twee dieren per hok werd gepland op dag 29 om de effecten van acute hittestress te meten. Op het einde van de proef, dag 41, werden opnieuw twee kippen per hok geslacht en dit keer om de effecten van chronische hittestressfactoren te bepalen. Van deze dieren werd de rectale temperatuur gemeten juist voor het slachten in de verwarmde stal. Na een nacht vasten werden uiteindelijk op dag 42 nogmaals 34 kippen geslacht om kleurfactoren en pH van het borstvlees te bepalen. Ook vetoxidatie op het borstvlees werd bepaald via het bepalen van thiobarbituur reactieve species (TBARS). De slachting gebeurde door het kelen van de dieren na euthanasie via een intramusculaire injectie met xylasine en pentobarbital. Een overzicht van de staalnames is weergegeven in Figuur 8.



Figuur 8: Proefoverzicht met starter-, groei- en eindfase.

## 2.3 Voeders

Er werd een commercieel basisvoeder als grofmeel aangekocht dat coccidiostatica bevatte en voldoet aan de behoeften van vleeskuikens. De proefdieren kregen een experimenteel voeder, waar supplementen Se-Met en NAC werden aan toegevoegd. Eerst werd een voormix aangemaakt van het basisvoeder met de supplementen, waarna de voormix werd toegevoegd aan de rest van het basisvoeder.

Zoals eerder vermeld, zijn er drie voederfases gedurende de studie. Aan het starter- en groeivoeder werd enkel voor T5, T6, T7 en T8 0,2 mg/kg Se via Se-Met toegevoegd. Pas in de eindfase werden in behandelingen T2, T3, T4 respectievelijk 500, 1000, 2000 mg/kg NAC toegevoegd. Behandelingen T6, T7 en T8 kregen op hun beurt ook respectievelijk 500, 1000 en 2000 mg/kg NAC, dit gecombineerd met de reeds aanwezige 0,2 mg/kg extra Se via Se-Met. T5 kreeg enkel 0,2 mg/kg Se via Se-Met, zonder de toevoeging van NAC. T1 kreeg het basisvoeder zonder enige supplementen en dient bijgevolg als controle.

Voeder en water werden steeds *ad libitum* toegediend tot dag 41. Op dag 41 werden de vleeskippen ’s nachts uitgevast. Er werden voedermonsters genomen van alle voederfases en behandelingen om de samenstelling van het voeder te controleren. Gedurende de eerste 10 dagen na aankomst kregen de kuikens een startervoeder, waarvan de voedersamenstelling weergegeven wordt in Tabel 6. Tijdens de tweede periode (d10-25) werd een groeivoeder verstrekt, waarvan de grondstoffen eveneens worden opgesomd in Tabel 6. Als laatste werd ook een eindvoeder toegediend vanaf dag 25 (Tabel 6). Bij overgang van de soorten voeder werden de dieren steeds per hok gezamenlijk gewogen (d0, 10, 25 en 41). De berekende nutriëntensamenstelling zijn weergegeven in het tweede deel van Tabel 6. De grondstoffen op zich kunnen onvoldoende AZ aanbrengen, waardoor er nog extra AZ aan het voeder worden gevoegd. Voor verteerbaar methionine (VMp) bijvoorbeeld wordt bij elke fase nog een extra hoeveelheid toegevoegd.

Tabel 6: Grondstoffen en berekende samenstelling voor starter-, groei- en eindvoeder.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | STARTER  d0-10 | GROWER  d10-25 | FINISHER  d25-41 |
| Ingredient composition (%) |  |  |  |
| Wheat | 44,93 | 47,09 | 54,33 |
| Soybean meal 48 | 27,15 | 23,31 | 21,90 |
| Corn | 15,00 | 15,00 | 9,00 |
| Soybeans | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Animal fat | 3,70 | 5,88 | 6,30 |
| Soybean oil |  |  | 0,500 |
| Premix\* | 0,600 | 0,600 | 0,600 |
| Bi-CaPhosphate | 1,69 | 1,33 | 1,01 |
| Limestone | 0,580 | 0,603 | 0,494 |
| Dl-methionine | 0,303 | 0,274 | 0,207 |
| L-lysine HCL | 0,314 | 0,285 | 0,194 |
| L-threonine | 0,143 | 0,116 | 0,070 |
| L-valine | 0,119 | 0,098 | 0,036 |
| NaCl | 0,200 | 0,200 | 0,200 |
| NaBicarbonate | 0,229 | 0,193 | 0,154 |
| NSP enzyme | 0,020 | 0,020 | 0,020 |
| Phytase | 0,020 | 0,020 | 0,020 |
| Coccidiostaticum | salinomycine | salinomycine | diclazuril |
| SUM | 100,000 | 100,000 | 100,000 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Calculated composition (%) |  |  |  |
| DM | 88,32 | 89,54 | 89,58 |
| CP\_(excl\_NH3) | 21,50 | 20,00 | 19,50 |
| Cfat | 6,50 | 8,58 | 9,17 |
| ME broiler (OEslk; MJ/kg) | 11,51 | 12,25 | 12,50 |
| VLYSp | 1,15 | 1,05 | 0,950 |
| VM+Cp | 0,834 | 0,767 | 0,694 |
| VTHRp | 0,748 | 0,683 | 0,618 |
| VMp | 0,549 | 0,507 | 0,434 |
| VCp | 0,285 | 0,260 | 0,260 |
| VVALp | 0,909 | 0,840 | 0,760 |
| VARGp | 1,18 | 1,08 | 1,04 |
| VILEp | 0,745 | 0,685 | 0,667 |
| VTRYp | 0,233 | 0,216 | 0,213 |
| Ca | 0,870 | 0,800 | 0,680 |
| oP | 0,400 | 0,350 | 0,300 |
| Ca/oP | 2,18 | 2,29 | 2,27 |
| Na | 0,150 | 0,140 | 0,130 |
| K | 0,933 | 0,858 | 0,833 |
| Cl | 0,231 | 0,243 | 0,206 |
| EB (Na+K-Cl) | 240 | 218 | 212 |

\*Premix: bevat per kg voeder: vitamin A, 9000 IU; vitamin D3, 1800 IU; vitamin E (α-tocopherol acetate), 30 mg; vitamin K3, 1,5 mg; thiamin, 1,2 mg; riboflavin, 3,0; niacin, 27,0 mg; pyridoxine, 2,4 mg; cyanocobalamine, 1,2 µg; folic acid, 0,60 mg; biotin, 0,12 mg; choline, 360 mg; Fe (FeSO4.H2O), 30 mg; Cu (CuSO4.5H2O), 12 mg; Zn (ZnO), 36 mg; Mn (MnO), 58; I (Ca(IO3)2), 0.72 mg; Co (Co2CO3(OH)2), 0,58 mg; Se (Na2O3Se), 0,22 mg en ethoxyquin, 0,20 mg.

Voor deze masterproef werd 0,2 mg/kg Se aan het voeder toegevoegd onder de vorm van Se-Met. In de premix zit per kg voeder 0,22 mg anorganische Se onder de vorm van natriumseleniet. Ook in de grondstoffen zelf is een bepaald gehalte aan Se terug te vinden. Naast Se-Met wordt ook NAC toegevoegd. AZ worden steeds vergeleken met het basisaminozuur: darm verteerbaar lysine. Door toevoeging van NAC wordt het darm verteerbaar cysteïne (VCp) telkens verhoogd. Hierbij wordt wel verondersteld dat NAC volledig verteerd wordt, waardoor cysteïne voor 100% beschikbaar wordt (equimolair met de hoeveelheid NAC in het voeder). Door de hogere VCp-waarden verschijnen natuurlijk ook hogere darm verteerbaar methionine + cysteïne (VM+Cp) waarden. Er wordt geen extra methionine toegevoegd, waardoor VMp constant blijft. Deze cijfers worden vergeleken met het darm verteerbaar lysine (VLysp). Volgens ROSS 308 guidelines 2014 zou de behoefte aan VM+Cp/VLysp = 0,780 zijn, terwijl deze volgens het CVB 0,730 zouden bedragen. De berekende waarden aan AZ worden weergegeven in Tabel 7. De waarden bekomen door het toepassen van de dosissen 0, 500, 1000 en 2000 mg/kg NAC zijn dus respectievelijk 0,731; 0,769; 0,808 en 0,885. Dit betekent dat van minimaal tot ruim boven de behoefte aan S-houdende aminozuren wordt gevoederd.

Tabel 7: De berekende waarden van aminozuren in het voeder in de afmestfase

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
| Alle fasen (≥d0), Se-Met in voeder (mg Se/kg) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Eindfase (≥d25), NAC in voeder (mg/kg) | 0 | 500 | 1000 | 2000 | 0 | 500 | 1000 | 2000 |
| Berekend voor eindfase, % :  VLYSp  VMp  VCp  VM+Cp  VM+Cp/VLYSp  VMp/VM+Cp | 0,950  0,434  0,260  0,694  0,731  62,60 | 0,950  0,434  0,297  0,731  0,769  59,40 | 0,950  0,434  0,333  0,767  0,808  56,60 | 0,950  0,434  0,407  0,841  0,885  51,60 | 0,950  0,434  0,260  0,694  0,731  62,60 | 0,950  0,434  0,297  0,731  0,769  59,40 | 0,950  0,434  0,333  0,767  0,808  56,60 | 0,950  0,434  0,407  0,841  0,885  51,60 |
| Aantal hokherhalingen | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

## 2.4 Litter score

Op d27, d31, d36 en d41 werd de strooiselkwaliteit bepaald in de verschillende hokken. Dit is een subjectieve methode waarbij men rekening houdt met de beschrijvingen weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8: Beoordeling van strooiselkwaliteit

|  |  |
| --- | --- |
| Score | Beschrijving |
| 0 | Volledig rul en droog strooisel, licht van kleur, nog geen plaatvorming. |
| 1 | Rul en droog strooisel, licht van kleur, aan drink- en/of voederbak begint het strooisel dicht te slaan. |
| 2 | Relatief droog strooisel, rul maar donkerder van kleur, plaatvorming rond drink- en voederbak. |
| 3 | Vochtig strooisel, donder van kleur, van het strooisel kan een bal gemaakt worden, ter hoogte van drink- en voederbak is het strooisel volledig dichtgeslagen met vorming van ruggen. |
| 4 | Nat strooisel, bijna volledig dichtgeslagen, ter hoogte van drink- en voederbak zakt laars weg. |

## 2.5 Staalnameprocedure

De kuikens werden gewogen op d0, d10, d25 en d41. De gemiddelde groei (ADG, g/d) werd berekend voor de starterperiode (d0-d10), groeiperiode (d10-d25) en afmestperiode (d25-d41). De voederopname en voederconversie werden berekend voor dezelfde periodes. Bij elke slachting werd ook de rectale temperatuur bepaald van de kippen in hittestresstoestand. Daarvan worden enkel de kippen die reeds drie uur in verhoogde temperatuur doorbrachten meegeteld voor de analyses.

De kippen (twee per hok) werden geslacht op dag 29 en dag 41 door decaputatie na euthanasie door intramusculaire injectie van pentobarbital en xylasine. Tijdens het kelen werd bloed verzameld van de halsslagader en in een heparinebuisje met BPDS (bathofenanthroline disulfonzuur) gebracht. Er werd ook een buisje gevuld waarin EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur) als antistollingsagens was aangebracht. Het ongestold heparinebloed werd gecentrifugeerd (3000 G, 15min), waardoor de rode bloedcellen zich scheidden van het plasma. Hieruit kon de hematocrietwaarde afgeleid worden. Deze rode bloedcellen werden bewaard in epjes van 2 mL bij -80°C. Het EDTA-buisje werd gecentrifugeerd om het plasma te verzamelen voor MDA-bepaling. Deze epjes werden bewaard bij -20°C.

Na het leegbloeden van de dieren werd het karkas van de organen gescheiden. De dunne darm werd ontrold en ter hoogte van 50% van de totale lengte van de darm (jejunum) werd een darmsegment van 5cm uitgenomen en na grondig spoelen met saline (0,9%) bewaard in formol. Dit wordt later gebruikt om coupes van te maken en villilengte en cryptendiepte te meten. De lever werd in drie stukken gescheiden, waarvan het grootste (derde) stuk gebruikt werd voor analyse van de GSSG/GSH redox status. Het hart werd verwijderd en aan de onderzijde van de hartkamers werd een weefselstaal genomen en tevens in proefbuizen gebracht voor GSSG/GSH analyse. Vervolgens werd een gedeelte van het onderste borstvlees op dezelfde manier versneden en in proefbuizen gebracht voor GSSG/GSH bepaling. Deze proefbuizen werden bewaard bij -80°C in afwachting van verdere analyses.

Na dag 41 werden de overige kippen uitgevast. Op dag 42 werd één kip met een gemiddeld lichaamsgewicht per hok genomen en geëuthanaseerd voor staalname. Na het ontvellen van de borstspier werd de pH van de borstspier gemeten. Daarna werden de ingewanden verwijderd en werd het karkas gewogen. Dit karkas werd bewaard in het donker bij 4°C. Exact na 24 uur werd de pH van de karkassen opnieuw gemeten en werd ook de kleur bepaald. Eén submonster werd nog genomen voor Se-analyse dat bewaard werd bij -20°C en geleverd werd aan het Ecochem (Fac. Bio-ingenieurswetenschappen, UGent). De rest van het borstvlees werd bewaard bij -20°C om later oxidatieve stabiliteit te bepaling via de TBARS-methode.

## 2.6 Analyses

### 2.6.1 Fysiologische parameters van oxidatieve stress

#### 2.6.1.1 GSSG/GSH bepaling via HPLC

Bij het bemonsteren van de kippen werden weefselstalen genomen van het borstvlees, de lever en het hart. Deze weefselstalen werden onmiddellijk na staalname overgebracht in 2 mL epjes en ondergedompeld in vloeibare stikstof. Stalen werden daarna bij een temperatuur van -80°C bewaard om oxidatie te vermijden. Voorafgaand aan de analyse van GSH en GSSG in deze stalen zijn echter verschillende stappen noodzakelijk. De analysemethode houdt een staalvoorbereiding en een derivatisatieprocedure in. Bij de staalvoorbereiding werden de bewaarde stalen ontdooid en gehomogeniseerd. Hierbij werd 0,5 g weefsel afgewogen en toegevoegd aan 5 mL van een 10% perchloor azijnzuuroplossing (PCA10%). Deze oplossing werd aangemaakt door 0,535192 g BPDS in 1 L milli Q water te brengen. PCA 10% werd dan verkregen door 100 mL PCA bij 900 mL BPDS-oplossing te voegen. Het weefsel werd vervolgens gehomogeniseerd door middel van de ultra turrax (700 tpm, 1 min). De plastieken buisjes met de oplossing werden vervolgens gecentrifugeerd aan 10 000 G voor 15 min bij 4°C. 0,5 mL van het verkregen supernatans werd bij 50 µL interne standaard gebracht. Dit werd in het dubbel bereid. Deze interne standaard (γ-glutamyl glutamaat, 15 mmol/L) werd aangemaakt door 20,72 mg bij 5 mL PCA 0,3% te voegen. Deze stalen werden bewaard bij -80°C in afwachting van de derivatisatie en verdere analyse.

Voor de derivatisatie werd gebruik gemaakt van joodazijnzuur. Deze stof bindt aan de vrije thiol-groepen ter vorming van carboxymethylderivaten. Aan het zuurextract werd 50 µL joodazijnzuur toegevoegd. Deze stof heeft een felrode kleur. Na het toevoegen van dit zuur aan het zuurextract werd een roze kleur bekomen. Hierna werd de pH van het reactiemengsel verhoogd en gebufferd door het toevoegen van 0,48 mL KOH (2 mol/L) – KHCO3 (2,4 mol/L). Hierdoor werd de kleur van het reactiemengsel omgezet in een paarse kleur (pH 8-9). Deze oplossing werd geïncubeerd in het donker op kamertemperatuur voor 10 min. Daarna werd 0,8 mL 2,4-dinitrofluorobenzeen (1% v/v in ethanol) toegevoegd. Deze stof bindt zich aan de amine groep in aminozuren, welke in de vorming van dinitrofenyl-aminozuren resulteert.

Na de staalvoorbereiding en de derivatisatie kan het staal in het HPLC-apparaat worden ingebracht ter analyse. Er werd een volume van 100 µL geïnjecteerd. Het debiet van de solventpomp werd ingesteld op 1,5 mL/min. Het extract wordt gescheiden op een 3-aminopropyl kolom door middel van HPLC techniek. In de mobiele fase werd methanol (80/20 v/v in milli Q water) gebruikt om de overtollige 2,4-dinitrofluorobeneen en de derivaten van neutrale en basische AZ uit te wassen. Azijnzuur werd toegevoegd aan de mobiele fase om de gebonden AZ in geprotoneerde vorm te houden. Door stijging van de natriumacetaat concentratie in de mobiele fase worden de zuurderivaten gescheiden. Deze zuurderivaten worden vervolgens gedetecteerd bij 365 nm. De gehanteerde methode kan tevens terug gevonden worden in studies van Farris & Reed (1987) en Yoshida (1996).

#### 2.6.1.2 MDA

MDA of malondialdehyde is een secundair oxidatieproduct dat gevormd wordt tijdens oxidatie van meervoudige onverzadigde vetzuren en wordt daarom als indicator gebruikt. MDA werd bepaald op plasma EDTA, waarbij EDTA dienst doet als anticoagulantia. Het plasma werd gederivatiseerd met thiobarbituurzuur, waardoor een gekleurd complex ontstaat. Dit complex kan spectrofotometrisch bepaald worden bij 532 nm (Nielsen et al., 1997).

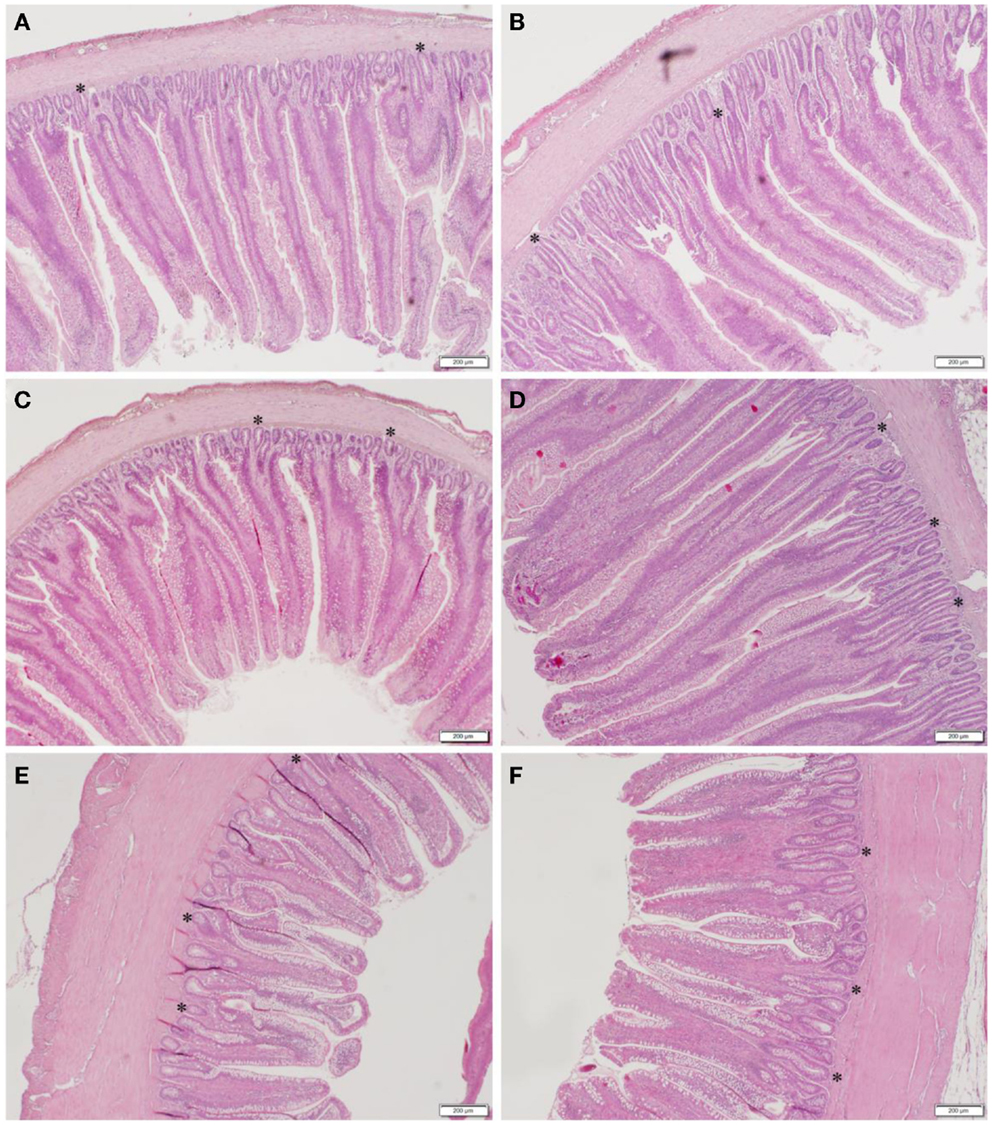
200 µL NaOH (1,5M) werd aan 300 µL plasma gevoegd. NaOH zorgt ervoor dat alle MDA die gebonden zit, vrij komt. De oplossing werd gevortext en daarna voor 30 minuten in een warmwaterbad van 60°C gebracht. Nadien werden 500 µL H3PO4 (6%) en 500 µL TBA (0,8%) toegevoegd. 1 molecule MDA bindt aan 2 moleculen TBA. Na de oplossing te vortexen, werd het in een warmwaterbad van 90°C gezet gedurende 45 minuten, waardoor er verkleuring optreedt. Deze oplossing werd verder geëxtraheerd met 200 µL SDS (sodium dodecyl sulphate (10%)) en 2 mL n-butanol. SDS is noodzakelijk om de eiwitten in oplossing te brengen (Gudiksen et al., 2006). Butanol werd toegediend om het complex te extraheren (Gabai et al., 2004). Na het vortexen werd de oplossing gecentrifugeerd aan 2700 t.p.m. gedurende 10 min. De MDA-concentratie werd dan bepaald door het eiwitvrije supernatans in cuvetten te brengen en de absorbantie te bepalen bij 532 nm in een spectrofotometer.

De resultaten werden vergeleken met een stockoplossing vervaardigd uit 1,1,3,3-tetramethoxypropaan (TMP). Aangezien TMP in zuur milieu kan worden omgezet in MDA, kunnen standaardoplossingen worden aangemaakt met een gekende concentratie aan MDA.

Om de resultaten te berekenen van MDA werd een ijklijn opgesteld met de standaarden. De absorbantiewaarde en concentratie aan MDA door toevoeging van TMP waren gekend. Deze waarden werden uitgezet in een grafiek, waarna een ijklijn kon worden opgesteld.

#### 2.6.1.3 Histomorfologie van de dunne darm

Om het effect van hittestress en de daarmee gepaarde oxidatieve stress te bepalen op de darmgezondheid werden cryptendiepte en villuslengte gemeten. Stukjes darm van het jejunum werden tijdens de staalname in formol (37% formaldehyde in water) gebracht. De deeltjes van het jejunum worden als het ware gefixeerd door de chemische stof. Formaldehyde bindt aan de eiwitten in de darm en zorgt voor denaturatie van de proteïnen door dehydratatie. De enzymen werden gedeactiveerd, bacteriën werden gedood en er kan geen verdere degradatie van het weefsel meer optreden. De stalen zijn verhard. Na de fixatie werden de stalen ingebed in paraffine. Aangezien paraffine niet oplosbaar is in water of alcohol, werden de stalen eerst ontwaterd. Het water in de weefsels wordt tijdens dit proces vervangen door xyleen. Dit werd bereikt door het weefsel telkens in een bad met toenemende alcoholpercentage (ethanol) te plaatsen. Daarna werd de ethanol vervangen door xyleen. Na het ontwateren werden de stukjes ingebed in warme paraffine. Na koeling werden harde paraffineblokjes verkregen en werden deze versneden met de microtoom. De dunne secties werden dan op een microscoopplaatje gelegd om te kleuren. Aangezien kleurvloeistoffen enkel oplosbaar zijn in water, werden de staaltjes terug gehydrateerd. Dit houdt in dat dezelfde stappen werden gevolgd net als bij de dehydratatie, maar nu in omgekeerde volgorde. Na het kleuren met een eosineoplossing werden de coupes terug gedehydrateerd. Vervolgens werden ze op een microscoopglaasje gelegd met een fixeermiddel dat opgelost is in xyleen. Na het toevoegen van het dekglaasje droogt het fixeermiddel op door middel van de xyleen. De coupes zijn klaar voor gebruik. Een voorbeeld van een coupe wordt weergegeven in Figuur 9. Via een microscoop uitgerust met een camera en computer met geschikte software werden cryptendiepten en villuslengten gemeten.



Figuur 9: villi en crypten van jejunum bij vleeskippen (Juxing Chen, 2015).

### 2.6.2 Bepaling van parameters op vlees

#### 2.6.2.1 TBARS-analyse

Door vetoxidatie ontstaan primaire en secundaire oxidatieproducten. Malonaldehyde is een secundair oxidatieproduct dat in zuur milieu reageert met 2-thiobarbituurzuur (TBA) tot een gekleurd complex dat via spectrofotometrie kan bepaald worden bij 532 nm. Twee moleculen TBA reageren met 1 molecule malonaldehyde.

Vóór de analyse werden de kippenvleesstalen eerst lichtjes ontdooid. Daarna werden ze versneden en gemalen en werd 10 g gemalen vlees in een petriplaat gelegd. Na toevoeging van 1,5% zoutoplossing werden de petriplaten 7 dagen bij 4°C bewaard onder gestandaardiseerd licht (1200 lux). De eigenlijke analyse gebeurt door destillatie. Het één week oude vleesstaal werd gemalen en met een BHT-oplossing (2.6-di-tertiair-butyl-4-methylfenol in ethanol) in de destillatiebuis gebracht. BHT zorgt voor een verbetering van de stabiliteit van het vlees (Templar et al., 1999). Na de toevoeging van 4M HCl en antischuim werd het geheel gedestilleerd. HCl voorkomt de vorming van aggregaten. De bekomen destillaties werden vergeleken met de destillatie van standaarden. 1,2,3,5 en 8 mL destillatie stock oplossing komt overeen met respectievelijk 4,37; 8,74; 13,12; 21,86 en 34,98 nmol/5mL. Deze waarden werden bekomen door het destillaat eerst 35 minuten te laten koken, vervolgens af te koelen en de absorbantie te meten bij 532 nm.

De resultaten van de TBARS-analyse werden berekend via de standaarden. Bij elke standaardoplossing hoort een reeds bekende concentratie van het gevormde gekleurde complex. Met deze gegevens werd een ijklijn opgesteld. Via deze ijklijn werden de resultaten van de overige oplossingen bepaald. De resultaten werden met de factor 0,144 vermendigvuldigd om zo het tbars-getal te bepalen.

#### 2.6.2.2 Kleur- en pH meting van het borstvlees

Om na te gaan welke pH-invloeden hittestress teweegbrengt, werd de pH direct na de slachting gemeten in het rechterborstgedeelte. 24 uur daarna werd de pH opnieuw gemeten op dezelfde plaats. Het vlees werd, tussen de pH-metingen in, bewaard bij 4°C. Het kippenvlees werd tevens afgedekt en in het donker geplaatst, zodat het licht geen kleurinvloeden kon veroorzaken.

Via de bekende Lab-waarden werd de kleur van het borstvlees nagegaan 24u na de slachting. De oppervlaktekleur van het vlees is heel onstabiel bij blootstelling aan lucht en licht. Bij blootstelling aan lucht zal het pigment myoglobine, die aanwezig is in vers vlees, omgevormd worden naar oxymyoglobine. Als vlees blootgesteld wordt aan licht wordt de myoglobine en oxymyoglobine omgezet naar metmyoglobine door reactie met zuurstof (USDA, 2011).

Metmyoglobine is een identificatie voor de kleur van vleeswaren. Het is belangrijk dat de kleur telkens gemeten wordt in het centrum van de dorsale oppervlakte, daar waar het vlees nog geen kleurveranderingen heeft ondergaan. Het vlees werd dus opengesneden en aan de binnenkant van de borst werd de kleurbepaling gemeten op twee centimeter dik vlees. Met een spectrocolorimeter werd de lichtreflectie bepaald en uitgedrukt op basis van kleurwaarden (Demeyer, 1998). De kleurwaarden kunnen als volgt weergegeven worden:

L-waarde: helderheid (L= 0%; zwart, L = 100%; licht)  
a-waarde : aandeel rood-groen (a = 1; rood, a = -1; groen)  
b-waarde: aandeel geel-blauw (b = 1; geel, b = -1; blauw)

## 2.7 Statistische analyse

### 2.7.1 Zoötechnische parameters

Statistische analyses werden uitgevoerd met SPSS Statistics 23. De gegevens werden gescreend op outliers met behulp van boxplots. Vervolgens werden de variabelen getest op normaliteit aan de hand van de Kolmogorov-Smirnov test. De testen werden uitgevoerd op 5% significantieniveau.

Voor de zoötechnische factoren werd de invloed van Se-Met tijdens starter- en groeifase voor lichaamsgewicht (BW), gemiddelde gewichtstoename (ADG), gemiddelde voederopname (ADFI) en voederconversie (FC) geanalyseerd. Aangezien er twee groepen aanwezig zijn (0 en 0,20 mg Se/kg) en deze onafhankelijk zijn van elkaar, werd er gebruikt gemaakt van de Independent Sample t-test. Voor twee onafhankelijke steekproeven werd hetzelfde kenmerk opgemeten. De hypothesen van een Independent Sample t-test zijn H0: µ1 = µ2 en H1: µ1 ≠ µ2. Vanaf de eindfase werden Se-Met-invloeden en NAC-invloeden nagegaan. Aangezien deze twee variabelen ook interacties kunnen ondergaan, werd gekozen voor het General lineair model, waarbij gegevens zoals BW, ADG, ADFI en FC de ‘dependent’ variabelen zijn en Se-Met en NAC de ‘fixed’ factors worden. Om de gelijkheid van varianties te toetsen, werd bij ‘options’ de interactieterm en de afzonderlijke termen aangeduid. Er werd tevens gekozen om met Bonferroni als post-hoc test te werken. Wanneer er geen interactie kon waargenomen worden tussen Se-Met en NAC, werd deze achterwege gelaten en werd er enkel gekeken naar de afzonderlijke hoofdtermen.

### 2.7.2 Andere parameters

Bij alle andere bepalingen (crypten en villi, hematocrietwaarden, pH, kleur, MDA, GSSG/GSH,…) werden eerst outliers verwijderd. De normaliteit werd ook hier getest met de Kolmogorov-Smirnov test. Nadien werd de General lineair model methode uitgevoerd, aangezien beide variabelen (Se-Met en NAC) telkens aanwezig waren.

# Hoofdstuk 3

# Resultaten

## 3.1 Resultaten voederanalyses

De Weende componenten van het voeder: droge stof (DS), ruw as (Ras), ruw eiwit (RE) en ruw vet (RV) werden getest. De DS-gehalten liggen tussen de 88,8 % en 90,1 %. Volgens de voedersamenstelling zit er 88,32 % DS in de starterfase, 89,54% in de groeifase en 89,58% in de eindfase. Er kan dus besloten worden dat de DS-gehalten uit de analyse (Tabel 9) gelijklopend zijn met de berekende waarden uit de voedersamenstelling (Tabel 6). De RE-gehalten uit de berekende voedersamenstelling komen niet volledig overeen met deze uit Tabel 9. In de groeifase werd er een RE-gehalte verwacht van 20% en in de eindfase was een eiwitgehalte van 19,5% verwacht. Het geanalyseerd voeder heeft dus veel kleinere waarden aan RE dan verwacht. De RV-gehalten daarentegen komen wel overeen met de verwachtingen uit Tabel 6.

Bij de behandelingen T5, T6, T7 en T8 werden steeds 0,20 mg/kg Se onder de vorm van Se-Met toegevoegd. Behandeling T5 heeft normaal 0,2 mg/kg meer Se aanwezig dan behandeling T1. Uit Tabel 9 kan afgeleid worden dat er tijdens de starterperiode slechts een verschil van 0,046 mg/kg Se aanwezig was tussen T1 en T5. In de groeifase is een verschil van 0,265 mg/kg Se terug te vinden, terwijl in de afmestfase een verschil van 0,184 mg/kg Se wordt aangetroffen tussen de verschillende behandelingen. De resultaten van de analyse zijn weergegeven in Tabel 9.

Se werd telkens toegevoegd onder de vorm van Se-Met, waardoor de Se beter toegankelijker werd voor het lichaam. De verhoogde waarden aan methionine zijn niet te wijten aan de toevoeging van Se-Met. Er kan geen verklaring gevonden worden voor de hogere cijfers aan methionine bij de T5 behandeling. Uit Tabel 6 van de grondstoffen is wel af te leiden dat de methioninebehoefte lichtjes daalt bij overgang van de starter- naar groeifase en van groei- naar de afmestfase. Dit verband is hier wel waar te nemen.

Naast Se-Met wordt ook NAC toegevoegd aan het voeder. We veronderstellen dat NAC volledig verteerd wordt en dus kan gebruikt worden onder de vorm van cysteïne. Behandelingen T1 en T5 hebben gelijke waarden aan cysteïne aangezien aan deze behandelingen geen NAC werd toegevoegd. Er zit dus ongeveer 0,30 % cysteïne in de grondstoffen. NAC kan niet geanalyseerd worden via courante aminozuur bepaling en heeft geen effect op het geanalyseerde cysteïne gehalte.

Tabel 9: Parameters methionine-, cysteïne- en seleniumgehalten, droge stof (DS), ruw eiwit (RE) en ruw vet (RV) aanwezig in het voeder tijdens starter-, groei- en eindfase voor behandeling T1 en T5 (T1 = zonder Se-Met; T5 = 0,20 mg/kg Se-Met).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Voeder | Parameter | | | | | |
|  | Met % | Cys % | Se mg/kg | DS | RE | RV |
| Starter T1 | 0,61 | 0,34 | 0,475 | 89,7 | 21,7 | 6,2 |
| Starter T5 | 0,82 | 0,34 | 0,521 | 89,6 | 21,8 | 6,7 |
| Groei T1 | 0,57 | 0,30 | 0,384 | 88,8 | 18,6 | 8,4 |
| Groei T5 | 0,70 | 0,32 | 0,649 | 90,1 | 17,6 | 8,1 |
| Eind T1 | 0,51 | 0,31 | 0,450 | 89,8 | 17,4 | 9,0 |
| Eind T5 | 0,54 | 0,32 | 0,634 | 89,8 | 17,7 | 9,0 |

## 3.2 Zoötechnische prestaties

De statistische resultaten worden weergegeven in Tabel 10. Tijdens de starterfase werd enkel Se-Met toegevoegd aan de behandelingen T5, T6, T7 en T8. Wanneer de hypothese wordt gevolgd van H0: µ1=µ2 en H1: µ1 ≠ µ2 kan een significant verschil waargenomen worden in BW op dag 10 en ADG tijdens de starterperiode. Als de hypothese omgevormd wordt tot H0: µ1=µ2 en H1: µ1 < µ2, dan moeten de P-waarden gedeeld worden door twee en wordt een significant verschil verkregen voor BW op dag 10, ADG, ADFI en FG. Op basis van het 5% significantieniveau wordt H0 verworpen en kan met 95% zekerheid besloten worden dat er een significante interactie bestaat.

In de groeiperiode zijn de P-waarden echter heel wat hoger, waardoor er geen significant verschil meer is tussen de verschillende behandelingswijzen. De resultaten voor BW, ADG, ADFI en FC liggen dicht bij elkaar of zijn gelijk.

Vanaf de eindfase kregen enkele groepen Se-Met en NAC ter beschikking. Alle P-waarden voor Se-Met zijn hoger dan 0,05, waardoor geen significante verschillen verkregen worden. Dit is een normaal gevolg op de groeifase. Voor NAC daarentegen zijn positieve waarden terug te vinden voor ADFI en FC. Als de voederopname significant verschilt, zal uiteraard de FC ook significant verschillen. De FC daalt zelfs van 2,2 naar 1,8. Voor ADG is er een tendens waar te nemen voor NAC. De gemiddelde dagelijkse groei wordt bevorderd door de stijgende hoeveelheid NAC. Daaruit volgt ook de tendens van BW (P=0,060).

Er kunnen geen interacties waargenomen worden tussen Se-Met en NAC. Enkel voor de FC in de eindfase ontstaat een lichte tendens.

Tabel 10: Resultaten van zoötechnische prestaties voor lichaamsgewicht (BW), dagelijkse groei (ADG), dagelijkse voederopname (ADFI), voederconversie (FC) en mortaliteit voor de periode d0-d10, d10-d25 en d25-d41.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Se-Met | | NAC | | | | Significantie | | | | |
|  | 0 | 0,20 | 0 | 500 | 1000 | 2000 | Se-Met | NAC | | | Se-Met x NAC |
| 0-10 |  |  |  |  |  |  |  |  | | |  |
| BW 0  BW 10  ADG  ADFI  FC | 46,1  269,3a  22,3a  27,1  1,22 | 46,3  277,8b  23,1b  27,7  1,19 |  |  |  |  | 0,191  0,011  0,012  0,077  0,062 | | |  |  |
| 10-25 |  |  |  |  |  |  |  | | |  |  |
| BW 25  ADG  ADFI  FC | 1275  67,1  98,8  1,47 | 1278  66,7  98,5  1,47 |  |  |  |  | 0,809  0,599  0,832  0,970 | | |  |  |
| 25-41 |  |  |  |  |  |  |  | | |  |  |
| BW 41  ADG  ADFI  FC  Mort% | 2775  93,4  183,6  1,970  2,2 | 2766  92,5  176,2  1,911  2,6 | 2675  88,2  196a  2,21a  1 | 2767  92,2  175b  1,91b  4,5 | 2796  93,7  172b  1,85b  1,9 | 2844  97,7  176b  1,80b  2,1 | 0,839  0,655  0,139  0,338  0,757 | | 0,060  0,069  0,006  <0,001  0,199 | | 0,655  0,513  0,359  0,083  0,301 |

## 3.3 Effect op fysiologische parameters van oxidatieve stress

### 3.3.1 GSSG/GSH redox status in lever –en hartweefsel

In Tabel 11 staan de resultaten weergegeven voor de concentratie aan GSH in leverweefsel. Uit de statistische verwerking blijkt dat de verschillende voederbehandelingen geen effect hadden op de concentratie van GSH. Het toedienen van Se-Met of NAC aan het voeder had geen effect op de GSH-concentratie, zowel na acute hittestress (d29), als na chronische hittestress (d41). Er werd ook geen interactie waargenomen tussen de factor Se-Met en NAC (P = 0,214). Verder werd wel een significant verschil gevonden tussen de GSH-concentratie na acute (d29) en chronische hittestress (d41) (P < 0,001). De gemiddelde concentratie op d41 bedroeg 3,72 µmol/g weefsel en was duidelijk lager dan de gemiddelde concentratie van 4,39 µmol/g weefsel op d29.

Tabel 11: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de concentratie van glutathion (GSH) in de lever van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | GSH-concentratie (µmol/g weefsel) d29 | Sign. waarde | GSH-concentratie (µmol/g weefsel) d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 4,37 | 0,863 | 3,76 | 0,608 |
|  | 0,2 | 4,40 | 3,69 |
| NAC | 0 | 4,42 | 0,893 | 3,49 | 0,195 |
|  | 500 | 4,35 | 3,74 |
|  | 1000 | 4,28 | 3,87 |
|  | 2000 | 4,47 | 3,80 |

Naast de concentratie aan GSH, die de gereduceerde vorm van glutathion voorstelt, werd ter zelfde tijd ook het gehalte aan GSSG gemeten in het leverweefsel. GSSG geeft de geoxideerde vorm van glutathion weer, die na het vormen van een zwavelbrug tussen 2 geoxideerde GSH-moleculen het molecule glutathion dissulfide (GSSG) vormt. Door het berekenen van de verhouding van GSSG-concentratie ten opzichte van de GSH-concentratie, kan men inschatten in welke mate het redoxkoppel GSSG/GSH gereduceerd of geoxideerd voorkomt. De resultaten voor deze redox status in leverweefsel staan weergegeven in Tabel 12. De statistische verwerking liet niet toe een significant effect terug te vinden door het toedienen van Se-Met of NAC aan het voeder. Er werd ook geen interactie teruggevonden tussen beide voorgenoemde factoren (P = 0,528). De gemiddelde waarde voor de GSSG/GSH redox status bedraagt 0,128. Er werd echter wel een significant effect teruggevonden van het staalnamemoment (P < 0,001). Kippen die bemonsterd werden na chronische hittestress (d41) hadden duidelijk een meer geoxideerde GSSG/GSH redox status in vergelijking met monstername na acute hittestress (d29). Waardes bedroegen respectievelijk 0,156 en 0,100.

Tabel 12: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de glutathion redox status (GSSG/GSH) in de lever van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | GSSG/GSH d29 | Sign. waarde | GSSG/GSH d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 0,104 | 0,356 | 0,159 | 0,734 |
|  | 0,2 | 0,096 | 0,152 |
| NAC | 0 | 0,091 | 0,331 | 0,163 | 0,755 |
|  | 500 | 0,095 | 0,157 |
|  | 1000 | 0,105 | 0,138 |
|  | 2000 | 0,111 | 0,165 |

Naast het GSH-gehalte in leverweefsel werd ook deze concentratie bepaald in hartweefsel van vleeskippen na acute en chronische hittestress. Deze resultaten staan weergegeven in Tabel 13. Net als in het leverweefsel kon ook hier in het hartweefsel geen significantie invloed worden teruggevonden van het toedienen van Se-Met of NAC aan het voeder. Verder werd ook geen interactie-effect aangetoond op d29 (P = 0,610) en d41 (P = 0,612). De gemiddelde GSH-concentratie in het hart bedroeg 2,88 µmol/g weefsel, wat beduidend lager is dan 4,54 µmol/g weefsel in de lever. Er werd echter wel terug een significant effect terug gevonden van het staalnamemoment (P = 0,012). De GSH-concentratie na chronische hittestress (d41) was significant hoger dan na acute hittestress (d29). De concentraties bedragen gemiddeld 1,92 en 3,84 µmol/g weefsel voor respectievelijk d29 en d41.

Tabel 13: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine (Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de concentratie van glutathion (GSH) in de hart van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | GSH-concentratie (µmol/g weefsel) d29 | Sign. waarde | GSH-concentratie (µmol/g weefsel) d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 2,01 | 0,367 | 2,97 | 0,135 |
|  | 0,2 | 1,81 | 4,89 |
| NAC | 0 | 1,80 | 0,652 | 5,46 | 0,494 |
|  | 500 | 1,78 | 4,02 |
|  | 1000 | 2,12 | 3,32 |
|  | 2000 | 1,96 | 1,27 |

Verder werd ook terug de GSSG-concentratie bepaald en aan de hand van de GSSG- en GSH-concentratie de GSSG/GSH redox status berekend. Deze resultaten voor het hartweefsel worden weergegeven in Tabel 14. Er werden ook hier geen significante effecten waargenomen door het toevoegen van Se-Met of NAC aan het voeder. Er werd ook geen interactie-effect aangetoond op d29 (P = 0,873) en d41 (P = 0,935). De gemiddelde waarde voor de GSSG/GSH redox status bedroeg 0,090. Er werd echter een significant verschil teruggevonden (P < 0,001) tussen de redox status na acute hittestress (d29) en chronische hittestress (d41). De gemiddelde waardes bedroegen respectievelijk 0,107 en 0,079.

Tabel 14: Effect van voedersupplementie met organisch selenium-methionine ( Se-Met) en N-acetyl-cysteïne (NAC) op de glutathion redox status (GSSG/GSH) in het hart van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | GSSG/GSH d29 | Sign. waarde | GSSG/GSH d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 0,106 | 0,835 | 0,082 | 0,333 |
|  | 0,2 | 0,109 | 0,075 |
| NAC | 0 | 0,099 | 0,785 | 0,085 | 0,797 |
|  | 500 | 0,106 | 0,075 |
|  | 1000 | 0,114 | 0,077 |
|  | 2000 | 0,110 | 0,077 |

### 3.3.2 MDA

De MDA-concentratie in het plasma werd bepaald voor dag 29 en dag 41. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 15. Er zijn geen significante verschillen terug te vinden bij Se-Met voor dag 29 en dag 41. Er is wel een tendens waar te nemen bij Se-Met op dag 41. De hoogste MDA-concentraties zijn te vinden bij 0,2 mg/kg Se via Se-Met. Bij NAC zijn ook geen significante waarden gevonden. Op dag 41 zijn de hoogste waarden wel terug te vinden bij een NAC-concentratie > 500 mg/kg. Zoals zichtbaar in Tabel 15 zijn de concentraties voor MDA hoger op dag 41 (chronische stress) in vergelijking met dag 29 (acute stress). Het verschil in MDA-concentratie tussen dag 29 en dag 41 is significant (P<0,001). Voor dag 29 werd een waarde van 12,9 gevonden, terwijl voor dag 41 een waarde van 14,5 werd waargenomen.

Tabel 15: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de concentratie van malondialdehyde (MDA) in het bloedplasma van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | MDA-concentratie (nmol/mL) d29 | Sign. waarde | MDA-concentratie (nmol/mL) d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 13,0 | 0,485 | 14,1 | 0,076 |
|  | 0,2 | 13,1 | 14,8 |
| NAC | 0 | 13,4 | 0,266 | 14,0 | 0,230 |
|  | 500 | 12,8 | 14,2 |
|  | 1000 | 13,0 | 14,9 |
|  | 2000 | 12,9 | 14,7 |

Bij de interactieterm op dag 41 zijn wel duidelijke verschillen zichtbaar. De significantiewaarde bedroeg 0,037 voor de interactie tussen de factor Se-Met en NAC. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Tabel 16. Vooral bij 0,2 mg/kg Se en NAC waarden ≥ 500 mg/kg kunnen duidelijk hogere MDA-concentraties worden vastgesteld in vergelijking met de controle (0,2 mg/kg Se-Met en 0 mg/kg NAC).

Tabel 16: Resultaten MDA-concentratie (nmol/mL) voor interactieterm (Se-Met \* NAC).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Se-Met | NAC | MDA-concentratie (nmol/mL) |
| 0 | 0 | 14,6 |
|  | 500 | 13,3 |
|  | 1000 | 14,5 |
|  | 2000 | 14,2 |
| 0,2 | 0a | 13,5 |
|  | 500b | 15,0 |
|  | 1000b | 15,3 |
|  | 2000b | 15,2 |

### 3.3.3 Histomorfologie van de dunne darm

Ter hoogte van 50% van de totale lengte van de dunne darm (jejunum) werd een weefselstaal genomen ter bepaling van de cryptendiepte, villuslengte en de verhouding crypten/villi. Dit werd enkel bepaald voor kippen die bemonsterd waren op d41, na de periode van chronische stress. Deze parameters werden niet bepaald op de stalen van kippen die werden bemonsterd op d29, aangezien er weinig tot geen effect wordt verwacht van acute hittestress op de darmmorfologie. In Tabel 17 worden de resultaten weergegeven. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de verschillende behandelingen.

Tabel 17: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de cryptendiepte (µm), villuslengte (µm) en crypten/villi verhouding van vleeskippen na chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | Cryptendiepte (µm) | Sign. Waarde | Villuslengte (µm) | Sign. waarde | Crypten / villi | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 99,1 | 0,381 | 1271 | 0,501 | 13,1 | 0,102 |
| 0,20 | 96,7 | 1303 | 13,8 |
| NAC | 0 | 98 | 0,551 | 1311 | 0,636 | 13,7 | 0,876 |
| 500 | 96,8 | 1251 | 13,2 |
| 1000 | 95,6 | 1263 | 13,3 |
| 2000 | 101,1 | 1324 | 13,4 |

### 3.3.4 Hematocriet

De hematocrietwaarde kan berekend worden door de verhouding van de hoeveelheid rode bloedcellen uit te drukken tegenover het totale bloedvolume. Alle resultaten zijn weergegeven in Tabel 18. De percentages bedragen gemiddeld 30. Op dag 29, d.w.z. na periode van acute hittestress, kunnen er geen significante verschillen worden terug gevonden in hematocrietwaarde (Tabel 18). Wel kan bij Se-Met een verhoogde hematocrietwaarde terug gevonden worden bij toevoeging van 0,20 mg/kg Se via Se-Met. Ook bij de hoogste toevoeging van NAC kan een hematocrietwaarde gevonden worden (31,4) die hoger ligt dan de andere. De verschillen zijn echter enkel numeriek en niet significant verschillend. Op dag 41 werden de vleeskippen geslacht na een periode van chronische hittestress. Ook hier zijn geen significante verschillen terug te vinden bij het al dan niet toevoegen van Se en NAC. Bij toevoeging van 0,20 mg/kg Se wordt de kleinste hematocrietwaarde gevonden. Dit is tegengesteld aan de resultaten gevonden op dag 29. Er kan geen verband gevonden worden bij de NAC supplementatie op dag 41.

Tabel 18: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de hematocrietwaarde van het bloed van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | HTC d29 | Sign. waarde | HTC d41 | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 29,2 | 0,167 | 29,9 | 0,228 |
|  | 0,20 | 30,7 | 28,8 |
| NAC | 0 | 29,4 | 0,437 | 29,0 | 0,824 |
|  | 500 | 29,8 | 29,8 |
|  | 1000 | 29,2 | 29,0 |
|  | 2000 | 31,4 | 29,8 |

### 3.3.5 Rectale temperatuur

De rectale temperatuur werd gemeten bij alle kippen die werden bemonsterd en dit net na het overbrengen van het dier van de stal naar de slachtvloer. Zo zijn er resultaten voor dag 29 (acute hittestress) en dag 41 (chronische hittestress) weergegeven in Tabel 19. Na statistische verwerking werden geen significante verschillen teruggevonden bij Se-Met en NAC op dag 29 en dag 41. Wel is er een significant verschil (P < 0,001) in rectale temperatuur tussen dag 29 en dag 41. De rectale temperatuur voor dag 29 was gemiddeld 42,5°C, terwijl deze voor dag 41 43,3°C bedroeg.

Tabel 19: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de rectale temperatuur van vleeskippen na acute (d29) en chronische (d41) hittestress

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | Rect. T. d29 | Sign. waarde | Rect. T. d41 | Sign. Waarde |
| Se-Met | 0 | 42,5 | 0,125 | 43,3 | 0,780 |
|  | 0,20 | 42,6 | 43,2 |
| NAC | 0 | 42,6 | 0,140 | 43,3 | 0,664 |
|  | 500 | 42,5 | 43,3 |
|  | 1000 | 42,5 | 43,2 |
|  | 2000 | 42,5 | 43,2 |

### 3.3.6 litter score

De litter score of strooiselkwaliteit werd op vier verschillende dagen gemeten. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 20. Na statistische analyse werd geen significant effect gevonden voor het toevoeven van Se-Met of NAC. Numeriek gezien daalde de strooiselkwaliteit tot <2 bij toevoeging van 0,2 mg/kg Se-Met. Dit betekent dat de strooiselkwaliteit beter was, doch niet significant verschillend. Bij NAC is er een omgekeerd effect. Hoe meer NAC wordt toegevoegd, hoe hoger de litter score. Dit betekent dat de strooiselkwaliteit afneemt bij toedienen van NAC tot 200 mg/kg. Nogmaals moet worden aangehaald dat deze verschillen niet significant werden bevonden.

Tabel 20: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de strooiselkwaliteit

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | Litter score | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 2,10 | 0,141 |
|  | 0,2 | 1,90 |
| NAC | 0 | 1,85 | 0,242 |
|  | 500 | 1,91 |
|  | 1000 | 2,13 |
|  | 2000 | 2,06 |

## 3.4 Vleeskwaliteit

### 3.4.1 Oxidatie van vers vlees: TBARS-analyse

De resultaten met hun statistische verwerking staan weergegeveven in Tabel 21. Er kon geen significant verschil waargenomen worden bij Se-Met. De waarden bedragen 0,185 µg MDA/ g vers vlees en 0,178 µg MDA/ g vers vlees. Deze waarden zijn zodanig laag dat buiten de laagste concentraties van de standaardreeks vallen. Er wordt dus maar weinig oxidatie vastgesteld. Dit was ook waarneembaar aan de kleur. Door toevoeging van het TBA reagens zou de oplossing sterk roze moeten kleuren wanneer er voldoende vetoxidatie aanwezig is. Dit was hier echter niet het geval. Bij NAC waren wel significante verschillen zichtbaar. De waarden bedragen gemiddeld 0,166 - 0,208 µg MDA/ g vers vlees, welke in principe ook lage concentraties zijn. Toch kan via statistische verwerking een verschil worden aangetoond. 500 mg NAC kent een significant verschil tegenover de andere hoeveelheden NAC (P=0,006).

Tabel 21: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op het Tbars-getal (µg malonaldehyde/g vers vlees) van vleeskippen op dag 42

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | Tbars-getal  (µg malonaldehyde/g vers vlees) | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 0,185 | 0,447 |
|  | 0,20 | 0,178 |
| NAC | 0 | 0,187ab | 0,006 |
|  | 500 | 0,208b |
|  | 1000 | 0,164a |
|  | 2000 | 0,166a |

### 3.4.2 Kleur en pH

De resultaten voor de vleeskleur en pH-metingen worden weergegeven in Tabel 22. Er kunnen geen significante verschillen gevonden worden bij de L-waarden. De interactieterm voor het effect van Se-Met en NAC is evenmin significant, maar bij het gebruik van 0,20 mg/kg Se-Met en 2000 mg/kg NAC kan wel de kleinste waarde van 53,7 teruggevonden worden. Bij de a-waarden worden ook geen significante verschillen gevonden. Er is wel een tendens voor een effect van Se-Met (P = 0,094). Een aanvulling van het voeder met 0,2 mg/kg Se-Met zorgt voor een hogere a-waarde van het vlees. De b-waarden bedroegen gemiddeld 15 eenheden, maar ook hier zijn nergens significante verschillen te vinden (Tabel 22).

Om te onderzoeken of er verschillende pH-dalingen zijn tussen de behandelingen werd het pH-verschil voor de verschillende behandelingen statistisch verwerkt. Er kon echter geen significant verschil geconstateerd worden. Alle resultaten zijn weergegeven in Tabel 22.

Tabel 22: Effect van voedersupplementie met Se-Met en NAC op de Lab-waarden en pH-verschil van vleeskippen na chronische (d42) hittestress

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Additief | Hoeveelheid (mg/kg) | L | Sign. Waarde | a | Sign. waarde | b | Sign. waarde | pH-verschil | Sign. waarde |
| Se-Met | 0 | 55,1 | 0,928 | 4,2 | 0,094 | 14,8 | 0,159 | 0,41 | 0,707 |
|  | 0,20 | 55,2 | 4,8 | 15,3 | 0,38 |
| NAC | 0 | 56,0 | 0,466 | 4,2 | 0,432 | 15,2 | 0,121 | 0,35 | 0,427 |
|  | 500 | 55,0 | 4,9 | 14,3 | 0,39 |
|  | 1000 | 55,0 | 4,4 | 15,6 | 0,38 |
|  | 2000 | 54,0 | 4,5 | 15,0 | 0,37 |

# Hoofdstuk 4

# Discussie

## 4.1 Voeders

Aan het standaard basisvoeder die weergegeven is in Tabel 6, worden nog extra AZ toegevoegd om aan de behoefte van de vleeskippen te voldoen. Aangezien er meest methionine wordt toegediend, kunnen we verklaren dat dit het eerste limiterende AZ is. Daarna volgt lysine. In deze masterproef werd echter NAC toegevoegd die kan omgezet worden in cysteïne. Methionine kan in cysteïne worden omgezet, maar omgekeerd is dit niet mogelijk. Toch wordt geen methionine toegevoegd aangezien er gevaar kan zijn voor assimilatie van homocysteïne. Te grote hoeveelheden homocysteïne kunnen verschillende ziekten veroorzaken (Willemsen et al., 2011). Bij het toevoegen van cysteïne aan het voeder wordt er wel een sparend effect verkregen van methionine. Aangezien methionine dan minder nodig is voor de aanmaak van cysteïne, kan methionine rechtstreeks worden gebruikt voor de groei van de kippen. Verhoogde waarden van cysteïne hebben volgens de literauur een positief effect op GSH. Op welke manier cysteïne het metabolisme positief beïnvloedt, kan achterhaald worden op basis van GSSG/GSH analyses.

In Tabel 7 worden de berekende waarden van de grondstoffen gebruikt uit Tabel 6 voor T1. Voor de andere behandelingen wordt er rekening gehouden met de hoeveelheid toegevoegde NAC. De verhouding VM+Cp/VLysp geeft een range weer van 0,730 tot 0,885. Deze waarden voldoen volgens de behoefte van het CVB. Het is pas vanaf toevoeging van 500 mg/kg NAC dat de waarden ook voldoen volgens ROSS 308. De vleeskippen zijn dus zeker naar norm gevoederd. Ook de kippen die boven behoefte werden gevoederd, hebben hiervan geen negatief effect ondervonden (zie later). Dit zijn echter wel behoeften voor thermoneutrale omstandigheden. Slachtkuikens zullen in eerste instantie minder voeder opnemen om aan thermoregulatie te kunnen doen. Door de verlaagde voederopname is het belangrijk meer eiwit en AZ in het voeder te brengen. Ostrowskimeissner (1981) sprak over een verlaagde eiwitsynthese en een uitputting van essentiële en niet-essentiële AZ tijdens hittestress, waardoor de behoefte ervan verhoogt. Volgens Gonzalez-Esquerra & Leeson (2006) is het nog steeds onduidelijk of de AZ-behoefte wijzigt in hittestress omstandigheden. Indien er toch kleine wijzigingen gebeuren in AZ-behoefte, dan zijn deze te verwaarlozen tegenover het verlies in opname door de verminderde voederopname.

In Tabel 4 in de literatuur worden de behoeften van de AZ weergegeven. Deze behoeften zijn uitgedrukt tegenover lysine. De behoeften van VM+Cp bedragen 78%. In Tabel 7 wordt voor behandeling T1 een berekende waarde van 73,1% weergegeven als de hoeveelheid VM+Cp/VLYSp. Voor T2 stijgt de waarde naar 76,9%. Dit wil zeggen dat de behoefte van VM+Cp/VLYSp voor behandelingen T1, T2, T5 en T6 te laag liggen volgens de behoefte van ROSS 308. Voor de andere behandelingen zijn de vleeskippen wel volgens behoefte gevoederd. Deze waarden liggen boven 78%. In geval er uitgegaan wordt van de behoeften van CVB kunnen we besluiten dat de vleeskippen wel volgens behoefte gevoederd worden en dit voor alle behandelingen. CVB gaat akkoord met een behoefte van 73%. Tabel 4 spreekt tevens over een %VMp/VM+Cp gelijk aan 54% volgens ROSS 308. In Tabel 7 zijn waarden terug te vinden van 62% tot 51%. Dit wil zeggen dat voor behandelingen T4 en T8 een klein tekort is aan methionine.

Zoals te zien in Tabel 7 daalt de behoefte aan methionine wanneer het dier in de eindfase terecht komt, aangezien de eiwitbehoefte daalt met de ouderdom. Deze nieuwe behoefte wordt deels weggewerkt door een vernieuwde samenstelling van de grondstoffen. De voederopname en energiebehoefte stijgen wel bij ouder wordende vleeskippen.

In Tabel 9 zijn de Se-gehalten weergegeven voor elke fase. T1 kreeg geen supplement van Se-Met, terwijl T5 wel een supplement kreeg van 0,20 mg/kg Se-Met. Echter is dit verschil in de starterfase niet duidelijk. Dit kan te wijten zijn aan een te heterogene staalname of foutieve dosering. De waarden liggen ook hoger dan 0,20 mg/kg, doordat Se ook in de grondstoffen en als anorganisch natriumseleniet aanwezig is in het voeder.

De droge stof gehalten van het voeder zijn gelijk als deze uit de analyse. Hieruit kunnen we besluiten dat de voedersamenstelling correct is. Echter wordt toch een grote afwijking gevonden voor het RE-gehalte. Dit kan verklaard worden doordat bepaalde grondstoffen andere voedersamenstellingen hebben dan verwacht. Dit is verwonderlijk daar uitgegaan werd van RE-analysewaarden voor sojaproducten. Volgens het iBBT (2012) en ROSS 308 richtlijnen zijn de waarden als volgt te beschrijven (Tabel 23):

Tabel : % ruw eiwit behoefte aanwezig in iedere fase volgens iBBT en ROSS308 richtlijnen.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Fase | % ruw eiwit (RE) | |
|  | iBBT | ROSS308 |
| Startervoeder | 20-22 | 23,0 |
| Groeivoeder | 19-21 | 21,5 |
| Afmestvoeder | 18-20 | 19,5 |

De RE-gehalten voor startervoeder zitten in de range van het iBBT. Het RE voor groeivoeder en afmestvoeder zit op 18,6 en 17,6% respectievelijk. Dit is volgens het iBBT te weinig. Ook voor de afmestfase zit er een tekort aan RE in het voeder. Een tekort aan eiwit kan een tragere groei veroorzaken. Dit is natuurlijk ook afhankelijk of er al dan niet een tekort is aan essentiële AZ. Ook volgens de ROSS 308 behoeften moeten de eiwitwaarden hoger liggen.

## 4.2 Zoötechnische prestaties

De kuikens werden tot dag 28 opgekweekt in een stal met normale temperaturen. Op het einde van dag 27 bedroeg deze temperatuur 22°C. Vanaf dag 28 begon een periode van hittestress en werd de temperatuur opgedreven tot 34°C gedurende 7 uur per dag. Het is reeds geweten dat de voederopname daalt wanneer er warme temperaturen heersen. Een daling in toename van het lichaamsgewicht is een logisch gevolg. We kunnen de gewichten niet vergelijken met een controlegroep zonder hittestress. Wel kunnen onderlinge verbanden gelegd worden tussen de groepen met of zonder Se-Met en NAC. Voor Se-Met kunnen significante verschillen gevonden worden voor BW op dag 10 en ADG tussen dag 0 en dag 10. Dit wil zeggen dat Se-Met vooral in de eerste groeifase een positief effect creëert. Dit kan ook verder afgeleid worden aan de ADFI en FC die een tendens vertonen voor de eerste groeidagen. Vanaf dag 10 gaat het effect van Se toevoeging verloren. In de literatuur is tevens weergegeven dat Se zorgt voor een verbeterde groei (Yang, 2012).

Bij NAC 2000 mg/kg vinden we het hoogste eind lichaamsgewicht terug. Hieruit kan afgeleid worden dat NAC de hittestress situatie dekt. Een spectaculair resultaat aangezien de voederopname per dag wel daalt bij toevoeging van 2000 mg/kg NAC. Dit wordt nog eens bevestigd door stijging van ADG bij toevoeging van meer NAC. Hieruit kan dus besloten worden dat NAC bij verminderde voederopname wel voldoende zware karkassen geeft en dat de hittestress situatie wordt ingedekt. Ook de FC vertoont significante verschillen.

De gemiddelde normale voederopname voor mannelijke ROSS 308 bedraagt 184 g voor de periode van d25 tot d41 (Aviagen, 2014). In de hokken waar geen NAC aanwezig was, is er een voederopname van 196 g gemeten. Aangezien vleeskippen minder opnemen in hittestress omstandigheden wijst dit erop dat er wel wat voedervermorsing was. Tijdens de proef zijn inderdaad enkele voederbakken omgevallen in de hokken. Het gaat om 3 hokken waar 2000 mg/kg NAC werd gesupplementeerd, 2 hokken waar 1000 mg/kg NAC werd toegevoegd en 3 hokken waar geen NAC werd toegevoegd aan het voeder. In de andere hokken is de voederopname lager dan 184 g en kan dit dus wel kloppen. Er kan dus niet met 100% zekerheid besloten worden dat NAC een dalend effect heeft in voederopname. Ook kan bedacht worden dat door het laag eiwitgehalte in het voeder, kippen selectief gaan voederen, en op die manier ook meer van het grof meel gaan vermorsen. Misschien was dit effect minder aanwezig bij hogere NAC gehalten in het voeder. Se vertoont ook een dalend effect in voederopname, maar dit is wel niet significant.

De berekende hoeveelheid AZ in het voeder die weergegeven zijn in Tabel 7, worden vergeleken met de behoeftenormen uit Tabel 4 (literatuur). De verhouding van methionine + cysteïne tegenover dat van lysine bevinden zich onder de behoeftenormen voor NAC = 0 mg/kg en 500 mg/kg volgens ROSS 308. Volgens het CVB zijn de vleeskippen wel naar behoefte gevoederd. Vanaf NAC=1000 mg/kg bevinden zich de hoeveelheid VM+Cp/VLYSp boven de behoeftenormen. Dit wil zeggen dat de kippen die 0 mg/kg en 500 mg/kg NAC verkregen, een tekort aan AZ kregen, waardoor de groei lager zou moeten zijn dan de gemiddelde groei voor ROSS 308. In tabellen van ROSS 308 spreekt men over een gemiddeld gewicht van 2917 gram voor mannetjes vleeskippen op dag 41 (Aviagen, 2014). Aangezien het lichaamsgewicht bij de kippen die 0 mg/kg NAC kregen, 2675 gram bedraagt, is hier dus een duidelijk tekort. Dit is zo bij alle NAC-concentraties. De hoogste waarde van 2844 gram blijft onder het algemeen gemiddelde volgens ROSS 308. Het is wel zo dat bij grote waarden van VM+Cp/VLYSp, grotere lichaamsgewichten worden gehaald. We spreken van een positief respons. Het tekort aan gewicht kan verklaard worden door het tekort aan RE in het voeder. 2% RE tekort zorgt voor een verminderde groei. Door een tekort aan eiwit zou het effect van NAC sterker tot uiting komen door een lagere voorziening van essentiële en mogelijks ook niet niet-essentiële AZ, zoals glycine en serine. Glycine en serine kunnen in het lichaam gemakkelijk in elkaar reversibel worden omgezet via serine-hydroxymetyltransferase. Uit de literatuur is tevens gebleken dat serine belangrijk is bij de omzetting van homocysteïne in cysteïne (Ulrey et al., 2005). Door een tekort aan eiwit zou op deze manier minder cysteïne aangemaakt worden, waardoor een verminderde antioxidantenwerking van GSH zou ontstaan. Een andere verklaring kunnen we zoeken in de richting van hittestress. Hogere temperaturen drukken de voederopname, waardoor de vleeskippen magerder blijven. De voederefficiëntie is wellicht niet optimaal in hittestress omstandigheden. Afhankelijk van de resultaten voor GSSG/GSH kunnen we waarnemen of er genoeg antioxidante werking is opgetreden. Misschien dat dit effect voorrang kreeg, waardoor er minder AZ vrij waren voor eiwitaanmaak en dus voor groei.

## 4.3 Fysiologische parameters van oxidatieve stress

### 4.3.1 GSSG/GSH

In de literatuur verschenen reeds verschillende studies waar cysteïne toevoeging aan het voeder een positief effect uitoefende op het gehalte GSH. Aangezien een verhoogd gehalte GSH, voor een verhoogde anti-oxidante werking zorgt, wordt op deze manier de oxidatieve stress verlaagd. In deze masterproef werden echter geen significante verschillen gevonden voor GSH in de lever en het hart bij toevoeging van Se-Met en NAC aan het voeder. Er kan besloten worden dat NAC, die zou dienst doen als precursor voor GSH, geen invloed heeft op het gehalte GSH. Bij zowel de lever en het hart zijn wel significante verschillen gevonden voor het staalnamemoment. In de lever werden lagere waarden gevonden van GSH op dag 41 en hogere waarden van GSSG/GSH redoxkoppel op dag 41. Dit kan betekenen dat de lever wél gevoelig is geweest aan oxidatieve stress, waardoor de GSH-concentratie daalde en de GSSG-concentratie bijgevolg steeg. Bij het hartweefsel was dit niet het geval. Hier werden in chronische periode hogere waarden van GSH en lagere waarden van het redoxkoppel gevonden, in vergelijking met de staalname na acute hittestress. Het hart heeft dus hoogst waarschijnlijk op een andere manier gereageerd op de hittestress. Er kan niet afgeleid worden of er oxidatieve stress is geweest, aangezien er geen controlegroepen aanwezig zijn. Wel kunnen kippen in chronische hittestress hun GSH-synthese opreguleren, waardoor ze zich meer kunnen aanpassen aan de hittestress situatie. De GSH-concentratie kan gehandhaafd worden door regeneratie van GSH uit GSSG. Het GSH-gehalte op zich zegt dus niet zoveel over de oxidatieve stress. De GSSG/GSH redox status kan daarentegen wel als indicator voor oxidatieve stress gebruikt worden. Aangezien deze waarden bij lever op dag 41 hoger zijn, wijst dit zeker op oxidatieve stress in het leverweefsel. Echter moet ook de bedenking worden gemaakt dat de kippen een verschillende leeftijd hadden na chronische hittestress, in vergelijking met de kippen na acute hittestress. De verschillen die werden waargenomen tussen d29 en d41 kunnen dus ook leeftijdsgebonden verschillen zijn.

Er kan besloten worden dat NAC in deze proef geen effect heeft op de GSH-concentratie en dat de oorzaak van de significante groeiresultaten op een andere manier moeten gezocht worden. Zo kan toevoeging van NAC een sparend effect van methionine veroorzaken, waardoor significante invloeden op voederconversie kunnen verkregen worden (Ball et al., 2006).

### 4.3.2 MDA

MDA geeft de mate van vetoxidatie weer wat op zijn beurt een aanwijzing is voor oxidatieve stress. Volgens Altan et al. (2003) worden de MDA-concentraties in het bloed met 1 nmol/mL verhoogd in hittestress omstandigheden. Aangezien hier geen controlegroepen bestaan van vleeskippen in thermoneutrale zone, kunnen we deze dus niet vergelijken. Wel kan een onderling verband gezocht worden tussen de mate van toevoeging van additieven Se-Met en NAC. De resultaten geven grotere MDA-concentraties bij 0,2 mg/kg Se-Met en bij hogere NAC-waarden. Dit wil zeggen dat er meer oxidatieve stress aanwezig was bij de kippen in de hokken met additieven. De aanwezig onverzadigde vetzuren zijn dus bijgevolg gevoeliger aan oxidatie.

Daarnaast beweert Wang et al. (2009) dat acute hittestress voor hogere MDA-concentraties zorgt dan chronische hittestress, aangezien dit laatste acclimatisatie heeft ondergaan. In dit onderzoek lijkt dit niet te kloppen. De waarden bij chronische hittestress liggen ± 1 nmol/mL hoger dan bij acute stress. In de literatuur is tevens aangegeven dat verhoogde Se-gehalten voor meer GPx zorgen. Deze GPx zorgt voor de omzetting van schadelijke ROS naar onschadelijke eindproducten, waardoor de MDA-concentratie zou moeten dalen (Harsini et al., 2012). Ook hier is dit niet het geval daar een lichte stijging waar te nemen is bij 0,2 mg/kg Se-Met.

### 4.3.3 Villus en crypten

Hittestress heeft een negatief effect op de intestinale mucosa. Dit werd bewezen door Mitchell & Carlisle (1992) die beschreven dat de villuslengte daalde wanneer hittestress werd toegepast (36°C) gedurende 7 dagen voor het slachten van de vleeskippen. Crypten zorgen voor aanmaak van nieuwe cellen die dan de villi vormen. Hittestress zorgt niet alleen voor verminderde villuslengte, maar ook voor kleinere crypten, waardoor er minder nieuwe cellen worden aangemaakt. In een studie van Garriga et al. (2006) werd ontdekt dat verminderde voederopname zorgde voor een stimulatie van villus groei. Aangezien de dieren in hittestress omstandigheden minder voeder opnemen, kan dit negatief effect wat verminderd worden. In deze masterproef kunnen geen significante verschillen gevonden worden.

### 4.3.4 Hematocriet

In de literatuur staat vermeld dat de hematocrietwaarde daalt bij hittestress. In een proef van Altan et al. (2003) daalde de hematocrietwaarde van 34% naar 31%. Er zijn geen significante verschillen waar te nemen in hematocrietwaarden in deze masterproef. Wel kan op dag 29 (acute hittestress) een stijging van hematocrietwaarde terug gevonden worden bij 0,20 mg/kg Se-Met. Ook 2000 mg/kg NAC geeft de grootste waarden in hematocriet weer, maar beide resultaten zijn niet significant. Wel kan opgemerkt worden dat deze waarde allemaal veel lager liggen dan de normale 34%. De waarden komen overeen met de 31% die Altan et al. (2003) rapporteerde. Op basis van deze parameter kan hittestress dus bewezen worden.

### 4.3.5 Rectale temperatuur

Bij de rectale temperatuur zijn geen significante waarden gevonden. Wel kan er een duidelijk verband gevonden worden tussen chronische en acute hittestress. De temperatuur in acute hittestress omstandigheden bedraagt ongeveer 42,5°C, terwijl deze bij chronische hittestress omstandigheden 43,3°C bedraagt. Volgens Chen et al. (2013) bedragen de normale rectale temperaturen 41,4°C. De hittestress gerelateerde temperaturen stijgen dan tot 42,2°C en zelfs tot 42,6°C. Een hogere rectale temperatuur op dag 41 kan ook verklaard worden doordat de vleeskippen metabolisch actiever zijn (hogere voederopname) op oudere leeftijd.

### 4.3.6 Litter score

Uit de resultaten kunnen geen significante verschillen waargenomen worden voor Se-Met en NAC. Bij toevoeging van Se-Met wordt een lagere litter score verkregen. Dit wil zeggen dat het strooisel droog blijft en niet te donker wordt van kleur. Enkel bij drink- en voederbak is er plaatvorming opgetreden. In de stal kon over het algemeen een goede strooiselkwaliteit waargenomen worden. In de literatuur is weinig te vinden over het scoren van het strooisel. Er zijn nog geen effecten beschreven van Se-Met op de litter score. Er moet tevens rekening worden gehouden dat het om een subjectieve score gaat.

## Effect van oxidatieve stress op vlees

### 4.4.1 TBARS-analyse

Vetoxidatie in het lichaam kan steeds bepaald worden met het oxidatieproduct MDA. Deze techniek werd gebruikt om in het bloedplasma de hoeveelheid vetoxidatie te bepalen. De resultaten waren enkele positief voor de interactieterm. Hier wordt de vetoxidatie gemeten op borstvlees. Aangezien het om vaste materie gaat, moest er gewerkt worden met het destillatiesysteem. In deze proef werden wel significante resultaten duidelijk voor NAC. Bij toevoeging van 500 mg/kg NAC werd het grootste Tbars-getal bekomen. Dit wil zeggen dat de vetoxidatie bij deze hoeveelheid NAC het hoogste lag. Uiteraard zijn deze waarden zeer klein. De kleinste standaardoplossing bedraagt 4,37 nmol/5mL. Als deze wordt vermenigvuldigd met de factor 0,144 bekomt men een Tbars-getal van 0,629. Dit wil zeggen dat 500 mg/kg NAC met 0,208 µg malonaldehyde/g vers vlees weinig vetoxidatie ondergaan heeft. Toch verschilt dit significant van de andere waarden. Vanaf 1000 mg/kg NAC is de vetoxidatie in vers vlees beduidend lager.

De hoogste vetoxidatie werd bekomen bij 500 mg/kg NAC. Er werden echter geen significante verschillen gevonden voor NAC in GSSG/GSH-analyses. De analyses voor borstvlees zijn niet verlopen zoals gewild. Er was te weinig GSH aanwezig, waardoor dit niet meetbaar was. Er kan dus geen echte verklaring gevonden worden voor de verhoogde vetoxidatie bij 500 mg/kg NAC.

### 4.4.2 Kleur en pH

Volgens McKee et al. (1997) kan het fenomeen hittestress aangetoond worden met de L-waarde. Als de waarden groter zijn dan 53 dan kan dit wijzen op hittestress. Een grotere L-waarde betekent een lichtere kleur van het vlees. Het is het proteïnegehalte die de reflectie van het vlees bepaald en dat dus achterhaald kan worden met de L-waarde. Dit is echter wel afhankelijk van de pH. Hittestress zorgt voor een hogere denaturatie van de eiwitten, waardoor een verhoogde lichtverstrooiing veroorzaakt wordt. Op deze manier kunnen hogere L-waarden verklaard worden in hittestress omstandigheden (Vanhoof, 1979).

De a- en b-waarden bepalen de kleurintensiteit. Deze kleurintensiteit is afhankelijk van het pigment en zijn oxidatieproduct. De a-waarde heeft de roodheidsfactor weer. Een rode pigmentkleur bestaat uit 90% myoglobine en 10% heamoglobine. Wanneer de myoglobine oxideert naar metmyoglobine ontstaat er een minder rode kleur en daalt de a-waarde. Alle kleurparameters zijn sterk afhankelijk van de pH en de snelheid van pH-daling. pH zorgt voor de oxidatie van heampigmenten, waardoor de kleur kan veranderen (Eeckhout, 2015).

Er zijn geen significante verschillen terug gevonden bij de kleurmetingen. Wel is er een tendens aanwezig voor de a-waarden bij toevoeging van Se-Met. 0,20 mg/kg Se-Met zorgt voor hogere a-waarden van het vlees. Dit wil zeggen dat het vlees roder is van kleur.

# Algemeen besluit

De toediening van Se-Met in het voeder induceerde een verhoging van het lichaamsgewicht en dagelijkse groei in de starterfase. Se-Met zorgde tevens voor een tendens in voederconversie en dagelijkse voederopname in de starterfase. Dit is opmerkelijk aangezien het verschil in Se concentratie in het voeder tussen het gesupplementeerd en niet-gesupplementeerd voeder slechts 0,046 mg/kg bedroeg in plaats van 0,20 mg/kg. Toevoeging van Se-Met in de groei- en afmestfase had geen effect op de dierprestaties. Ook werden de fysiologische variabelen van oxidatieve status in diverse weefsels (GSH, GSSG, MDA) en vleeskwaliteit (oa. TBARS na simulated retail display) niet beïnvloed.

NAC werd in toenemende dosis toegevoegd aan het afmestvoeder met als doel verminderde oxidatieve stress te induceren bij de vleeskippen onder hittestress in het laatste deel van de afmest. NAC had een positief effect op de voederconversie en een negatief effect op de dagelijkse voederopname in de eindfase. Groei en eindgewicht vertoonde een positieve trend. Niettemin kon besloten worden dat het gemiddelde gewicht van de kippen lager lag dan het vooropgestelde gewicht volgens ROSS 308. De oorzaak van het laag lichaamsgewicht kan gezocht worden bij hittestress. Hittestress induceert namelijk een verlaagde voederopname, waardoor kleinere lichaamsgewichten verkregen worden. Ook kan het lage ruw eiwitgehalte van het afmestvoeder bijgedragen hebben tot deze lage groei. NAC had in tegenstelling tot de verwachting geen invloed op de fysiologische variabelen van oxidatieve status in diverse weefsels (GSH, GSSG, MDA), noch bij acute hittestress, noch bij chronische hittestress. Vermits NAC geen effect had op oxidatieve status moet een andere verklaring gezocht worden voor de positieve effecten op de dierprestaties:

1. Toevoeging van NAC kan een sparend effect creëren van methionine aangezien de transmethylatie van methionine naar cysteïne beperkt wordt door de voldoende aanwezigheid van cysteïne.
2. Aangezien er een tekort aan ruw eiwit in het voeder is opgemerkt, zal er waarschijnlijk ook een verlaagde hoeveelheid verteerbare eiwit aanwezig zijn, waardoor NAC hierdoor meer tot uiting kan komen. Bij een laag eiwitgehalte kunnen we veronderstellen dat de gehaltes aan serine en glycine dalen. Op deze manier wordt er minder cysteïne gevormd en kan NAC een duidelijk verbeterd effect creëren.

Er kan besloten worden dat NAC geen invloed heeft op GSH, maar dat bij hittestress verhoogde gehaltes aan cysteïne noodzakelijk zijn voor een optimale groei. Door het sparend effect van methionine, wordt meer methionine gebruikt voor de eiwitsynthese en kan methionine tevens een positief effect uitoefenen op de productie van groeigerelateerde hormonen (Del Vesco et al., 2015).

# Bibliografie

Ahmad, H., Tian, J. K., Wang, J. J., Khan, M. A., Wang, Y. X., Zhang, L. L., & Wang, T. (2012). Effects of Dietary Sodium Selenite and Selenium Yeast on Antioxidant Enzyme Activities and Oxidative Stability of Chicken Breast Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(29), 7111-7120.

Ahola, T., Fellman, V., Laaksonen, R., Laitila, J., Lapatto, R., Neuvonen, P. J., & Raivio, K. O. (1999). Pharmacokinetics of intravenous N-acetylcysteine in pre-term new-born infants. *European Journal of Clinical Pharmacology, 55*(9), 645-650.

Altan, O., Pabuccuoglu, A., Altan, A., Konyalioglu, S., & Bayraktar, H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science, 44*(4), 545-550.

Arthur, J. R., McKenzie, R. C., & Beckett, G. J. (2003). Selenium in the immune system. *J Nutr, 133*(5 Suppl 1), 1457S-1459S.

Azad, M. A., Kikusato, M., Maekawa, T., Shirakawa, H., & Toyomizu, M. (2010). Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 155*(3), 401-406.

Azad, M. A. K., Kikusato, M., Zulkifli, I., & Toyomizu, M. (2013). Electrolysed reduced water decreases reactive oxygen species-induced oxidative damage to skeletal muscle and improves performance in broiler chickens exposed to medium-term chronic heat stress. *British Poultry Science, 54*(4), 503-509.

Baker, D. H. (2006). Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *Journal of Nutrition, 136*(6), 1670S-1675S.

Baker, D. H. (2009). Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids, 37*(1), 29-41.

Baker, D. H., Bafundo, K. W., Boebel, K. P., Czarnecki, G. L., & Halpin, K. M. (1984). METHIONINE PEPTIDES AS POTENTIAL FOOD SUPPLEMENTS - EFFICACY AND SUSCEPTIBILITY TO MAILLARD BROWNING. *Journal of Nutrition, 114*(2), 292-297.

Ball, R. O., Courtney-Martin, G., & Pencharz, P. B. (2006). The in vivo sparing of methionine by cysteine in sulfur amino acid requirements in animal models and adult humans. *Journal of Nutrition, 136*(6), 1682S-1693S.

Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T., & Brody, E. N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biology, 4*, 340-345.

Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., & Burrin, D. G. (2009). Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews, 22*(2), 175-187.

Best, B. Methionine, SAMe, Homocysteine, and the Methionine Cycle.

Bunk, M. J., & Combs, G. F., Jr. (1980). Effect of selenium on appetite in the selenium-deficient chick. *J Nutr, 110*(4), 743-749.

Campo, J. L., & Carnicer, C. (1994). EFFECTS OF SEVERAL STRESSORS ON TONIC IMMOBILITY REACTION OF CHICKENS. *Archiv Fur Geflugelkunde, 58*(2), 75-78.

Chen, G. S., Wu, J. F., & Li, C. (2013). The effect of different selenium levels on production performance and biochemical parameters of broilers. *Italian Journal of Animal Science, 12*(4), 6.

Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria - Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry, 278*(38), 36027-36031.

Chen, X. Y., Wei, P. P., Xu, S. Y., Geng, Z. Y., & Jiang, R. S. (2013). Rectal temperature as an indicator for heat tolerance in chickens. *Animal Science Journal, 84*(11), 737-739.

Choct, M., Naylor, A. J., & Reinke, N. (2004). Selenium supplementation affects broiler growth performance, meat yield and feather coverage. *Br Poult Sci, 45*(5), 677-683.

Criscuolo, F., Gonzalez-Barroso, M. D., Le Maho, Y., Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2005). Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 272*(1565), 803-810.

D'Aquino, M., Benedetti, P. C., Di Felice, M., Gentili, V., Tomassi, G., Maiorino, M., & Ursini, F. (1991). Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radic Res Commun, 12-13 Pt 1*, 147-152.

da Silva, I. C. M., Ribeiro, A. M. L., Canal, C. W., Trevizan, L., Macagnan, M., Goncalves, T. A., . . . Pereira, R. A. (2010). The Impact of Organic and Inorganic Selenium on the Immune System of Growing Broilers Submitted to Immune Stimulation and Heat Stress. *Brazilian Journal of Poultry Science, 12*(4), 247-254.

Davis, C. D., & Uthus, E. O. (2003). Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats. *Journal of Nutrition, 133*(9), 2907-2914.

de Almeida, J. N., dos Santos, G. R., Beteto, F. M., de Medeiros, L. G., Oba, A., Shimokomaki, M., & Soares, A. L. (2012). Dietary supplementation of chelated selenium and broiler chicken meat quality. *Semina-Ciencias Agrarias, 33*, 3117-3122.

Del Vesco, A. P., & Gasparino, E. (2013). Production of reactive oxygen species, gene expression, and enzymatic activity in quail subjected to acute heat stress. *Journal of Animal Science, 91*(2), 582-587.

Del Vesco, A.P., Gasparino, E., Grieser, DO., Zancanela, V. (2015). Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *Journal of Animal Science.*

Demeyer, H. D. B. D. (1998). Vlees.

Dilger, R. N., & Baker, D. H. (2007). Oral N-acetyl-L-cysteine is a safe and effective precursor of cysteine. *Journal of Animal Science, 85*(7), 1712-1718.

Dilger, R. N., Toue, S., Kimura, T., Sakai, R., & Baker, D. H. (2007). Excess dietary L-cysteine, but not L-cystine, is lethal for chicks but not for rats or pigs. *Journal of Nutrition, 137*(2), 331-338.

Dlouha, G., Sevcikova, S., Dokoupilova, A., Zita, L., Heindl, J., & Skrivan, M. (2008). Effect of dietary selenium sources on, growth performance, breast muscle selenium, glutathione peroxidase activity and oxidative stability in broilers. *Czech Journal of Animal Science, 53*(6), 265-269.

Eeckhout, M. (2015). Vleestechnologie.

Esterbauer, H., & Zollner, H. (1989). METHODS FOR DETERMINATION OF ALDEHYDIC LIPID-PEROXIDATION PRODUCTS. *Free Radical Biology and Medicine, 7*(2), 197-203.

Fairweather-Tait, S. J. (1997). Bioavailability of selenium. *Eur J Clin Nutr, 51 Suppl 1*, S20-23.

Finkelstein, J. D., & Martin, J. J. (1984). METHIONINE METABOLISM IN MAMMALS - DISTRIBUTION OF HOMOCYSTEINE BETWEEN COMPETING PATHWAYS. *Journal of Biological Chemistry, 259*(15), 9508-9513.

Finkelstein, J. D., Martin, J. J., & Harris, B. J. (1986). EFFECT OF DIETARY CYSTINE ON METHIONINE METABOLISM IN RAT-LIVER. *Journal of Nutrition, 116*(6), 985-990.

Fukagawa, N. K., Ajami, A. M., & Young, V. R. (1996). Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 270*(2), E209-E214.

Gabai, G., Testoni, S., Piccinini, R., Marinelli, L., & Stradaioli, G. (2004). Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *Animal Science, 79*, 99-108.

Gansbeke, S. V., & Bogaert, T. V. d. (2011). Huisvesting van vleeskippen.

Garcia, R. A. G., & Stipanuk, M. H. (1992). THE SPLANCHNIC ORGANS, LIVER AND KIDNEY HAVE UNIQUE ROLES IN THE METABOLISM OF SULFUR AMINO-ACIDS AND THEIR METABOLITES IN RATS. *Journal of Nutrition, 122*(8), 1693-1701.

Garriga, C., Hunter, R. R., Amat, C., Planas, J. M., Mitchell, M. A., & Moreto, M. (2006). Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 290*(1), R195-R201.

Geng, A. L., Li, B. M., & Guo, Y. M. (2007). Effects of dietary L-carnitine and coenzyme Q(10) at different supplemental ages on growth performance and some immune response in ascites-susceptible broilers. *Archives of Animal Nutrition, 61*(1), 50-60.

Geoff H. Werstuck, S. R. L., 2 Sanjana Dayal,2 Gazi S. Hossain,1 Sudesh K. Sood,1 Yuan Y. Shi,1 Ji Zhou,1 Nobuyo Maeda,3 Skaidrite K. Krisans,4 M. Rene Malinow,5 and Richard C. Austin1. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways.

Gonzalez-Esquerra, R., & Leeson, S. (2006). Physiological and metabolic responses of broilers to heat stress - implications for protein and amino acid nutrition. *Worlds Poultry Science Journal, 62*(2), 282-295.

Gudiksen, K. L., Gitlin, I., & Whitesides, G. M. (2006). Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(21), 7968-7972.

Habibian, M., Ghazi, S., Moeini, M. M., & Abdolmohammadi, A. (2014). Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology, 58*(5), 741-752.

Habibian, M., Sadeghi, G., Ghazi, S., & Moeini, M. M. (2015). Selenium as a Feed Supplement for Heat-Stressed Poultry: a Review. *Biological Trace Element Research, 165*(2), 183-193.

Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology, 142*(2), 231-255.

Harper, A. E., Beneveng.Nj, & Wohlhuet.Rm. (1970). EFFECTS OF INGESTION OF DISPROPORTIONATE AMOUNTS OF AMINO ACIDS. *Physiological Reviews, 50*(3), 428-&.

Harsini, S. G., Habibiyan, M., Moeini, M. M., & Abdolmohammadi, A. R. (2012). Effects of Dietary Selenium, Vitamin E, and Their Combination on Growth, Serum Metabolites, and Antioxidant Defense System in Skeletal Muscle of Broilers Under Heat Stress. *Biological Trace Element Research, 148*(3), 322-330.

Heindl, J., Ledvinka, Z., Englmaierova, M., Zita, L., & Tumova, E. (2010). The effect of dietary selenium sources and levels on performance, selenium content in muscle and glutathione peroxidase activity in broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science, 55*(12), 572-578.

Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSSG/GSH couple: Assay and biological significance. *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Pt B, Thiol Enzymes and Proteins, 348*, 93-112.

Jurkovic, S., Osredkar, J., & Marc, J. (2008). Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochemia Medica, 18*(2), 162-174.

Juxing Chen, G. T., James D. Richards, Jeffery Escobar. (2015). Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens.

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., Javdani, M., Rana, N., & Laudadio, V. (2011). Effect of vitamin E in heat-stressed poultry. *Worlds Poultry Science Journal, 67*(3), 469-477.

Klavins, J. V. (1963). PATHOLOGY OF AMINO ACID EXCESS .2. EFFECTS OF ADMINISTRATION OF EXCESSIVE AMOUNTS OF SULPHUR CONTAINING AMINO ACIDS - L-CYSTINE. *British Journal of Experimental Pathology, 44*(5), 516-&.

Lara, L., & Rostagno, M. (2013). Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals, 3*(2), 356-369.

Lei, X. G. (2002). In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: Evidence from knockout mice. *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Pt a, Selenoproteins and Thioredoxin, 347*, 213-225.

Lu, Q., Wen, J., & Zhang, H. (2007). Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. *Poultry Science, 86*(6), 1059-1064.

Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal, 173*(3), 502-511.

Ma, Z. A., Zhao, Z., & Turk, J. (2012). Mitochondrial dysfunction and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res, 2012*, 703538.

Matera, M. G., Calzetta, L., & Cazzola, M. (2016). Oxidation pathway and exacerbations in COPD: the role of NAC. *Expert Review of Respiratory Medicine, 10*(1), 89-97.

Mato, J. M., Corrales, F. J., Lu, S. C., & Avila, M. A. (2002). S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb Journal, 16*(1), 15-26.

Mazza, R. M. G. (2009). Glutathione and the sulfur amino acids in human health and disease.

McKee, S. R., & Sams, A. R. (1997). The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poultry Science, 76*(11), 1616-1620.

Michiels, J., Tagliabue, M. M., Akbarian, A., Ovyn, A., & De Smet, S. (2014). Oxidative status, meat quality and fatty acid profile of broiler chickens reared under free-range and severely feed-restricted conditions compared with conventional indoor rearing. *Avian Biology Research, 7*(2), 74-82.

Mitchell, M. A., & Carlisle, A. J. (1992). THE EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO ELEVATED ENVIRONMENTAL-TEMPERATURE ON INTESTINAL MORPHOLOGY AND NUTRIENT ABSORPTION IN THE DOMESTIC-FOWL (GALLUS-DOMESTICUS). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology, 101*(1), 137-142.

Miwa, S., & Brand, M. D. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions, 31*, 1300-1301.

Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y., & Toyomizu, M. (2006). Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poultry Science, 85*(7), 1259-1265.

Mutaf, S., Kahraman, N. S., & Firat, M. Z. (2009). Intermittent partial surface wetting and its effect on body-surface temperatures and egg production of white and brown domestic laying hens in Antalya (Turkey). *Br Poult Sci, 50*(1), 33-38.

Naziroglu, M. (2009). Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochemical Research, 34*(12), 2181-2191.

Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, J. B., Andersen, H. R., & Grandjean, P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry, 43*(7), 1209-1214.

Niu, Z. Y., Liu, F. Z., Yan, Q. L., & Li, L. (2009). Effects of different levels of selenium on growth performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Archives of Animal Nutrition, 63*(1), 56-65.

Ostrowskimeissner, H. T. (1981). THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF BROILERS EXPOSED TO SHORT-TERM THERMAL-STRESS. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology, 70*(1), 1-8.

Ozgul, C., & Naziroglu, M. (2012). TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca2+ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiology & Behavior, 106*(2), 122-128.

Pamok, S., Aengwanich, W., & Komutrin, T. (2009). Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology, 34*(7), 353-357.

Placha, I., Takacova, J., Ryzner, M., Cobanova, K., Laukova, A., Strompfova, V., . . . Faix, S. (2014). Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *Br Poult Sci, 55*(1), 105-114.

Poulsen, H. E. (2005). Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology, 57*, 161-169. doi:10.1016/j.etp.2005.05.015

Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2010). Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil:lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poult Sci, 89*(10), 2071-2077.

Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., . . . Ricquier, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochemical Journal, 353*, 441-444.

Rao, S. V. R., Prakash, B., Raju, M., Panda, A. K., Poonam, S., & Murthy, O. K. (2013). Effect of Supplementing Organic Selenium on Performance, Carcass Traits, Oxidative Parameters and Immune Responses in Commercial Broiler Chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 26*(2), 247-252.

Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., de Basilio, V., Gourdine, J. L., & Collier, R. J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal, 6*(5), 707-728.

Ribeiro, A. M. L., Vogt, L. K., Canal, C. W., Lagana, C., & Streck, A. F. (2008). Vitamins and organic minerals supplementation and its effect upon the immunocompetence of broilers submitted to heat stress. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, 37*(4), 636-644.

Rolfe, D. F. S., & Brand, M. D. (1997). The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Bioscience Reports, 17*(1), 9-16.

Rotruck;, J. T., Pope;, A. L., Ganther;, H. E., Swanson;, A. B., Hafeman;, D. G., & Hoekstra, W. G. (1973). Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase.

Sahin, N., Onderci, M., Sahin, K., Gursu, M. F., & Smith, M. O. (2004). Ascorbic acid and melatonin reduce heat-induced performance inhibition and oxidative stress in Japanese quails. *British Poultry Science, 45*(1), 116-122.

Sandercock, D. A., Hunter, R. R., Nute, G. R., Mitchell, M. A., & Hocking, P. M. (2001). Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: Implications for meat quality. *Poultry Science, 80*(4), 418-425.

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine, 30*(11), 1191-1212.

Seven, P. T., Yilmaz, S., Seven, I., Cerci, I. H., Azman, M. A., & Yilmaz, M. (2009). Effects of Propolis on Selected Blood Indicators and Antioxidant Enzyme Activities in Broilers under Heat Stress. *Acta Veterinaria Brno, 78*(1), 75-83.

Shoveller, A. K., Brunton, J. A., Brand, O., Pencharz, P. B., & Ball, R. O. (2006). N-acetylcysteine is a highly available precursor for cysteine in the neonatal piglet receiving parenteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 30*(2), 133-142.

Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem, 274*(35), 24522-24530.

Templar, J., Kon, S. P., Milligan, T. P., Newman, D. J., & Raftery, M. J. (1999). Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrology Dialysis Transplantation, 14*(4), 946-951.

Toue, S., Kodama, R., Amao, M., Kawamata, Y., Kimura, T., & Sakai, R. (2006). Screening of toxicity biomarkers for methionine excess in rats. *Journal of Nutrition, 136*(6), 1716S-1721S.

Turan, B., Balcik, C., & Akkas, N. (1997). Effect of dietary selenium and vitamin E on the biomechanical properties of rabbit bones. *Clin Rheumatol, 16*(5), 441-449.

Ueland, P. M., & Refsum, H. (1989). PLASMA HOMOCYSTEINE, A RISK FACTOR FOR VASCULAR-DISEASE - PLASMA-LEVELS IN HEALTH, DISEASE, AND DRUG-THERAPY. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 114*(5), 473-501.

Ulrey, C. L., Liu, L., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2005). The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet, 14 Spec No 1*, R139-147.

USDA. (2011). The Color of Meat and Poultry.

Vanhoof, J. (1979). INFLUENCE OF ANTE-MORTEM AND PERI-MORTEM FACTORS ON BIOCHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS OF TURKEY BREAST MUSCLE. *Veterinary Quarterly, 1*(1), 29-36.

Wang, R. R., Pan, X. J., & Peng, Z. Q. (2009). Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of pectoralis majors in broilers. *Poultry Science, 88*(5), 1078-1084.

Wang, S. T., Chen, H. W., Sheen, L. Y., & Lii, C. K. (1997). Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione S-transferase isozymes in rat hepatocytes. *J Nutr, 127*(11), 2135-2141.

Wang, Y. X., Zhan, X. A., Zhang, X. W., Wu, R. J., & Yuan, D. (2011). Comparison of Different Forms of Dietary Selenium Supplementation on Growth Performance, Meat Quality, Selenium Deposition, and Antioxidant Property in Broilers. *Biological Trace Element Research, 143*(1), 261-273.

Willemsen, H., Swennen, Q., Everaert, N., Geraert, P. A., Mercier, Y., Stinckens, A., . . . Buyse, J. (2011). Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. *Poult Sci, 90*(10), 2311-2320.

Wu, G. Y., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition, 134*(3), 489-492.

Xu, D., Li, W., Huang, Y., He, J., & Tian, Y. (2014). The effect of selenium and polysaccharide of Atractylodes macrocephala Koidz. (PAMK) on immune response in chicken spleen under heat stress. *Biol Trace Elem Res, 160*(2), 232-237.

Yang, S. F. (1970). SULFOXIDE FORMATION FROM METHIONINE OR ITS SULFIDE ANALOGS DURING AEROBIC OXIDATION OF SULFITE. *Biochemistry, 9*(25), 5008

Yoshida, T. (1996). Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, 678*(2), 157-164.

YR Yang, F. M., P Wang, YB Jiang, QQ Yin, J Chang, RY Zuo, QH Zheng, JX Liu. (2012). Effect of organic and inorganic selenium supplementation on growth performance, meat quality and antioxidant property of broilers.

Zhang, Z. Y., Jia, G. Q., Zuo, J. J., Zhang, Y., Lei, J., Ren, L., & Feng, D. Y. (2012). Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poult Sci, 91*(11), 2931-2937.

Zhou, J., Huang, K. X., & Lei, X. G. (2013). Selenium and diabetes-Evidence from animal studies. *Free Radical Biology and Medicine, 65*, 1548-1556.