

## Inhoudsopgave

Bijlage 2A.1	Toetsing van geselecteerde preparaten; kwaliteitscontrole en <i>in vitro</i> biologische activiteit.....	79
Bijlage 2A.2	Fyto-V: Varkensstudies: Onderzoek naar biomarkers .....	235

**RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid**  
Wageningen Universiteit en Researchcentrum  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Tel: 0317-480256  
Fax: 0317-417717  
Internet: [www.rikilt.wur.nl](http://www.rikilt.wur.nl)





## **Toetsing van geselecteerde preparaten; kwaliteitscontrole en *in vitro* biologische activiteit**

Verslag van de werkzaamheden uitgevoerd in het kader van werkpakket deel 2A van het LNV-project "Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten"

juli 2008

Bart Halkes  
Linda Quarles van Ufford  
Edwin van den Worm  
Kees Beukelman  
Bert van den Berg

(met medewerking van Maria Groot, Harry van Egmond, Toine Bovee, Hans Mol en overige betrokkenen van RIKILT, WageningenUR)

**Phyto** **GeniX**

PhytoGeniX BV / *Medicinal Chemistry and Chemical Biology*, Departement Farmaceutische Wetenschappen, Faculteit Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht  
Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht  
Postbus 80082, 3508 TB Utrecht  
[www.phytogenix.uu.nl](http://www.phytogenix.uu.nl)

Dit onderzoek is uitgevoerd in het kader van het door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” in opdracht van RIKILT, WageningenUR (projectleider Dr M. Groot). Het anti-oxidant onderzoek van producten en voeders is gefinancierd middels een extra bijdrage van het Ministerie van LNV.

## SAMENVATTING

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” is in eerste instantie geïnventariseerd welke kruidenpreparaten en/of veevoederadditieven op kruidenbasis voor de biologische veehouderij beschikbaar zijn. Aan de hand van de inventarisatie zijn drie kruidenproducten geselecteerd die mogelijk kunnen bijdragen aan het verbeteren van de uiergezondheid bij koeien, vier kruidenproducten die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens en vijf kruidenproducten die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) in leghennen. Deze producten zijn onderzocht in respectievelijk een praktijkproef bij koeien met een verhoogd celgetal, praktijkproeven met varkens en een gecontroleerde *challenge*-proef bij jonge leghennen. De resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd.

Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van alle geselecteerde kruidenproducten nader te karakteriseren. De resultaten van de kwalitatieve analyse van het inhoudsstoffenpatroon van de geselecteerde kruidenproducten zoals die is uitgevoerd met dunne-laag chromatografie of spectrometrische technieken, bevestigen de door de producenten/importeurs gedeclareerde samenstelling. Voor acht van de in dit onderzoek betrokken kruidenproducten is door de producenten/importeurs tevens aangetoond dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van deze kruidenproducten vergelijkbaar zijn qua samenstelling. Echter, voor drie van de onderzochte kruidenproducten kan vooralsnog geen uitspraak worden gedaan over de reproduceerbaarheid van het productieproces.

In de met de geselecteerde kruidenproducten verrijkte diervoeders en bijbehorende controle-voeders –zoals die in het kader van werkpakket Deel 2B zijn gebruikt in praktijkproeven bij koeien en varkens en een gecontroleerde *challenge*-proef bij jonge leghennen– zijn geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica aangetroffen. Desondanks is met de gebruikte test-systemen voor verscheidene van de voermonsters aangetoond dat deze toch een remmende werking op bacteriële groei hebben. De antibacteriële eigenschappen van (inhoudsstoffen in) enkele van de kruidenproducten kunnen dit resultaat mogelijk deels verklaren maar het is waarschijnlijk dat componenten in het voer zelf ook bijdragen.

Met behulp van functionele testen voor (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit is aangetoond dat één kruidenproduct oestrogene activiteit bezit en dat enkele andere kruidenproducten een anti-oestrogene en/of anti-androgene werking hebben (respectievelijk drie en negen van de onderzochte kruidenproducten). Hoewel deze functionele testen normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt deze positieve uitslag er in dit geval niet op dat de betreffende kruidenproducten ook daadwerkelijk deze contaminanten bevatten. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit de kruidenproducten zijn bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor de kruidenproducten waargenomen (anti-)oestrogene en/of (anti-)androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met deze producten verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen doseringen van de kruidenproducten zijn zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen

effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

Alle onderzochte kruidenproducten blijken fenolen en/of antioxidanten te bevatten. Bij de doseringen waarin de kruidenproducten volgens instructie van de producent aan het diervoer zijn toegevoegd, wordt echter geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolische verbindingen en/of antioxidanten in het diervoer. Ook bij de twee kruidenproducten die als zodanig aan dieren worden verstrekt, blijkt de inname van fenolen en antioxidanten bij gebruik volgens voorschrift van de producent gering in vergelijking met de totale hoeveelheid fenolische verbindingen en antioxidanten die in het dagelijkse voer aanwezig zijn. Het is dan ook de vraag of de fenolische verbindingen en antioxidanten in de kruidenproducten bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten hiervan.

Twee van de drie kruidenproducten die zijn onderzocht op aan uiergezondheid gerelateerde onderzoeksparameters vertonen activiteit ten aanzien van het functioneren van polymorf-kernige granulocyten (PMN's) en de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*. Deze uitkomsten vormen een verdere onderbouwing voor de veronderstelde positieve effecten van deze twee kruidenproducten op de uiergezondheid. Voor het derde kruidenproduct lijken de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen nadere onderbouwing te geven van de door de producent gedeclareerde effecten op de uiergezondheid. Hieruit mag echter niet worden geconcludeerd dat dit kruidenproduct onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat dit kruidenproduct wel degelijk een gunstige invloed heeft op de uiergezondheid. Het kan daarom niet worden uitgesloten dat de in dit *in vitro* onderzoek gebruikte experimentele methoden (extract-bereiding en/of test-systemen) niet geschikt zijn voor het onderbouwen van de werking van dit kruidenproduct. Dit wordt bevestigd door enkele onderzoeken waaruit blijkt dat een ander werkingsmechanisme ten grondslag ligt aan de positieve beïnvloeding van de uiergezondheid door dit product.

Alle vier de kruidenproducten die zijn onderzocht op aan darmgezondheid bij varkens gerelateerde onderzoeksparameters vertonen activiteit ten aanzien van het functioneren van PMN's en de groei van *Escherichia coli* bacteriën. Deze uitkomsten vormen een verdere onderbouwing voor de veronderstelde positieve effecten van deze kruidenproducten op de darmgezondheid van varkens.

Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van de kruidenproducten op *Eimeria*-soorten niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om enkele droogextracten van deze kruidenproducten nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. De resultaten van dit *in vitro* onderzoek laten zien dat de geteste droogextracten van vier van de vijf kruidenproducten geen antibacteriële activiteit vertonen. Het is echter niet uitgesloten dat de producten als zodanig wel een effect hebben op de groei van *E. coli* en dus van nut kunnen zijn bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Nader onderzoek zal dit echter moeten uitwijzen. Het droogextract van het vijfde kruidenproduct vertoont wel antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen en dit kruidenproduct is dus mogelijk ook van nut bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen.

*Aanbevelingen naar aanleiding van dit onderzoek:*

- Het wordt aanbevolen om aan het punt van reproduceerbaarheid (standaardisatie) van de kruidenproducten in de toekomst extra aandacht te besteden.

- Het wordt aangeraden om de geschiktheid van de gebruikte test-systemen voor het opsporen van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica, veterinair toegepaste antibiotica en/of (synthetische) hormonale residuen nader te onderbouwen. Inhoudsstoffen uit kruiden kunnen (in hoge doseringen) namelijk ook een antibacteriële, (anti-)oestrogene en/of (anti-)androgene activiteit vertonen. Hiermee moet bij de interpretatie van de test-resultaten rekening worden gehouden om vals-positieve uitslagen ten gevolge van de toevoeging van diervoederadditieven op kruidenbasis te voorkomen. Het wordt ook aanbevolen om nader onderzoek te doen naar de identiteit van plantaardige componenten met een antimicrobiële, (anti-) oestrogene en/of (anti-)androgene activiteit omdat dit bij kan dragen aan de validering van de test-systemen.
- Behalve een uitbreiding en verdieping van het in dit rapport beschreven onderzoek naar het mogelijke werkingsmechanisme van het uiergezondheid-bevorderende effect van kruidenproducten, zou de bruikbaarheid van de hiervoor beschikbare *in vitro* testen geëvalueerd moeten worden en zouden –waar nodig– nieuwe, relevantere onderzoeksparameters dienen te worden geïdentificeerd. Daarnaast zou de farmacokinetiek en metabolisatie van de kruidenproducten, en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit, in het lichaam van de koe een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.
- Behalve een uitbreiding en verdieping van het in dit rapport beschreven onderzoek naar het mogelijke werkingsmechanisme van het darmgezondheid-bevorderende effect van kruidenproducten bij varkens, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van de kruidenproducten, en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit, in de darm van het varken een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.
- Omdat de toegepaste *in vitro* test beperkte relevantie lijkt te hebben voor de onderbouwing van de darmgezondheid bij kippen, en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose, wordt het aanbevolen om beter bruikbare onderzoeksparameters te identificeren en de geselecteerde kruidenproducten hierin nader te onderzoeken.

## INHOUDSOPGAVE

1. Algemene inleiding	1
2. Allicin Liquid	5
3. Biomin-PEP1000	19
4. Digestamin 1382	33
5. Digestamin 1383	49
6. Eimericox	66
7. Enteroguard	76
8. Microbioticum	88
9. Natustat	100
10. Ropadiar	111
11. Sel-plex	126
12. Zicomill	137
13. Eindconclusies en aanbevelingen	148



## 1. ALGEMENE INLEIDING

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” is in eerste instantie geïnventariseerd welke kruidenpreparaten en/of veevoederadditieven op kruidenbasis voor de biologische veehouderij beschikbaar zijn. Voor elk van de diersoorten die in de inventarisatie betrokken werden (koeien, varkens en pluimvee), blijken tientallen kruidenpreparaten en/of veevoederadditieven op kruidenbasis verkrijgbaar te zijn [1].

Op basis van de inventarisatie zijn drie kruidenproducten geselecteerd die mogelijk kunnen bijdragen aan het verbeteren van de uiergezondheid bij koeien [2], vier kruidenproducten die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens [3] en vijf kruidenproducten die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) in leghennen [4]. Deze producten zijn onderzocht in respectievelijk een praktijkproef bij koeien met een verhoogd celgetal, praktijkproeven met varkens en een gecontroleerde *challenge*-proef bij jonge leghennen. De resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [5].

Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van alle geselecteerde kruidenproducten nader te karakteriseren.

Met betrekking tot de kwaliteitscontrole is voor alle producten in eerste instantie de samenstelling vastgesteld. Voor de meeste producten is hiertoe het inhoudsstoffenpatroon van de aanwezige plantaardige bestanddelen kwalitatief geanalyseerd met behulp van dunne-laag chromatografie. Voor één product zijn echter spectrometrische analysemethoden (*atomic absorption spectrometry* en massa-spectrometrie) gebruikt om meer specifiek de aanwezigheid van organische seleen-verbindingen aan te tonen en ook het gehalte hiervan te bepalen. Verder zijn alle kruidenproducten en/of de hiermee verrijkte voermonsters zoals die zijn gebruikt in de dierproeven in het kader van werkpakket Deel 2B, gecontroleerd op de aanwezigheid van mogelijke contaminanten, met name antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica, veterinair toegepaste antibiotica en hormonale residuen.

De kruidenproducten en/of voermonsters zijn daarnaast onderzocht op het totaal fenolen-gehalte en op de antioxidant activiteit. Deze bepalingen zijn in tweeërlei opzicht van nut omdat ze informatie verschaffen over zowel de kwalitatieve aspecten van de kruidenproducten en/of voermonsters als ook over de biologische activiteit hiervan. Zo is het totaal fenolen-gehalte enerzijds een maat voor de concentratie aan fenolische verbindingen, waaronder flavonoïden, koffiezuur-derivaten en gecondenseerde of hydrolyseerbare looistoffen. Anderzijds geeft deze parameter inzicht in de nutritionele effecten van de kruidenproducten en/of de hiermee verrijkte voermonsters omdat fenolen vanwege hun eiwit-bindende vermogen de spijsvertering kunnen beïnvloeden. Deze beïnvloeding kan –afhankelijk van de concentratie aan fenolen– positief of negatief van aard zijn. In relatief lage doseringen kunnen fenolen een verbeterde eiwit-utilisatie bewerkstelligen door eiwitten te beschermen tegen overmatige degradatie in de maag waardoor deze meer beschikbaar komen voor vertering in de darm [6,7]. Bij hogere doseringen kan de spijsvertering echter nadelig worden beïnvloed door een verminderde smakelijkheid en verteerbaarheid van het voer, onder meer resulterend in een afname van de melkopbrengst of een vertraging van de groei [6,7]. Om deze reden zijn de kruidenproducten en voermonsters die zijn geselecteerd voor de praktijkproeven bij koeien met een verhoogd celgetal en bij varkens onderzocht op het totaal fenolen-gehalte.

Op vergelijkbare wijze geeft de antioxidant meting niet uitsluitend inzicht in de concentratie aan antioxidatieve verbindingen in de kruidenproducten en voermonsters (kwalitatief aspect). Omdat steeds duidelijker wordt dat antioxidanten in diervoeding van belang zijn voor een optimale ontwikkeling en groei, voor het afweersysteem en de vruchtbaarheid maar ook voor de vleeskwaliteit (zie bijvoorbeeld [8,9,10]), kunnen de uitkomsten van de antioxidant bepalingen eveneens worden gebruikt ter karakterisatie van de potentiële gezondheidseffecten (*i.e.* biologische activiteit) van de kruidenproducten en/of de hiermee verrijkte voermonsters.

In aanvulling op de hierboven genoemde testen zijn de kruidenproducten die zijn geselecteerd voor de praktijkproeven bij koeien met een verhoogd celgetal onderzocht op een mogelijke beïnvloeding van het functioneren van polymorf-kernige granulocyten (PMN's) en op een eventueel effect op de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*. PMN's spelen een belangrijke rol als eerste-lijns afweer tegen bacteriële infecties in de uier. Direct na infectie neemt het aantal PMN's in de uier en in de melk sterk toe [11,12,13,14]. Door fagocytose en de daaropvolgende intracellulaire doding door de productie van reactieve zuurstof-metabolieten worden binnendringende bacteriën bestreden waardoor het verloop van de uierontsteking gunstig kan worden beïnvloed [11,12,15]. Activatie van PMN's en de vorming van reactieve zuurstof-metabolieten bij uier-infecties heeft echter niet alleen positieve effecten. Overmatige of langdurige aanwezigheid van PMN's en de productie van reactieve zuurstof-metabolieten in de uier kunnen ook cellulaire beschadigingen van de melkklier tot gevolg hebben, de melkophbrengst verlagen en de melk-kwaliteit negatief beïnvloeden [14,15,16]. Vanwege deze relatie tussen PMN's, reactieve zuurstof-metabolieten en uiergezondheid is het effect van de kruidenproducten op deze afweerparameter nader bestudeerd. Daarnaast is het effect van de kruidenproducten op de biofilm-formatie door *St. aureus* onderzocht omdat dit proces ook een rol speelt in uiergezondheid, met name bij de ontwikkeling van mastitis [17].

Bij het spenen van jonge biggetjes treden morfologische en functionele veranderingen op in het maag-darm kanaal. In deze levensfase verandert eveneens de immunologische reactiviteit tegen antigenen in de voeding, tegen de commensale microbiële flora maar ook tegen infecties met pathogene bacteriën [18]. Voeder-additieven –al dan niet van plantaardige herkomst– kunnen in de periode van spenen de lokale en systemische immuun-respons moduleren, de darmgezondheid optimaliseren en hierdoor de productiviteit verbeteren [18,19,20]. Zo is er in verschillende onderzoeken een afname gevonden van het aantal perifere PMN's [19,20] die in verband wordt gebracht met een vermindering van de ontstekingsreacties in de darm en/of een verbeterde stress-bestendigheid [20]. Daarnaast zijn PMN's ook in verband gebracht met een directe immuun-respons tegen infecties met pathogene bacteriën; PMN's infiltreren kort na infectie de mucosa van de darm [21,22,23]. Vanwege deze bijdrage van PMN's aan de darmgezondheid en de afweer tegen bacteriële infecties bij gespeende biggen, is in dit project onderzocht wat het effect is van de voor de praktijkproeven bij varkens geselecteerde kruidenproducten op het functioneren van de PMN. In aanvulling hierop zijn de betreffende kruidenproducten tevens getest op hun antimicrobiële werking tegen klinische isolaten van *Escherichia coli* uit varkens omdat deze pathogenen één van de belangrijkste veroorzakers zijn van (speen)diarree bij varkens [23,24,25].

In werkpakket Deel 2B is in een gecontroleerde coccidiose *challenge*-proef bij jonge leghennen onderzocht wat de effecten zijn van vijf met kruidenproducten verrijkte voermonsters op productiviteit en darmgezondheid. Omdat *in vitro* onderzoek naar het directe effect van de geselecteerde kruidenproducten op *Eimeria*-soorten binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten niet mogelijk was, is er voor gekozen om deze kruidenproducten nader te analyseren op eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische

isolaten van *E. coli* uit kippen. Dit in verband met het feit dat *E. coli* de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmettingen kan verhogen [26,27].

In dit verslag worden de resultaten gepresenteerd van deze door PhytoGeniX en RIKILT uitgevoerde laboratoriumproeven. De uitkomsten van dit onderzoek worden in de volgende hoofdstukken per kruidenproduct en/of de hiermee verrijkte voermonsters beschreven.

### **1.1. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM, Fink-Gremmels JH, Groot MJ, Halkes SBA, Kleijer-Ligtenberg G, Puls I. Deelverslag werkpakket 1 project Fyto-V; veelbelovende preparaten, stand van zaken. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 2: uiergezondheid (fytotherapie en celgetal). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 3 Van Asseldonk AGM, Kleijer-Ligtenberg G. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 3: kruidenpreparaten voor varkens, groeibevordering door (darm)gezondheidsbevordering. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 4 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (*coccidiose-challenge*). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 5 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 6 Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 1995;73:1516-28.
- 7 Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2010-37.
- 8 Surai PF. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br. Poultry Sci.* 2000;41:235-43.
- 9 Allison RD, Laven RA. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Vet. Rec.* 2000;147:703-8.
- 10 Wood JD, Enser M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* 1997;78(suppl. 1):S49-60.
- 11 Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 2004;87:4150-62.
- 12 Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2002;7(2):109-21.
- 13 Rivas AL, Quimby FW, Blue J, Coksaygan O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001;13:399-407.
- 14 Kehrlı ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1994;77:619-27.
- 15 Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 2003;34:521-64.
- 16 Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.* 2003;34:629-45.
- 17 Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 2006;171:398-407.

- 18 Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 2007;66:260-8.
- 19 Van der Peet-Schwering CMC, Jansman AJM, Smidt H, Yoon I. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 2007;85:3099-109.
- 20 Davis ME, Maxwell CV, Erf GF, Brown DC, Wistuba TJ. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 2004;82:1882-91.
- 21 Hyland KA, Kohrt L, Vulchanova L, Murtaugh MP. Mucosal innate immune response to intragastric infection by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Mol. Pharmacol.* 2006;43:1890-9.
- 22 Songer JG. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim. Health Res. Rev.* 2004;5(2):321-6.
- 23 Van Beers-Scheurs HMG, Vellenga L, Wensing T, Breukink HJ. The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. *Vet. Q.* 1992;14:29-34.
- 24 Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* 2007;123:145-52.
- 25 Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 2005;6(1):17-39.
- 26 Van der Stroom JH, Van der Sluis W. The effect of intercurrent diseases on coccidiosis. *World Poultry* 1999;15(12 Suppl.):15S-6S.
- 27 Nakamura K, Isobe T, Narita M. Dual infections of *Eimeria tenella* and *Escherichia coli* in chickens. *Res. Vet. Sci.* 1990;49(1):125-6.

## 2. ALLICIN LIQUID

### 2.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn drie kruidenproducten geselecteerd die mogelijk kunnen bijdragen aan het verbeteren van de uiergezondheid bij koeien. Eén van deze producten is Allicin Liquid waarmee melkveehouders in de praktijk positieve ervaringen hebben opgedaan [1]. Allicin Liquid is onderzocht in een praktijkproef bij koeien met een verhoogd celgetal en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Allicin Liquid nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 2.2. Materiaal en methoden

#### 2.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van de in Allicin Liquid aanwezige inhoudsstoffen. Allicin liquid is in eerste instantie onderzocht op de aanwezigheid van allicin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide) omdat het product volgens de producent/importeur een gestabiliseerde en gestandaardiseerde hoeveelheid van de eerst genoemde stof bevat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode [3]. In het kort, Allicin Liquid wordt gemengd met water en vervolgens uitgeschud met dichloormethaan. De dichloormethaan-fractie wordt gedroogd over natriumsulfaat en vervolgens ingedampt. Het residu wordt opgenomen in een geringe hoeveelheid dichloormethaan en geanalyseerd met behulp van DLC (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens).

Daarnaast is de aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren in Allicin Liquid onderzocht omdat dit ook belangrijke inhoudsstoffen in knoflook zijn. Hiertoe is gebruik gemaakt van de in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4]. In het kort, Allicin Liquid wordt gemengd met methanol en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Allicin Liquid (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 2.2.2. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of

extracten op de sterkte van het fluorescentie-signaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [9].

Allicin Liquid is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Allicin Liquid is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Allicin Liquid wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu$ l 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-signaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-signaal wordt gemeten.

### 2.2.3. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [12].

Allicin Liquid is onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe is Allicin Liquid direct verdund met een 3% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [13,14]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [12] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

### 2.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-signaal langzaam dooft [15,16]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-signaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-signaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [15,16].

Allicin Liquid is onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde is Allicin Liquid direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15,16]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde is Allicin Liquid

geëxtraheerd met een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel. Na indampen van de lipofiele fase is het residu opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [17].

#### 2.2.5. *Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metabolieten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsignaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door PMN's [18,19].

Allicin Liquid is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe zijn verdunningsreeksen van Allicin Liquid in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-signaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [20]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van Allicin Liquid gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [21,22].

#### 2.2.6. *Effect op biofilm-formatie door Staphylococcus aureus*

Het effect van een (planten)stof of extract op de vorming van een beschermend kapsel van polysacchariden (biofilm) door bepaalde typen bacteriën kan worden gemeten met behulp van de biofilm-formatie test. Bij deze test wordt de door de bacteriën gevormde biofilm aangekleurd met safranine. De intensiteit van kleuring kan spectrofotometrisch worden bepaald en is een maat voor de hoeveelheid biofilm die is gevormd [23].

Allicin Liquid is onderzocht op eventuele effecten op de biofilm-formatie door de *Staphylococcus aureus* stam BMA/FR/032/0074 [24,25]. Hiertoe zijn verdunningsreeksen van Allicin Liquid in TSBg-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074). De safranine-kleuring is vervolgens uitgevoerd volgens een eerder beschreven protocol [25] waarna de gevormde hoeveelheid biofilm is gekwantificeerd door de absorptie bij 540 nm te meten. Mogelijke beïnvloeding van de bacteriële groei (antimicrobiële activiteit) is bepaald door verdunningsreeksen van Allicin Liquid gedurende 16 uur te incuberen bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [26]. Bacterie-groei is hierbij gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

## 2.3. Resultaten en discussie

### 2.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Allicin Liquid verschillende thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan bevat. In overeenstemming met opgaaf van de producent/importeur blijkt allicin de meest prominente inhoudsstof in Allicin Liquid te zijn (Figuur 2.1., plaat I). Daarnaast zijn in kleinere hoeveelheden andere thiosulfinaten (vage vlekken in het onderste deel (*R<sub>f</sub>*-waarde 0,1-0,4) van het chromatogram) en afbraakproducten hiervan (vage vlekken op de basislijn en in het bovenste deel (*R<sub>f</sub>*-waarde 0,5-1,0) van het chromatogram) aantoonbaar (Figuur 2.1., plaat I) [3]. Behalve verschillende thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan bevat Allicin Liquid ook cysteïne-sulfoxide derivaten of andere zwavelhoudende aminozuren (Figuur 2.1., plaat II; roze-paars gekleurde vlekken in het middelste deel (*R<sub>f</sub>*-waarde 0,45-0,6) van het chromatogram) [4]. De aanwezigheid van de cysteïne-sulfoxide derivaat alliïne kon echter niet onomstotelijk worden aangetoond. Op het chromatogram is ter hoogte van de referentie wel een lichte vlek waargenomen maar de kleur van deze vlek komt niet geheel overeen met deze referentie (Figuur 2.1., plaat II) [4]. De aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten en andere zwavelhoudende aminozuren is in overeenstemming met eerder gepubliceerde beschrijvingen van de inhoudsstoffen in knoflook(extracten) [27,28,29].

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Allicin Liquid (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges. In een van de analyse-certificaten is een gehaltebepaling voor allicin opgenomen waaruit blijkt dat het allicin-gehalte conform de specificaties van de producent/importeur is. Daarnaast bevatten de analyse-certificaten gegevens over de nutritionele waarde van Allicin Liquid (onder meer eiwit-, vet- en suikergehalte maar ook het gehalte van verschillende vitaminen en mineralen) en wordt aangetoond dat potentiële verontreinigingen (waaronder verschillende pathogene micro-organismen en zware metalen) afwezig zijn.

### 2.3.2. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Allicin Liquid lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 2.1. en Figuren 2.2. en 2.3.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [10,11,30,31], bevat Allicin Liquid wel duidelijk componenten die het signaal van 17 $\beta$ -estradiol in de OGT-test verlagen/onderdrukken en componenten die het signaal van 17 $\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 2.1. en Figuren 2.2. en 2.3.). Deze bevindingen maken duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit van Allicin Liquid wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de OGT- en AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Allicin Liquid met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Wellicht kan ook nog een eerder voor inhoudsstoffen uit knoflook gerapporteerde verhoging van de testosteron-afbraak –leidend tot testosteron-metabolieten die niet meer in staat zijn tot activatie van de androgeen-receptor– de gevonden resultaten (deels) verklaren [32]. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende activiteit van Allicin Liquid mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met oestrogeen- en androgeen-antagonerende activiteit kunnen de uitslagen van de bepaling op de aanwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed. Dit vermoeden wordt bevestigd



door reeds eerder in de literatuur gerapporteerde effecten van (inhaltsstoffen uit) knoflook op het oestrogene- en/of androgene-metabolisme die in tegenspraak lijken te zijn met de huidige resultaten [33,34].

### 2.3.3. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Allicin Liquid staat weergegeven in Tabel 2.1.. Hoewel de gevonden waarde overeenkomt met eerder in de literatuur gerapporteerde totaal fenol-gehalten voor knoflook [35], dient bij de interpretatie van deze gegevens de nodige voorzichtigheid te worden betracht omdat niet-fenolische inhoudsstoffen uit knoflook mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test.

Op basis van het voor Allicin Liquid gemeten totale fenolen-gehalte kan worden berekend dat in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal per dag maximaal 44,8 mg fenolische verbindingen extra wordt toegediend aan de dieren in de met Allicin Liquid behandelde groep (bij gebruik van tweemaal daags 60 ml Allicin Liquid conform het onderzoeksprotocol). In vergelijking met de normale dagelijkse inname van fenolische verbindingen uit het voer (alleen al voor voederbrokken geschat op ruim 10 g/kg) is deze additionele bron van fenolen verwaarloosbaar klein; dit zal dan ook geen consequenties hebben voor de totale nutritionele waarde van het koeivoer.

De antioxidant capaciteit van Allicin Liquid –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 2.1.. In tegenstelling tot eerder voor knoflook gepubliceerde literatuurgegevens [35] is de antioxidant capaciteit van Allicin Liquid hoger in de lipofiele fractie dan in de hydrofiele fractie. Dit verschil wordt mogelijk veroorzaakt door de specifieke bereidingswijze van Allicin Liquid waarin met name de lipofielere thiosulfinaten (onder andere allicin) en allylsulfiden aanwezig zijn (zie ook de paragraaf *kwalitatieve analyse*). Op basis van de uitgevoerde experimenten kan echter niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de antioxidant capaciteit van Allicin Liquid kunnen verklaren. Het is wel aannemelijk dat de fenolische verbindingen in Allicin Liquid, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan deze werking [13,14]. Op basis van literatuurgegevens kan worden verondersteld dat ook verschillende zwavelhoudende verbindingen uit knoflook zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [36,37,38].

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van diervoeders en voer-supplementen zijn beschreven in de literatuur [39], ontbreekt het vooralsnog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Allicin Liquid in dit opzicht in perspectief te plaatsen. Het is echter wel duidelijk dat de antioxidant capaciteit van Allicin Liquid in vergelijking met de normale dagelijkse inname van antioxidanten via het voer gering is. Zo komt de in de praktijk-proef bij koeien gebruikte dosering van Allicin Liquid overeen met ongeveer 0,7 mmol Trolox-equivalenten (= ORAC<sub>totaal</sub>; bij gebruik van tweemaal daags 60 ml Allicin Liquid, conform het onderzoeksprotocol) terwijl de totale antioxidant capaciteit van voederbrokken alleen al wordt geschat op ruim 150 mmol Trolox-equivalenten per kilogram.

### 2.3.4. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

In de concentratie-reeks die is getest, laat Allicin Liquid geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Allicin Liquid vertoont wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuur 2.4.). De IC50-waarde van Allicin Liquid (de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-sig-

50% wordt geremd) is in deze test  $2,0 \pm 0,3$   $\mu\text{l/ml}$  (gemiddelde  $\pm$  SD;  $n = 3$  experimenten). De remming van het chemiluminescentie-sigitaal is niet toe te schrijven aan een toxische werking van Allicin Liquid op de PMN's omdat de omzetting van resazurine niet negatief wordt beïnvloed en de metabole activiteit van deze cellen dus intact is (Figuur 2.4.).

Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-sigitaal daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN. Literatuurgegevens doen vermoeden dat knoflook-bevattende extracten/preparaten inderdaad deze werking kunnen hebben [40]. Op basis van andere literatuurgegevens [41,42] maar ook de hier gerapporteerde antioxidatieve capaciteit van Allicin Liquid, kan echter niet worden uitgesloten dat de remming van het chemiluminescentie-sigitaal het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapoleerbaar zijn naar PMN's van de koe.

Nader onderzoek moet ook duidelijk maken of het hier waargenomen effect op het functioneren van de PMN relevant is in verband met de voor Allicin Liquid gedeclareerde positieve beïnvloeding van de uiergezondheid. PMN's behoren namelijk tot de eerste-lijns afweer tegen in de uier binnendringende bacteriën door deze te fagocyteren en te doden met behulp van, onder meer, reactieve zuurstof-metabolieten [43,44,45]. Remming van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten of het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten door Allicin Liquid, lijkt in dit verband dan ook negatieve gevolgen te kunnen hebben voor deze afweer-respons. Daarentegen is overmatige of langdurige productie van reactieve zuurstof-metabolieten in de uier gerelateerd aan cellulair beschadigingen van de melkklier, een verlaging van de melkproductie en verslechtering van de melk-kwaliteit [45,46,47]. In dit opzicht kan de voor Allicin Liquid gevonden activiteit dan weer wel een positieve uitwerking hebben op de uier. Met name ook omdat een verminderd vrijkomen van reactieve zuurstof-metabolieten in het klierweefsel en de melk de behoefte aan endogene en exogene antioxidanten verlaagt. Dit heeft weer een gunstige uitwerking op de antioxidant-status in de uier en hiermee op de uiergezondheid [48,49].

#### 2.3.5. Effect op biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*

Allicin Liquid lijkt een dosis-afhankelijke remming van de biofilm-formatie door *St. aureus* te geven (Figuur 2.5.). Nader onderzoek moet echter uitwijzen of Allicin Liquid daadwerkelijk de vorming van een biofilm vertraagt of dat het gevonden effect eerder is toe te schrijven aan een directe antibacteriële activiteit, met name omdat Allicin Liquid in een vergelijkbaar doseringsbereik ook een duidelijke inhibitie van de bacteriële groei van *St. aureus* laat zien (Figuur 2.6.). Deze resultaten zijn in overeenstemming met door de producent/importeur aangeleverde gegevens alsmede publicaties waarin voor knoflook (of inhoudsstoffen hieruit) al eerder een antimicrobiële activiteit tegen *St. aureus* is beschreven [50,51,52]. In eerdere instantie is eveneens al melding gemaakt van een mogelijke remming van de biofilm-formatie door knoflookextracten [53].

#### 2.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Allicin Liquid. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Allicin Liquid vergelijkbaar zijn.
- Allicin Liquid laat een anti-oestrogene en anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op

dat Allicin Liquid ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstof waaruit Allicin Liquid is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Allicin Liquid waargenomen anti-oestrogene en anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die dit product toegediend krijgen; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

- Allicin Liquid bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Allicin Liquid is echter de vraag omdat de hoeveelheid fenolen en antioxidanten in Allicin Liquid –in vergelijking met de inname via het diervoer– gering is.

- Allicin Liquid vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).

- Allicin Liquid vertoont een dosis-afhankelijke remming van de biofilm-formatie door *St. aureus*. Nader onderzoek moet uitwijzen of Allicin Liquid daadwerkelijk de vorming van biofilms vertraagt of dat het gevonden effect is gerelateerd aan de antibacteriële werking van Allicin Liquid.

- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Allicin Liquid op de uiergezondheid, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Allicin Liquid en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in het lichaam van de koe daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.

## **2.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr M. Melchior en Prof. Dr J. Fink-Gremmels van de afdeling Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *St. aureus* stam BMA/FR/032/0074.

## **2.6. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 2: uiergezondheid (fytotherapie en celgetal). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.

- 3 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):291-303.
- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Garlic powder, allii sativi bulbi pulvis* (01/2008:1216).
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 13 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric.Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 14 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric.Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 15 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 17 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 18 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
- 19 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.

- 20 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
- 21 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 22 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
- 23 Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988;7(1):30-3.
- 24 Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B* 2006;53:326-32.
- 25 Hensen SM. Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis, bacterial adhesion and invasion in relation to pathogenesis and antimicrobial sensitivity. Proefschrift Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht; 2000.
- 26 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 27 Wereld Gezondheids Organisatie. Monografie: *Bulbus allii sativi*. In: WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva; 1999 (deel 1):16-32.
- 28 Brace LD. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L). *J. Cardiovasc. Nurs.* 2002;16(4):33-49.
- 29 Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 2006;136:716S-25S.
- 30 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
- 31 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
- 32 Pinto JT, Qiao C, Xing J, Suffoletto BP, Schubert KB, Rivlin RS, Huryk RF, Bacich DJ, Heston WDW. Alterations of prostate biomarker expression and testosterone utilization in human LNCaP prostatic carcinoma cells by garlic-derived S-allylmercaptocysteine. *Prostate* 2000;45:304-14.
- 33 Al-Bekairi AM, Shah AH, Qureshi S. Effects of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol-treated mice and general toxicity. *J. Ethnopharmacol.* 1990;29:117-25.
- 34 Mukherjee M, Das AS, Das D, Mukherjee S, Mitra S, Mitra C. Role of peritoneal macrophages and lymphocytes in the development of hypogonadal osteoporosis in an ovariectomized rat model: possible phytoestrogenic efficacy of oil extract of garlic to preserve skeletal health. *Phytother. Res.* 2007;21:1045-54.
- 35 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 36 Okada Y, Tanaka K, Fujita I, Sato E, Okajima H. Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. *Redox Rep.* 2005;10(2):96-102.

- 37 Okada Y, Tanaka K, Sato E, Okajima H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. *Org. Biomol. Chem.* 2006;4(22):4113-7.
- 38 Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food.* 2006;9(2):205-13.
- 39 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
- 40 Sankaranarayanan A, Narender T, Kumar S, Dikshit M. *Allium sativum* constituents: effect on free radical generation from rat neutrophils. *Cell. Mol. Biol.* 2007;53(5):63-7.
- 41 Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Zúñiga-Bustos A, Orozco-Ibarra M. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci.* 2006;78(7):761-70.
- 42 Pedraza-Chaverri J, Arriaga-Noblecia G, Medina-Campos ON. Hypochlorous acid scavenging capacity of garlic. *Phytother. Res.* 2007;21:884-8.
- 43 Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 2004;87:4150-62.
- 44 Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2002;7(2):109-21.
- 45 Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 2003;34:521-64.
- 46 Kehrlí ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1994;77:619-27.
- 47 Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.* 2003;34:629-45.
- 48 Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 1997;75:1659-65.
- 49 Erskine RJ. Nutrition and mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1993;9(3):551-61.
- 50 Cutler RR, Wilson P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Biomed. Sci.* 2004;61(2):71-4.
- 51 Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62(11):4238-42.
- 52 Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Phytother. Res.* 2005;19(4):327-34.
- 53 Shuford JA, Steckelberg JM, Patel R. Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(1):473.

**Tabel 2.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Allicin Liquid.

<b>Allicin Liquid</b>		
Totaal fenolen-gehalte		373,2 ± 48,3 µg GZE/ml <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	3,9 ± 0,3 µmol TE/ml <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	7,9 ± 0,2 µmol TE/ml <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	11,8 µmol TE/ml <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>e</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>f</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = galluszuur-equivalenten.

<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

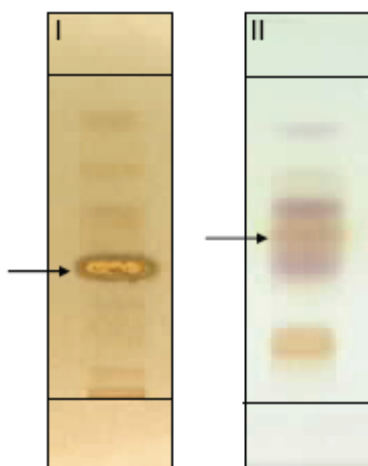
<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiele)} + ORAC_{(lipofiele)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

<sup>d</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 33 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

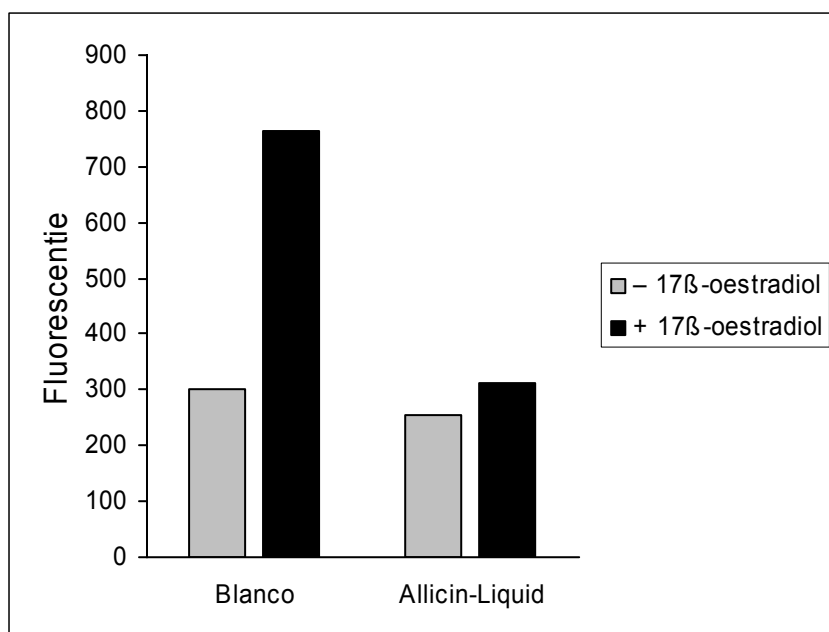
<sup>e</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 33 mg product.

<sup>f</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

<sup>g</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product.

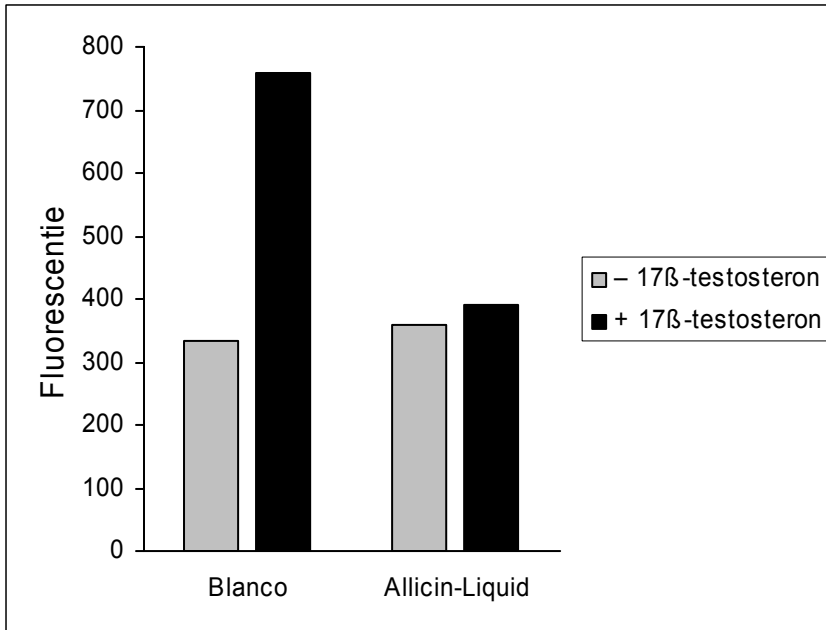


**Figuur 2.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Allicin Liquid aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van alliin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide): Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met alliin. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliin) en andere zwavelhoudende aminozuren: Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met alliin.

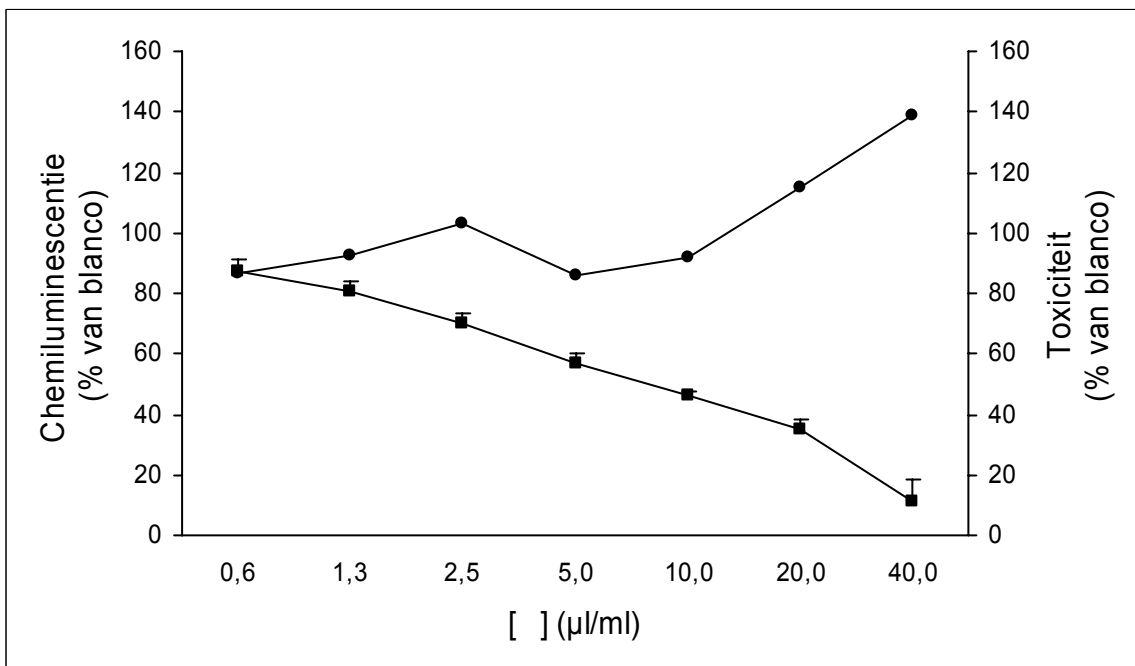


**Figuur 2.2.:** Oestrogeen-antagonerende activiteit van Allicin Liquid.

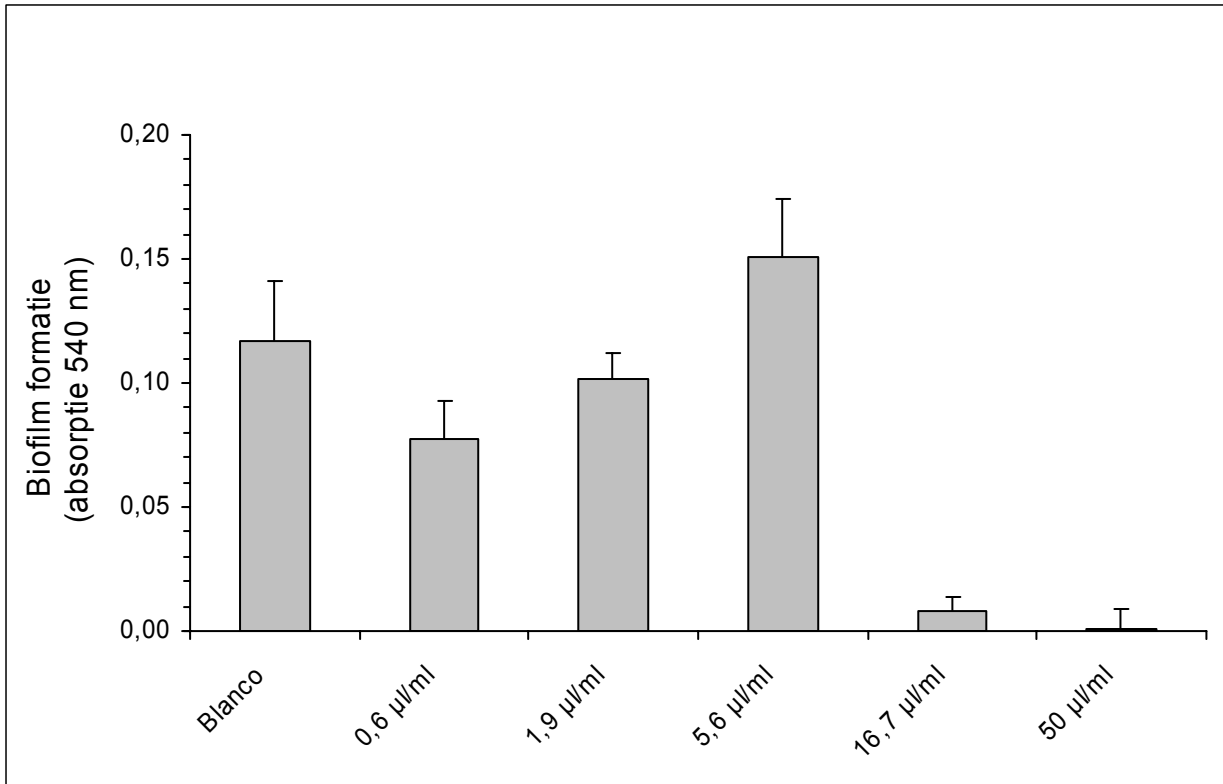




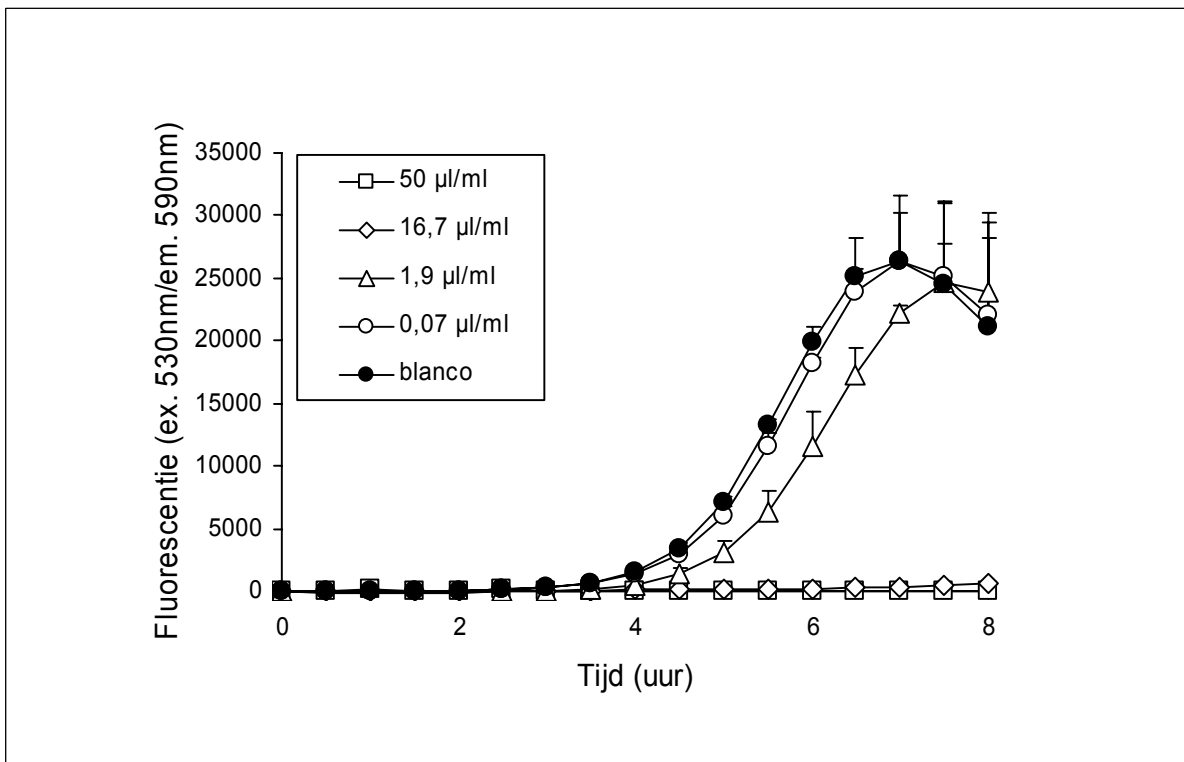
**Figuur 2.3.:** Androgeen-antagonerende activiteit van Allicin Liquid.



**Figuur 2.4.:** Effect van Allicin Liquid op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 2.5.:** Effect van Allicin Liquid op de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*.



**Figuur 2.6.:** Effect van Allicin Liquid op de bacteriële groei van *Staphylococcus aureus* (antimicrobiële activiteit).

### 3. BIOMIN-PEP1000

#### 3.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vier kruidenproducten geselecteerd die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens. Eén van deze producten is Biomin-PEP1000 waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het de voederopname en/of voederconversie en/of opbrengst gunstig beïnvloedt [1]. Biomin-PEP1000 is in een praktijkcentrum voor de biologische varkenshouderij en bij een biologische varkenshouder onderzocht op de effecten op groei, gezondheid en slachtparameters bij varkens en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Biomin-PEP1000 nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

#### 3.2. Materiaal en methoden

##### 3.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Biomin-PEP1000 aanwezige inhoudsstoffen. Biomin-PEP1000 is onderzocht op de aanwezigheid van thymol en carvacrol, twee van de belangrijkste componenten in één van de vluchtige oliën waaruit dit product volgens opgave van de producent bestaat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [3]. In het kort, Biomin-PEP1000 wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Biomin-PEP1000 (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

##### 3.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder

in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 3.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [4,5,6,7]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) [8].

Biomin-PEP1000 is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Biomin-PEP1000 is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [9,10]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Biomin-PEP1000 wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en  $\text{NH}_2$ -kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu\text{l}$  4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

### 3.2.4. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd

dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [11].

Biomin-PEP1000, het Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe zijn Biomin-PEP1000, het Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer opgenomen in een 1,5% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol/water (1/1 v/v) en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [12,13]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [11] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

### 3.2.5. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [14,15]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [14,15].

Biomin-PEP1000, het Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [16]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [17]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [14,15].

### 3.2.6. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metaboliëten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsigitaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door PMN's [18,19].

Biomin-PEP1000 is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Biomin-PEP1000 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met dichloormethaan waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdampster weer is afgedampt. Van dit dichloormethaan-droogextract zijn verdunningsreeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum

gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-sigitaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [20]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van het dichloormethaan-droogextract van Biomin-PEP1000 gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [21,22].

### 3.2.7. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [23].

Biomin-PEP1000 is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (K88<sup>+</sup>, collectienummer 295) uit varkens. Hiertoe is Biomin-PEP1000 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met dichloormethaan waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdamp(er)er is afgedampt. Van dit dichloormethaan-droogextract zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [23]. Bacterie-groei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

## 3.3. Resultaten en discussie

### 3.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Biomin-PEP1000 thymol en carvacrol bevat (Figuur 3.1.). Deze vluchtige olie componenten geven een karakteristieke roze verkleuring na reactie met het vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens net onder het midden van het chromatogram (R<sub>f</sub>-waarde 0,4-0,45) [3]. Naast deze twee verbindingen zijn in het chromatogram ook andere vluchtige olie componenten aantoonbaar (Figuur 3.1.). De aanwezigheid van met name thymol en carvacrol, alsmede de onderlinge verhouding tussen deze twee componenten, bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Biomin-PEP1000 (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van drie verschillende product-charges. Uit deze analyse-certificaten blijkt het gehalte aan carvacrol –één van de componenten in de vluchtige oliën waaruit dit product bestaat– binnen nauwe grenzen constant te zijn. Daarnaast bevatten de analyse-certificaten ook enkele gegevens over de nutritionele waarde van Biomin-PEP1000 (onder meer het ruwe eiwitgehalte en een kwantificering van de hoeveelheid fructo-oligosacchariden).

### 3.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Ondanks de

afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen enkele van de met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoeren (baby-biggen korrel en eindvoer) en voermonsters die dienen als controle (baby-biggen korrel en eindvoer) wel remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Mogelijk worden deze resultaten deels verklaard door in Biomin-PEP1000 aanwezige stoffen met antibacteriële activiteit (zie hieronder). Echter, omdat het remmende effect ook in voermonsters wordt gevonden waaraan geen Biomin-PEP1000 is toegevoegd, is het waarschijnlijk dat de groei-remming tevens wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf.

### 3.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Biomin-PEP1000 lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 3.1. en Figuren 3.2. en 3.3.). Biomin-PEP1000 lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 3.1. en Figuur 3.2.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [9,10,24,25], bevat Biomin-PEP1000 wel duidelijk componenten die het signaal van 17 $\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 3.1. en Figuur 3.3.). Deze bevinding is in overeenstemming met literatuurgegevens waarin aan thymol, één van de inhoudsstoffen in Biomin-PEP1000, een anti-androgene werking wordt toegeschreven [26]. Deze resultaten maken tevens duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Biomin-PEP1000 wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Biomin-PEP1000 met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Biomin-PEP1000 mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

### 3.3.4. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Biomin-PEP1000 staat weergegeven in Tabel 3.1.. Het totaal fenolen-gehalte van het varkensvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totaal fenolen-gehalte gemeten van  $9,8 \pm 3,4$  mg galluszuur-equivalenten (GZE) per gram. In het met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer is een totaal fenolen-gehalte van  $7,5 \pm 2,1$  mg GZE/g gevonden. Dit verschil in totaal fenolen-gehalte tussen beide varkensvoeren is echter niet-significant en waarschijnlijk te wijten aan inhomogeniteit van de onderzochte voermonsters en/of de monsternamen en/of spreiding in de gebruikte bepalingsmethode.

De antioxidant capaciteit van Biomin-PEP1000 –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 3.1.. De antioxidant capaciteit van Biomin-PEP1000 is hoger in de lipofiele fractie dan in de hydrofiele fractie. Dit verschil in antioxidant capaciteit kan worden verklaard door de aanwezigheid van vooral lipofiele bestanddelen in de vluchtige olie van *Origanum vulgare*, één van de bestanddelen van Biomin-PEP1000 (zie ook de paragraaf *kwalitatieve analyse*). De gevonden antioxidant capaciteit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen [27,28]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Biomin-

PEP1000 kunnen verklaren. Het is echter aannemelijk dat de fenolische componenten uit de vluchtige olie –vooral carvacrol en thymol– in Biomin-PEP1000, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [27,28].

De antioxidant capaciteit van het varkensvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 114,8  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 59,6 \pm 5,9 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 55,2 \pm 2,5 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer is een totale antioxidant capaciteit van 75,6  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 55,8 \pm 1,8 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 19,8 \pm 0,8 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). Deze verlaging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Biomin-PEP1000 aan het varkensvoer; bij suppletie van 0,5 g Biomin-PEP1000 per kilogram varkensvoer (conform onderzoeksprotocol) kan namelijk juist een geringe toename van  $5,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol TE/g}$  worden berekend. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat de oorzaak is van deze verlaging van de antioxidant capaciteit in het met Biomin-PEP1000 verrijkte varkensvoer. Mogelijk is dit verschil echter te wijten aan (geringe) verschillen in de samenstelling van de geteste voermonsters. Deze suggestie wordt versterkt door de eveneens waargenomen variatie in totaal fenolen-gehalte van de voermonsters.

### *3.3.5. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

In de concentratie-reeks die is getest, laat Biomin-PEP1000 geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Biomin-PEP1000 vertoont wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuur 3.4.). De IC50-waarde van Biomin-PEP1000 (de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-sigitaal 50% wordt geremd) is in deze test  $345 \pm 39 \mu\text{g/ml}$  (gemiddelde  $\pm$  SD;  $n = 3$  experimenten). De remming van het chemiluminescentie-sigitaal is niet toe te schrijven aan een toxische werking van Biomin-PEP1000 op de PMN's omdat de omzetting van resazurine niet negatief wordt beïnvloed en de metabole activiteit van deze cellen dus intact is (Figuur 3.4.). Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-sigitaal daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN. Literatuurgegevens doen vermoeden dat enkele van de bestanddelen in de vluchtige oliën waar Biomin-PEP1000 uit bestaat inderdaad deze werking kunnen hebben [29,30]. Op basis van andere literatuurgegevens [29,31] maar ook de hier gerapporteerde antioxidatieve capaciteit van Biomin-PEP1000, kan echter niet worden uitgesloten dat de remming van het chemiluminescentie-sigitaal het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapoleerbaar zijn naar PMN's van het varken.

Het hier waargenomen effect van Biomin-PEP1000 op het functioneren van de PMN kan mogelijk de gedeclareerde positieve beïnvloeding van de darmgezondheid verder onderbouwen. Het wordt namelijk algemeen aangenomen dat langdurige of overmatige activatie van PMN's en/of productie van reactieve zuurstof-metabolieten weefselbeschadiging kan veroorzaken, onder meer door lipiden-peroxidatie (leidend tot schade aan de celmembraan) en door afbraak van collageen en andere biologische macromoleculen [32,33,34]. Hoewel een dergelijke negatief effect van de PMN op het darm-epitheel van gespeende biggen –voor zover bekend– nog niet is beschreven, kan worden verondersteld dat de kans hierop, juist in een periode dat er veel veranderingen plaats vinden



in het voedingspatroon, de mucosale afweerreactie en de lokale bacteriële flora, groot is. Om deze hypothese verder te bewijzen, is echter aanvullend onderzoek nodig.

### 3.3.6. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Biomin-PEP1000 vertoont een dosis-afhankelijke antimicrobiële werking tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) uit het varken (Figuur 3.5.). Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere publicaties waarin voor enkele van de vluchtige oliën (of inhoudsstoffen hieruit) in Biomin-PEP1000 ook een antimicrobiële activiteit tegen *E. coli* is beschreven [23,27,35]. De waargenomen daling in het fluorescentie-sigitaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metabool (hydroresorufine) [21].

### 3.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Biomin-PEP1000. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Biomin-PEP1000 vergelijkbaar zijn.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Biomin-PEP1000 verrijkt varkensvoer en het bijbehorende controle-voer, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. De antibacteriële eigenschappen van Biomin-PEP1000 kunnen dit resultaat mogelijk deels verklaren maar het is waarschijnlijk dat een of meerdere component(en) in het voer zelf ook bijdragen.
- Biomin-PEP1000 laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Biomin-PEP1000 ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Biomin-PEP1000 is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Biomin-PEP1000 waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Biomin-PEP1000 verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).
- Biomin-PEP1000 bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Biomin-PEP1000 is echter de vraag. Bij de dosering waarin Biomin-PEP1000 volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolen en antioxidanten in het diervoer.
- Biomin-PEP1000 vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).

- Biomin-PEP1000 vertoont een dosis-afhankelijke remming van de bacteriële groei van klinische isolaten van *E. coli* uit het varken.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Biomin-PEP1000 op de darmgezondheid van varkens, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Biomin-PEP1000 en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in de darm van het varken daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.

### 3.5. Dankbetuiging

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinaire toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit het varken.

### 3.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM, Kleijer-Ligtenberg G. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 3: kruidenpreparaten voor varkens, groeibevordering door (darm)gezondheidsbevordering. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Thyme, thymi herba* (01/2008:0865).
- 4 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 7 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 8 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.

- 9 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 10 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 11 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 12 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric.Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 13 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric.Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 14 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 15 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 16 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 17 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 18 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
- 19 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
- 20 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
- 21 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 22 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
- 23 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 24 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
- 25 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis

- data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
- 26 Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007;221:278-84.
  - 27 Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:1822-8.
  - 28 Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2007;58(2):87-93.
  - 29 Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 2006;76(2):61-8.
  - 30 Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Tagaki N. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res.* 1986;65(1):53-6.
  - 31 Kruk I, Michalska T, Lichszteld K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 2000;41(7):1059-64.
  - 32 Dalleghi F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 1997;46:382-91.
  - 33 Leff JA, Repine JE. Neutrophil-mediated tissue injury. In: *The neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (red.) Oxford University Press, Oxford, 1993: 229-62.
  - 34 Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 1989;320(6):365-76.
  - 35 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86(6):985-90.

**Tabel 3.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Biomin-PEP1000.

<b>Biomin-PEP1000</b>		
Totaal fenolen-gehalte		20,1 ± 3,8 mg GZE/g <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	90,7 ± 6,9 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	114,0 ± 8,5 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	204,7 µmol TE/g <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten. Omdat niet-fenolische inhoudsstoffen in Biomin-PEP1000 mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zo het gemeten totaal fenolen-gehalte kunnen beïnvloeden, dient het gemeten totaal fenolen-gehalte met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

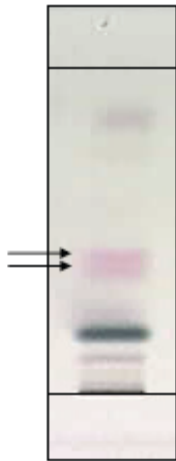
<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

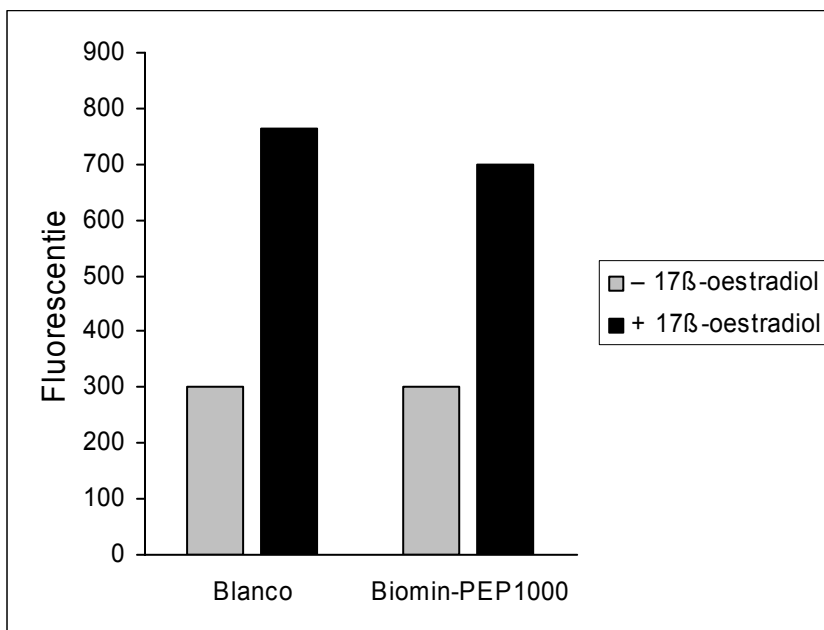
<sup>d</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 1 mg product.

<sup>e</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

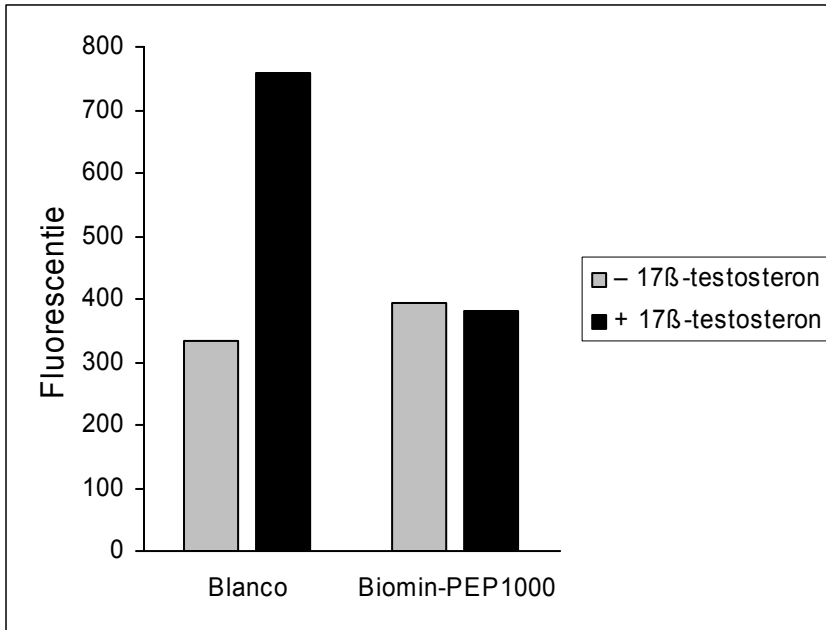
<sup>f</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



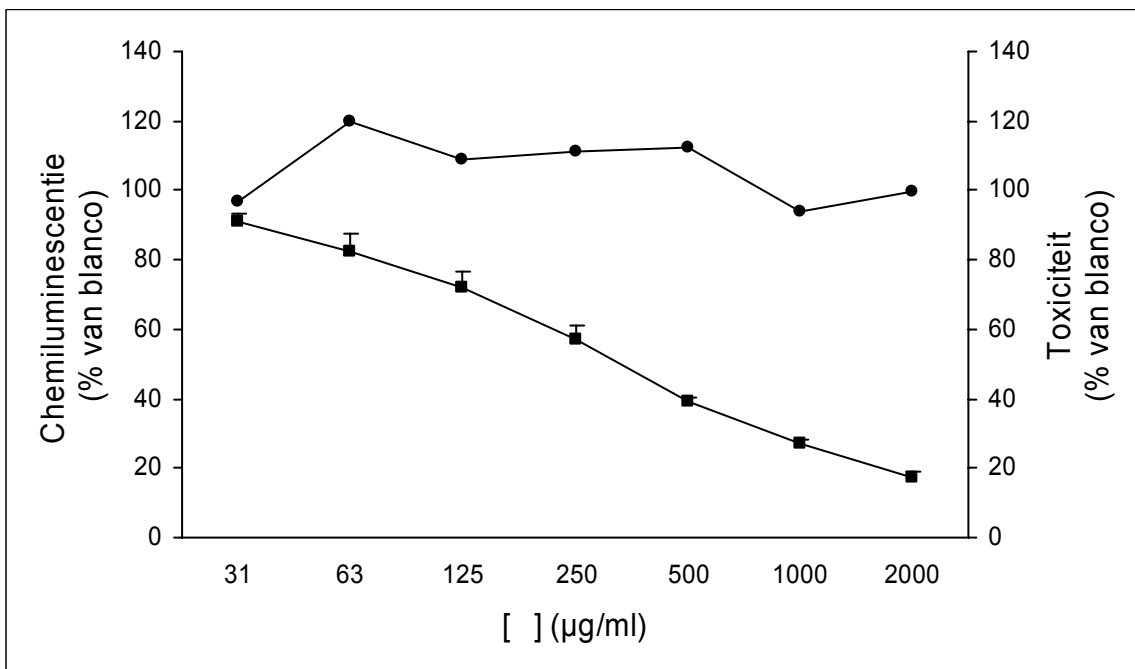
**Figuur 3.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Biomin-PEP1000 aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). Met het gebruikte DLC-systeem kunnen componenten uit vluchtige oliën worden aangetoond: Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. De pijlen geven de vlekken aan die corresponderen met thymol (boven) en carvacrol (onder).



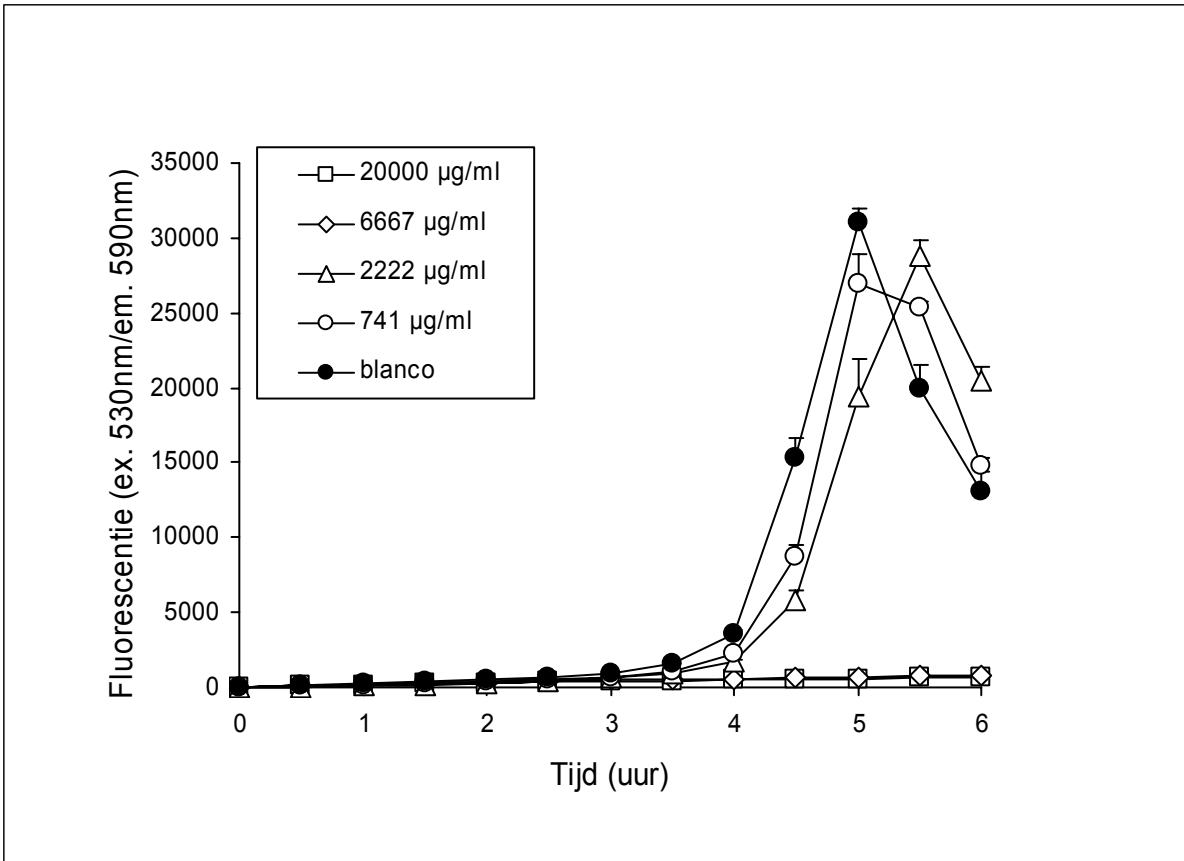
**Figuur 3.2.:** Het effect van Biomin-PEP1000 in de RIKILT oestrogene gist test.



**Figuur 3.3.:** Androgeen-antagonerende activiteit van Biomin-PEP1000.



**Figuur 3.4.:** Effect van Biomin-PEP1000 op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 3.5.:** Effect van Biomin-PEP1000 op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



## 4. DIGESTAMIN 1382

### 4.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vier kruidenproducten geselecteerd die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens. Eén van deze producten is Digestamin 1382 waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het de voederopname en/of voederconversie en/of opbrengst gunstig beïnvloedt [1]. Digestamin 1382 is in een praktijkcentrum voor de biologische varkenshouderij en bij een biologische varkenshouder onderzocht op de effecten op groei, gezondheid en slachtparameters bij varkens en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Digestamin 1382 nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 4.2. Materiaal en methoden

#### 4.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Digestamin 1382 aanwezige inhoudsstoffen. Digestamin 1382 is in eerste instantie onderzocht op de aanwezigheid van thymol en carvacrol, twee van de belangrijkste componenten in één van de vluchtige oliën waaruit dit product volgens opgaaf van de producent/importeur bestaat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [3]. In het kort, Digestamin 1382 wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens). Hetzelfde supernatant is daarnaast onderzocht met een algemeen protocol voor de analyse van (andere) bestanddelen uit vluchtige oliën (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens) [4].

Digestamin 1382 is verder onderzocht op de aanwezigheid van voor knoflook karakteristieke inhoudsstoffen omdat het product volgens de producent/importeur ook deze plant bevat. Hiertoe is enerzijds gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode voor de kwalitatieve analyse van allicin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide) [5]. In het kort, Digestamin 1382 wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens). Anderzijds is de aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren in Digestamin 1382 onderzocht omdat dit ook belangrijke inhoudsstoffen in knoflook zijn. Hiertoe is gebruik gemaakt van de in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [6]. In het kort, Digestamin 1382 wordt gemengd met methanol en gedurende 1 min geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens).

Digestamin 1382 is tenslotte onderzocht op de aanwezigheid van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen omdat het product volgens de producent/importeur ook een mengsel van (niet altijd nader gespecificeerde) kruiden en extracten bevat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode [7]. In het kort, Digestamin 1382 wordt gemengd met ethanol en gedurende 10 min geëxtraheerd bij 90 °C en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Digestamin 1382 (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 4.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Digestamin 1382 verrijkte varkensvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijkproeven bij varkens zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

#### 4.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [8,9,10,11]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van

stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [12].

Digestamin 1382 is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Digestamin 1382 is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [13,14]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Digestamin 1382 wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu$ l 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 4.2.4. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [15].

Digestamin 1382, het Digestamin 1382 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe zijn Digestamin 1382, het Digestamin 1382 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer opgenomen in een 1,5% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol/water (1/1 v/v) en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [16,17]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [15] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

#### 4.2.5. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïn geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïn waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [18,19]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [18,19].

Digestamin 1382, het Digestamin 1382 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens

een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [20]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [21]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [18,19].

#### 4.2.6. *Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metabolieten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsignaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door PMN's [22,23].

Digestamin 1382 is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Digestamin 1382 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens dichloormethaan en ethanol. Deze oplosmiddelen zijn onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer afgedampt en het residu van het ethanol-extract is ook nog gevriesdroogd. Van deze dichloormethaan- en ethanol-droogextracten zijn verdunningsreeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-signaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [24]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van het dichloormethaan- en het ethanol-droogextract van Digestamin 1382 gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [25,26]. Daarnaast is de hoogste concentratie van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 ook nog gedurende 30 min geïncubeerd met PMN's die vooraf waren beladen met carboxyfluoresceïne-diacetaat. Carboxyfluoresceïne-diacetaat kleurt levende cellen groen [27] waardoor deze gemakkelijk kunnen worden onderscheiden van met propidium-jodide rood gekleurde dode cellen [28].

#### 4.2.7. *Antimicrobiële activiteit ten opzichte van Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-signaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [29].

Digestamin-1382 is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (K88<sup>+</sup>, collectienummer 295) uit varkens. Hiertoe is Digestamin 1382 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens dichloormethaan en ethanol. Deze oplosmiddelen zijn onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer afgedampt en het residu van het ethanol-extract is ook nog

gevriesdroogd. Van deze dichloormethaan- en ethanol-droogextracten zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [29]. Bacterie-groei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 4.3. Resultaten en discussie

#### 4.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Digestamin 1382 thymol bevat (Figuur 4.1., plaat I en II). Deze vluchtige olie component geeft een karakteristieke roze verkleuring na reactie met het vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens net onder of op het midden van de chromatogrammen (R<sub>f</sub>-waarde 0,4-0,45 (plaat I) of 0,5 (plaat II)) [3,4]. Naast deze verbinding zijn in het chromatogram ook andere vluchtige olie componenten aantoonbaar (Figuur 4.1., plaat I en II). Met behulp van twee andere DLC-systemen is aangetoond dat in Digestamin 1382 diallyl-sulfide of andere lipofiele zwavelverbindingen aanwezig zijn (Figuur 4.1., plaat III; de bruine vlek in het bovenste deel (R<sub>f</sub>-waarde 0,8-0,9) [5] van het chromatogram) maar geen andere voor knoflook karakteristieke inhoudsstoffen zoals thiosulfinaten, cysteïne-sulfoxide derivaten of andere zwavelhoudende aminozuren (Figuur 4.1., plaat IV). Dit lijkt er op te duiden dat Digestamin 1382 een (vluchtige) olie bereiding van knoflook bevat [30,31,32]. Met behulp van een vijfde DLC-systeem is aangetoond dat Digestamin 1382 ook nog fenolische verbindingen bevat (Figuur 4.1., plaat V; blauw-fluorescerende vlekken [7]) die in algemene zin aangeven dat hydrofiele extracten en/of ruw plantenmateriaal (kunnen) zijn verwerkt in het product. De aanwezigheid van met name thymol, diallyl-sulfide of andere lipofiele zwavelverbindingen, alsmede fenolische verbindingen in Digestamin 1382 bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

Over de reproduceerbaarheid van het productieproces van Digestamin 1382 (*batch-to-batch consistency*) kan geen uitspraak worden gedaan. De producent/importeur is namelijk niet bereid uitgebreide product-informatie of analyse-certificaten van verschillende product-charges ter beschikking te stellen.

#### 4.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Digestamin 1382 verrijkte varkensvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertoont het voermonster dat dient als controle (eindvoer) wel remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is.

#### 4.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Digestamin 1382 lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 4.1.). Digestamin 1382 lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 4.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [13,14,33,34], bevat Digestamin 1382 wel duidelijk componenten die het

signaal van  $17\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 4.1.). Deze resultaten maken duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Digestamin 1382 wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Digestamin 1382 met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Wellicht kan ook nog een eerder voor inhoudsstoffen uit knoflook, één van de bestanddelen van Digestamin 1382, gerapporteerde verhoging van de testosteron-afbraak –leidend tot testosteron-metabolieten die niet meer in staat zijn tot activatie van de androgeen-receptor– de gevonden resultaten (deels) verklaren [35]. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Digestamin 1382 mogelijk een vals negatief testresultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

#### 4.3.4. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte en de antioxidant capaciteit van Digestamin 1382 staan weergegeven in Tabel 4.1.. De antioxidant capaciteit van Digestamin 1382 –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– is hoger in de lipofiele fractie dan in de hydrofiele fractie. Dit verschil in antioxidant capaciteit kan worden verklaard door de aanwezigheid van vooral lipofiele bestanddelen in de diverse vluchtige oliën, enkele van de bestanddelen van Digestamin 1382 (zie ook de paragraaf *kwalitatieve analyse*). De gevonden waarden voor totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit zijn in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen [20,36,37,38]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Digestamin 1382 kunnen verklaren. Het is echter aannemelijk dat de lipofiele componenten uit de vluchtige oliën, maar ook de (fenolische) verbindingen in de andere plantaardige bestanddelen van Digestamin 1382, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [20,36,37,38].

#### 4.3.5. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

In de concentratie-reeks die is getest, laten het dichloormethaan- en ethanol-droogextract van Digestamin 1382 geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Het dichloormethaan- en ethanol-droogextract van Digestamin 1382 vertonen beide wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuren 4.2. en 4.3.) waarbij het dichloormethaan-droogextract in dit opzicht actiever is dan het ethanol-droogextract (IC50-waarden zijn respectievelijk  $300 \pm 23 \mu\text{g/ml}$  en  $6293 \pm 830 \mu\text{g/ml}$  (gemiddelde  $\pm$  SD; n = 3 experimenten); de IC50-waarde is de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-sigitaal 50% wordt geremd). De remming van het chemiluminescentie-sigitaal door de dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Digestamin 1382 is niet toe te schrijven aan een toxische werking op de PMN's. Hoewel de omzetting van resazurine bij hogere doseringen van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 wel is verminderd en de metabole activiteit van deze cellen dus negatief wordt beïnvloed (Figuur 4.2.), zijn geen direct cytotoxische effecten waargenomen (Figuur 4.4.). Het ethanol-extract van Digestamin 1382 beïnvloedt de omzetting van resazurine niet negatief en de metabole activiteit van deze cellen is dus intact (Figuur 4.3.).

Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-signaal door de dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Digestamin 1382 daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN. Literatuurgegevens doen vermoeden dat enkele van de bestanddelen in de vluchtige oliën en plantenextracten waar Digestamin 1382 uit bestaat inderdaad deze werking kunnen hebben [39,40,41]. Op basis van andere literatuurgegevens [40,42,43,44,45] maar ook de hier gerapporteerde antioxidatieve capaciteit van Digestamin 1382, kan echter niet worden uitgesloten dat de remming van het chemiluminescentie-signaal het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapoleerbaar zijn naar PMN's van het varken.

Het hier waargenomen effect van Digestamin 1382 op het functioneren van de PMN kan mogelijk de gedeclareerde positieve beïnvloeding van de darmgezondheid verder onderbouwen. Het wordt namelijk algemeen aangenomen dat langdurige of overmatige activatie van PMN's en/of productie van reactieve zuurstof-metabolieten weefselbeschadiging kan veroorzaken, onder meer door lipiden-peroxidatie (leidend tot schade aan de celmembraan) en door afbraak van collageen en andere biologische macromoleculen [46,47,48]. Hoewel een dergelijke negatief effect van de PMN op het darm-epitheel van gespeende biggen –voor zover bekend– nog niet is beschreven, kan worden verondersteld dat de kans hierop, juist in een periode dat er veel veranderingen plaats vinden in het voedingspatroon, de mucosale afweerreactie en de lokale bacteriële flora, groot is. Om deze hypothese verder te bewijzen, is echter aanvullend onderzoek nodig.

#### 4.3.6. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 vertoont een dosis-afhankelijke antimicrobiële werking tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) uit het varken (Figuur 4.5.). Het ethanol-droogextract van Digestamin 1382 remt daarentegen de bacteriële groei niet (Figuur 4.6.). Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere publicaties waarin voor enkele van de plantaardige bestanddelen (of inhoudsstoffen hieruit) in Digestamin 1382 –met name de lipofielere vluchtige olie componenten– ook een antimicrobiële activiteit tegen *E. coli* is beschreven [29,36,49,50,51]. De waargenomen daling in het fluorescentie-signaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metaboliet (hydroresorufine) [25].

#### 4.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Digestamin 1382. Het is daarentegen vooralsnog niet eenduidig aangetoond dat de samenstelling van Digestamin 1382 per product-charge constant is.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Digestamin 1382 verrijkt varkensvoer en het bijbehorende controle-voer, vertoont de laatste toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf.
- Digestamin 1382 laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Digestamin 1382 ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen

worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Digestamin 1382 is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Digestamin 1382 waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Digestamin 1382 verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

- Digestamin 1382 bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Digestamin 1382 is echter vooralsnog de vraag. Het is op dit moment namelijk niet duidelijk of bij de dosering waarin Digestamin 1382 volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, een significante toename gevonden zal worden van het totale gehalte aan fenolen en antioxidanten in het diervoer.
- Digestamin 1382 vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).
- Digestamin 1382 vertoont een dosis-afhankelijke remming van de bacteriële groei van klinische isolaten van *E. coli* uit het varken.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Digestamin 1382 op de darmgezondheid van varkens, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Digestamin 1382 en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in de darm van het varken daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.

#### **4.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit het varken.

#### **4.6. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM, Kleijer-Ligtenberg G. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 3: kruidenpreparaten voor varkens, groeibevordering door (darm)gezondheidsbevordering. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.



- 3 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Thyme, thymi herba* (01/2008:0865).
- 4 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):149-93.
- 5 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):291-303.
- 6 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Garlic powder, allii sativi bulbi pulvis* (01/2008:1216).
- 7 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):195-245.
- 8 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 9 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 10 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 11 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 12 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 13 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 14 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 15 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 16 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 17 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 18 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 19 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 20 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 21 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using

- randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 22 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
  - 23 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
  - 24 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
  - 25 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
  - 26 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
  - 27 Bruning JW, Kardol MJ, Arentzen R. Carboxyfluorescein fluorochromasia assays. I. Non-radioactively labeled cell mediated lympholysis. *J. Immunol. Meth.* 1980;33:33-40.
  - 28 Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs* 1995;6(4):522-32.
  - 29 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
  - 30 Wereld Gezondheids Organisatie. Monografie: *Bulbus allii sativi*. In: WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva; 1999 (deel 1):16-32.
  - 31 Brace LD. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L). *J. Cardiovasc. Nurs.* 2002;16(4):33-49.
  - 32 Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 2006;136:716S-25S.
  - 33 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
  - 34 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
  - 35 Pinto JT, Qiao C, Xing J, Suffoletto BP, Schubert KB, Rivlin RS, Huryk RF, Bacich DJ, Heston WDW. Alterations of prostate biomarker expression and testosterone utilization in human LNCaP prostatic carcinoma cells by garlic-derived S-allylmercaptocysteine. *Prostate* 2000;45:304-14.
  - 36 Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:1822-8.
  - 37 Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2007;58(2):87-93.
  - 38 Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:7749-59.

- 39 Sankaranarayanan A, Narender T, Kumar S, Dikshit M. *Allium sativum* constituents: effect on free radical generation from rat neutrophils. *Cell. Mol. Biol.* 2007;53(5):63-7.
- 40 Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 2006;76(2):61-8.
- 41 Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Tagaki N. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res.* 1986;65(1):53-6.
- 42 Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Zúñiga-Bustos A, Orozco-Ibarra M. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci.* 2006;78(7):761-70.
- 43 Pedraza-Chaverri J, Arriaga-Noblecia G, Medina-Campos ON. Hypochlorous acid scavenging capacity of garlic. *Phytother. Res.* 2007;21:884-8.
- 44 Kruk I, Michalska T, Lichszeld K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 2000;41(7):1059-64.
- 45 Grassmann J, Hippeli S, Domisch K, Rohnert U, Beuscher N, Elstner EF. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittelforschung* 2000;50(2):135-9.
- 46 Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 1997;46:382-91.
- 47 Leff JA, Repine JE. Neutrophil-mediated tissue injury. In: *The neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (red.) Oxford University Press, Oxford, 1993: 229-62.
- 48 Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 1989;320(6):365-76.
- 49 Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999;1(2):125-9.
- 50 Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62(11):4238-42.
- 51 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86(6):985-90.

**Tabel 4.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Digestamin 1382.

<b>Digestamin 1382</b>		
Totaal fenolen-gehalte		11,9 ± 0,9 mg GZE/g <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	32,0 ± 1,9 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	305,7 ± 2,5 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	337,7 µmol TE/g <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten. Omdat niet-fenolische inhoudsstoffen in Digestamin 1382 mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zo het gemeten totaal fenolen-gehalte kunnen beïnvloeden, dient het gemeten totaal fenolen-gehalte met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

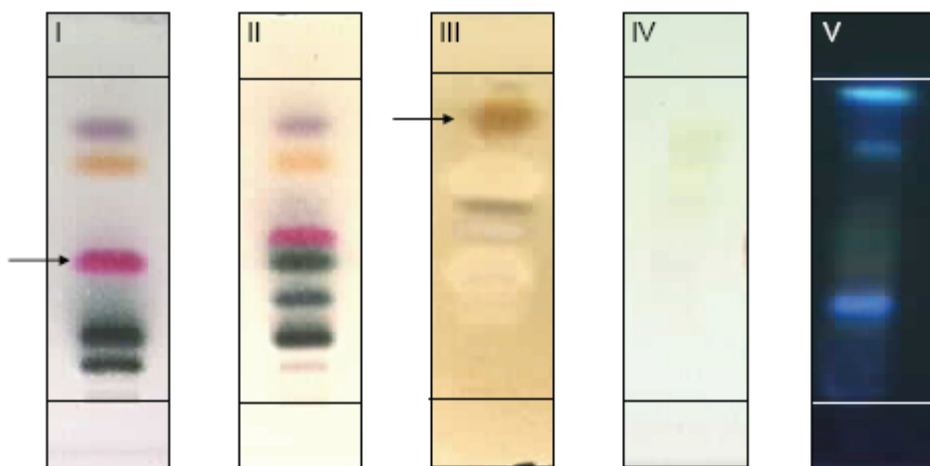
<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

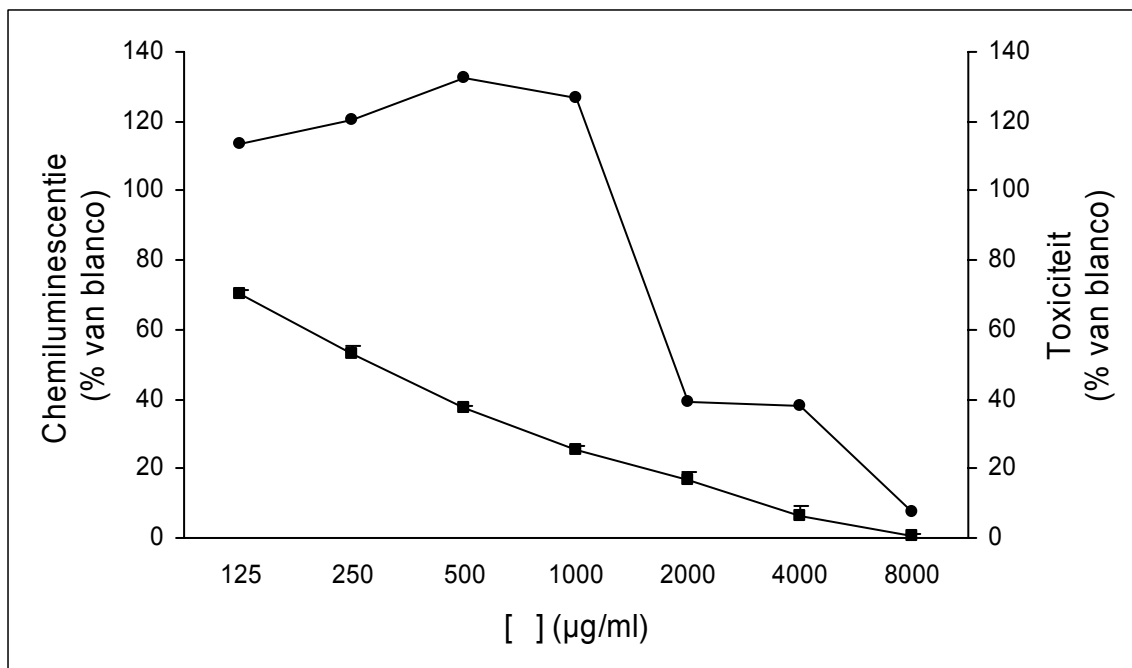
<sup>d</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 3 mg product.

<sup>e</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

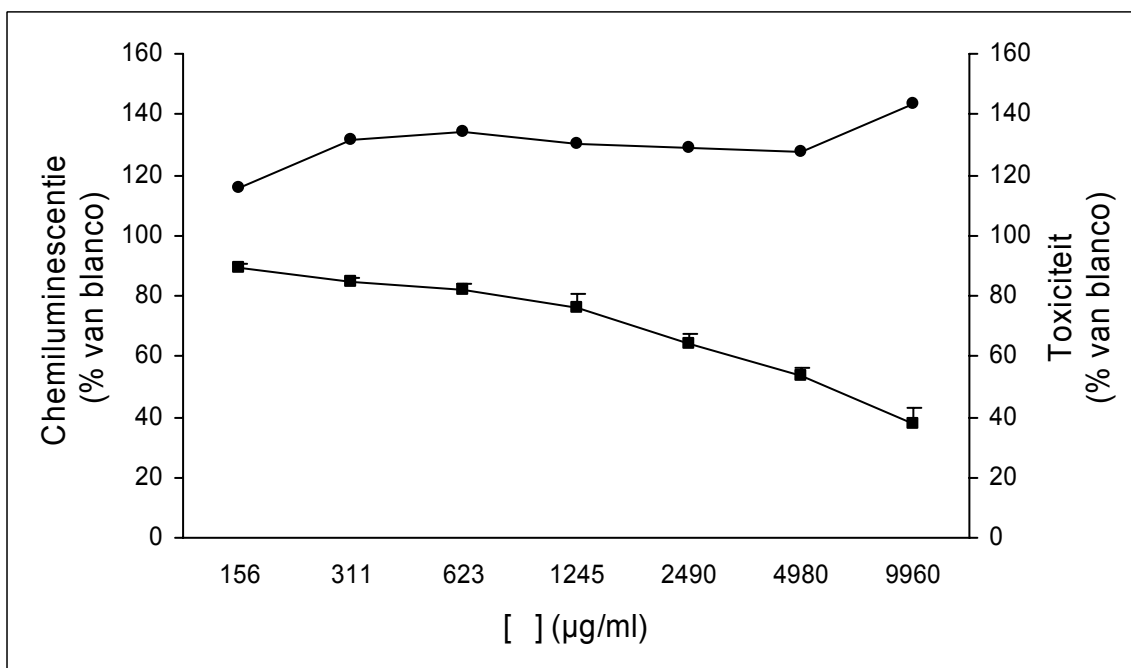
<sup>f</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



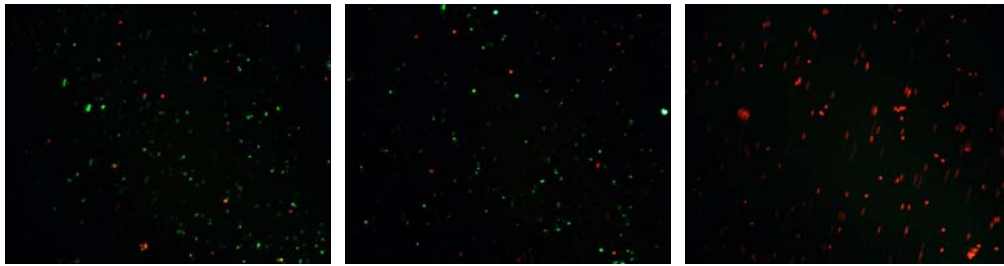
**Figuur 4.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Digestamin 1382 aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met thymol. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. *Plaat III:* DLC-systeem voor het aantonen van allicin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide): Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met diallyl-sulfide of andere lipofiele zwavelverbindingen. *Plaat IV:* DLC-systeem voor het aantonen van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren: Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens. *Plaat V:* DLC-systeem voor het aantonen van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen: Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens.



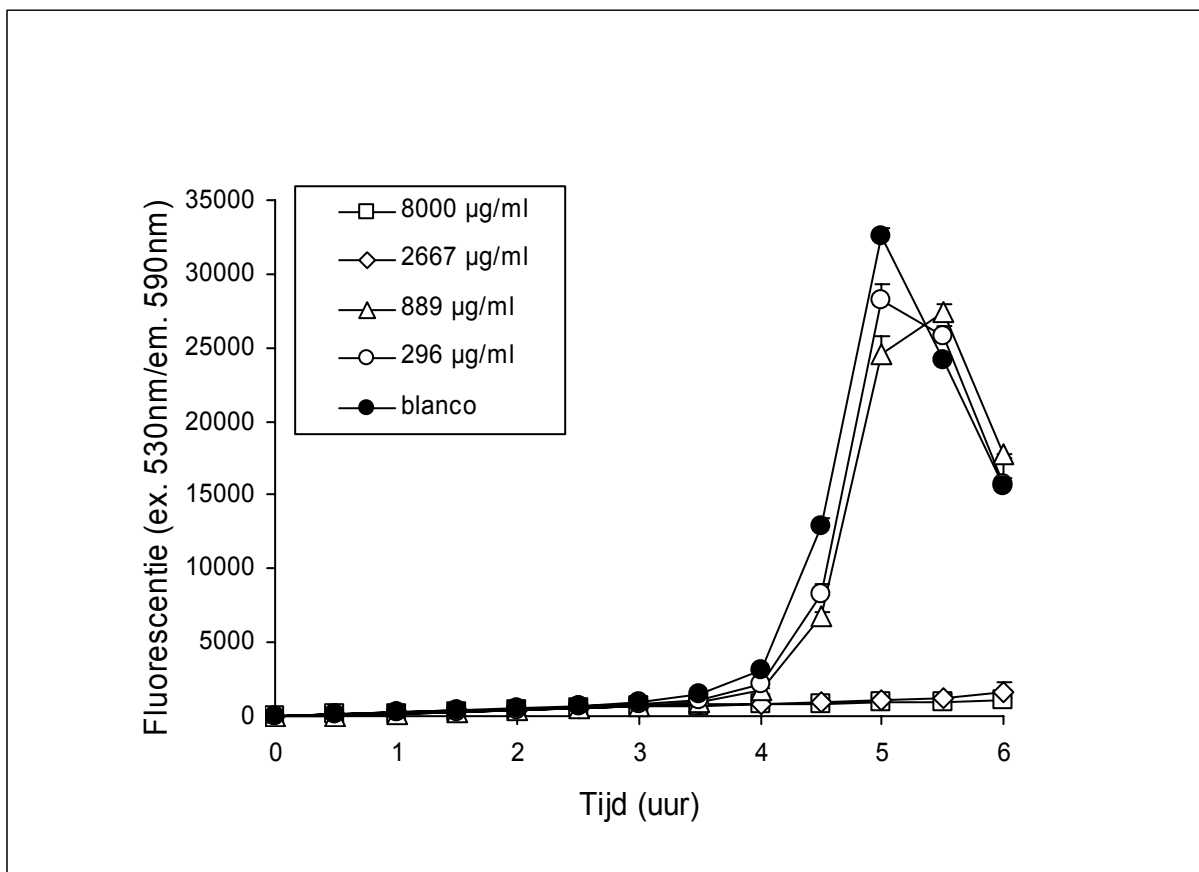
**Figuur 4.2.:** Effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



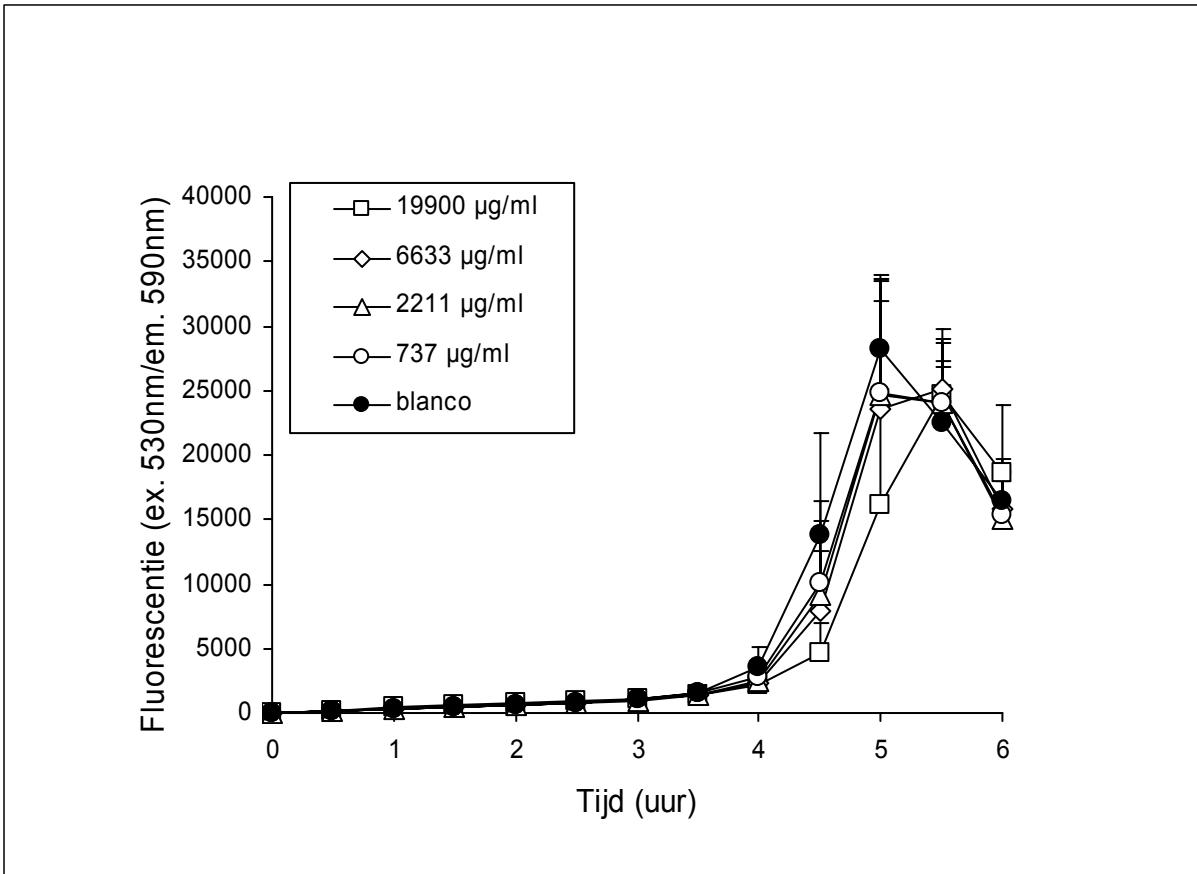
**Figuur 4.3.:** Effect van het ethanol-droogextract van Digestamin 1382 op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 4.4.:** Het effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 op de viabiliteit/toxiciteit van polymorf-kernige granulocyten (PMN's). De PMN's zijn vooraf beladen met carboxyfluoresceïne-diacetaat dat levende cellen groen kleurt waardoor deze gemakkelijk kunnen worden onderscheiden van met propidium-jodide rood gekleurde dode cellen. Cel-overleving in de met Digestamin 1382 geïncubeerde PMN's (foto links) is vergelijkbaar met onbehandelde PMN's (foto midden). Met Triton-X100 behandelde PMN's –resultierend in membraanschade van de PMN's–laten daarentegen duidelijk celdood zien (foto rechts).



**Figuur 4.5.:** Effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1382 op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



**Figuur 4.6.:** Effect van het ethanol-droogextract van Digestamin 1382 op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



## 5. DIGESTAMIN 1383

### 5.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vier kruidenproducten geselecteerd die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens. Eén van deze producten is Digestamin 1383 waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het de voederopname en/of voederconversie en/of opbrengst gunstig beïnvloedt [1]. Digestamin 1383 is in een praktijkcentrum voor de biologische varkenshouderij en bij een biologische varkenshouder onderzocht op de effecten op groei, gezondheid en slachtparameters bij varkens en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Digestamin 1383 nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 5.2. Materiaal en methoden

#### 5.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Digestamin 1383 aanwezige inhoudsstoffen. Digestamin 1383 is in eerste instantie onderzocht met behulp van een algemeen protocol voor de analyse van (componenten uit) vluchtige oliën [3] omdat dit product volgens opgaaf van de producent/importeur deze bestanddelen bevat. In het kort, Digestamin 1383 wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

Verder is Digestamin 1383 onderzocht op de aanwezigheid van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen omdat het product volgens de producent/importeur ook een mengsel van (niet altijd nader gespecificeerde) kruiden en extracten bevat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode [4]. In het kort, Digestamin 1383 wordt gemengd met ethanol en gedurende 10 min geëxtraheerd bij 90 °C en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Digestamin 1383 (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 5.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met

behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijkproeven bij varkens zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 5.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) [9].

Digestamin 1383 is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Digestamin 1383 is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Digestamin 1383 wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en  $\text{NH}_2$ -kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu\text{l}$  4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 5.2.4. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [12].

Digestamin 1383, het Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe zijn Digestamin 1383, het Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer opgenomen in een 1,5% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol/water (1/1 v/v) en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [13,14]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [12] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

#### 5.2.5. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïn geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïn waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [15,16]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [15,16].

Digestamin 1383, het Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [17]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [18]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15,16].

#### 5.2.6. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metabolieten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsignaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door PMN's [19,20].

Digestamin 1383 is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Digestamin 1383 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat)

geëxtraheerd met achtereenvolgens dichloormethaan en ethanol. Deze oplosmiddelen zijn onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer afgedampt en het residu van het ethanol-extract is ook nog gevriesdroogd. Van deze dichloormethaan- en ethanol-droogextracten zijn verdunningsreeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-sigitaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [21]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van het dichloormethaan- en het ethanol-droogextract van Digestamin 1383 gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [22,23]. Daarnaast is de hoogste concentratie van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 ook nog gedurende 30 min geïncubeerd met PMN's die vooraf waren beladen met carboxyfluoresceïne-diacetaat. Carboxyfluoresceïne-diacetaat kleurt levende cellen groen [24] waardoor deze gemakkelijk kunnen worden onderscheiden van met propidium-jodide rood gekleurde dode cellen [25].

#### 5.2.7. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [26].

Digestamin-1383 is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (K88<sup>+</sup>, collectienummer 295) uit varkens. Hiertoe is Digestamin 1383 met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens dichloormethaan en ethanol. Deze oplosmiddelen zijn onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer afgedampt en het residu van het ethanol-extract is ook nog gevriesdroogd. Van deze dichloormethaan- en ethanol-droogextracten zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [26]. Bacterie-groei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 5.3. Resultaten en discussie

#### 5.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Digestamin 1383 een groot aantal verschillende vluchtige olie componenten bevat (Figuur 5.1., plaat I [3]). Nader onderzoek waarbij het inhoudsstoffen-patroon wordt vergeleken met specifieke referenties is echter noodzakelijk om de precieze samenstelling van het mengsel van vluchtige oliën vast te kunnen stellen. Met behulp van een tweede DLC-systeem is aangetoond dat Digestamin 1383 ook nog flavonoïden en andere fenolische verbindingen bevat (Figuur 5.1., plaat II; respectievelijk oranje/geel- en blauw-fluorescerende vlekken [4]) die in algemene zin aangeven dat hydrofiële extracten en/of ruw plantenmateriaal (kunnen) zijn verwerkt in het product. De aanwezigheid van met name inhoudsstoffen uit vluchtige oliën, flavonoïden en

andere fenolische verbindingen in Digestamin 1383 bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

Over de reproduceerbaarheid van het productieproces van Digestamin 1383 (*batch-to-batch consistency*) kan geen uitspraak worden gedaan. De producent/importeur is namelijk niet bereid uitgebreide product-informatie of analyse-certificaten van verschillende product-charges ter beschikking te stellen.

### 5.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertoont een voermonster dat dient als controle (baby-biggen korrel) wel remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is.

### 5.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Digestamin 1383 lijkt *in vitro* een oestrogeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 5.1. en Figuur 5.2.). Digestamin 1383 lijkt daarentegen geen *in vitro* androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 5.1. en Figuur 5.3.). Digestamin 1383 lijkt ook geen componenten te bevatten die het signaal van 17 $\beta$ -estradiol in de OGT-test verlagen/onderdrukken en componenten die het signaal van 17 $\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 5.1. en Figuren 5.2. en 5.3.). Deze bevindingen zijn in overeenstemming met literatuurgegevens waarin aan anijs en zoethout, enkele van de ingrediënten in Digestamin 1383, een (sterke) oestrogene werking wordt toegeschreven [zie bijvoorbeeld 27,28,29,30]. Deze resultaten maken tevens duidelijk dat meer onderzoek naar de oestrogeen-agonerende activiteit van Digestamin 1383 wenselijk is. Met name om vast te stellen wat het exacte werkingsmechanisme is dat ten grondslag ligt aan deze werking van Digestamin 1383.

### 5.3.4. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Digestamin 1383 staat weergegeven in Tabel 5.1.. Het totaal fenolen-gehalte van het varkensvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totaal fenolen-gehalte gemeten van  $6,4 \pm 2,0$  mg galluszuur-equivalenten (GZE) per gram. In het met Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer is een totaal fenolen-gehalte van  $8,8 \pm 2,3$  mg GZE/g gevonden. Dit verschil in totaal fenolen-gehalte tussen beide varkensvoeren is echter niet-significant en waarschijnlijk te wijten aan inhomogeniteit van de onderzochte voermonsters en/of de monsternamen en/of spreiding in de gebruikte bepalingmethode.

De antioxidant capaciteit van Digestamin 1383 –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 5.1.. De antioxidant capaciteit van Digestamin 1383 is hoger in de lipofiele fractie dan in de hydrofiele fractie. Dit verschil in antioxidant capaciteit kan worden verklaard door de aanwezigheid van vooral lipofiele bestanddelen in de diverse vluchtige oliën, enkele van de bestanddelen van Digestamin 1383 (zie ook de paragraaf *kwantitatieve analyse*). De gevonden antioxidant capaciteit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen [17,31,32,33,34]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van

Digestamin 1383 kunnen verklaren. Het is echter aannemelijk dat de lipofiele componenten uit de vluchtige oliën maar ook de (fenolische) verbindingen in de andere plantaardige bestanddelen van Digestamin 1383, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [17,31,32,33,34].

De antioxidant capaciteit van het varkensvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 112,4  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 58,4 \pm 3,7 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 54,0 \pm 6,3 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer is een totale antioxidant capaciteit van 101,9  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 55,6 \pm 0,1 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 46,3 \pm 1,0 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). Deze verlaging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Digestamin 1383 aan het varkensvoer; bij suppletie van 0,3 g Digestamin 1383 per kilogram varkensvoer (conform onderzoeksprotocol) kan namelijk juist een geringe toename van 0,28  $\mu\text{mol TE/g}$  worden berekend. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat de oorzaak is van deze verlaging van de antioxidant capaciteit in het met Digestamin 1383 verrijkte varkensvoer. Mogelijk is dit verschil echter te wijten aan (geringe) verschillen in de samenstelling van de geteste voermonsters. Deze suggestie wordt versterkt door de eveneens waargenomen variatie in totaal fenolen-gehalte van de voermonsters.

#### *5.3.5. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

In de concentratie-reeks die is getest, laten het dichloormethaan- en ethanol-droogextract van Digestamin 1383 geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Het dichloormethaan- en ethanol-droogextract van Digestamin 1383 vertonen beide wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuren 5.4. en 5.5.) waarbij het dichloormethaan-droogextract in dit opzicht actiever is dan het ethanol-droogextract (IC<sub>50</sub>-waarden zijn respectievelijk  $509 \pm 83 \mu\text{g/ml}$  en  $919 \pm 139 \mu\text{g/ml}$  (gemiddelde  $\pm$  SD;  $n = 3$  experimenten); de IC<sub>50</sub>-waarde is de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-sigitaal 50% wordt geremd). De remming van het chemiluminescentie-sigitaal door de dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Digestamin 1383 is niet toe te schrijven aan een toxische werking op de PMN's. Hoewel de omzetting van resazurine bij hogere doseringen van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 wel is verminderd en de metabole activiteit van deze cellen dus negatief wordt beïnvloed (Figuur 5.4.), zijn geen direct cytotoxische effecten waargenomen (Figuur 5.6.). Het ethanol-droogextract van Digestamin 1383 beïnvloedt de omzetting van resazurine niet negatief en de metabole activiteit van deze cellen is dus intact (Figuur 5.5.).

Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-sigitaal door de dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Digestamin 1383 daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door de PMN. Literatuurgegevens doen vermoeden dat enkele van de bestanddelen in de vluchtige oliën en plantenextracten waar Digestamin 1383 uit bestaat inderdaad deze werking kunnen hebben [35,36,37]. Op basis van andere literatuurgegevens [35,38,39] maar ook de hier gerapporteerde antioxidatieve capaciteit van Digestamin 1383, kan echter niet worden uitgesloten dat de remming van het chemiluminescentie-sigitaal het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metaboliëten. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapolbaar zijn naar PMN's van het varken.

Het hier waargenomen effect van Digestamin 1383 op het functioneren van de PMN kan mogelijk de gedeclareerde positieve beïnvloeding van de darmgezondheid verder onderbouwen. Het wordt namelijk algemeen aangenomen dat langdurige of overmatige activatie van PMN's en/of productie van reactieve zuurstof-metabolieten weefselbeschadiging kan veroorzaken, onder meer door lipiden-peroxidatie (leidend tot schade aan de celmembraan) en door afbraak van collageen en andere biologische macromoleculen [40,41,42]. Hoewel een dergelijke negatief effect van de PMN op het darm-epitheel van gespeende biggen –voor zover bekend– nog niet is beschreven, kan worden verondersteld dat de kans hierop, juist in een periode dat er veel veranderingen plaats vinden in het voedingspatroon, de mucosale afweerreactie en de lokale bacteriële flora, groot is. Om deze hypothese verder te bewijzen, is echter aanvullend onderzoek nodig.

#### 5.3.6. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 vertoont een dosis-afhankelijke antimicrobiële werking tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) uit het varken (Figuur 5.7.). Het ethanol-droogextract van Digestamin 1383 remt daarentegen de bacteriële groei niet (Figuur 5.8.). Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere publicaties waarin voor enkele van de plantaardige bestanddelen (of inhoudsstoffen hieruit) in Digestamin 1383 –met name de lipofielere vluchtige olie componenten– ook een antimicrobiële activiteit tegen *E. coli* is beschreven [26,31,43]. De waargenomen daling in het fluorescentie-sigitaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metabool (hydroresorufine) [22].

#### 5.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Digestamin 1383. Het is daarentegen vooralsnog niet eenduidig aangetoond dat de samenstelling van Digestamin 1383 per product-charge constant is.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Digestamin 1383 verrijkt varkensvoer en het bijbehorende controle-voer, vertoont de laatste toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf.
- Digestamin 1383 laat een oestrogene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Digestamin 1383 ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Digestamin 1383 is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Digestamin 1383 waargenomen oestrogene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Digestamin 1383 verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).
- Digestamin 1383 bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Digestamin 1383 is echter vooralsnog de vraag. Bij de

dosering waarin Digestamin 1383 volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolen en antioxidanten in het diervoer.

- Digestamin 1383 vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).
- Digestamin 1383 vertoont een dosis-afhankelijke remming van de bacteriële groei van klinische isolaten van *E. coli* uit het varken.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Digestamin 1383 op de darmgezondheid van varkens, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Digestamin 1383 en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in de darm van het varken daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.

### 5.5. Dankbetuiging

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinaire toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit het varken.

### 5.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM, Kleijer-Ligtenberg G. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 3: kruidenpreparaten voor varkens, groeibevordering door (darm)gezondheidsbevordering. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Wagner H, Blatt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):149-93.
- 4 Wagner H, Blatt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):195-245.
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.



- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 13 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric.Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 14 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric.Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 15 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 17 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 18 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 19 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
- 20 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
- 21 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
- 22 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 23 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.

- 24 Bruning JW, Kardol MJ, Arentzen R. Carboxyfluorescein fluorochromasia assays. I. Non-radioactively labeled cell mediated lympholysis. *J. Immunol. Meth.* 1980;33:33-40.
- 25 Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs* 1995;6(4):522-32.
- 26 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 27 Albert-Puleo M. Fennel and anise as estrogenic agents. *J. Ethnopharmacol.* 1980;2(4):337-44.
- 28 Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Izrael S, Vaya J. Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2001;78:291-8.
- 29 Somjen D, Katzburg S, Vaya J, Kaye AM, Hendel D, Posner GH, Tamir S. Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:241-6.
- 30 Zava DT, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998;217(3):369-78.
- 31 Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:1822-8.
- 32 Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2007;58(2):87-93.
- 33 Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:7749-59.
- 34 Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food.* 2006;9(2):205-13.
- 35 Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 2006;76(2):61-8.
- 36 Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Tagaki N. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res.* 1986;65(1):53-6.
- 37 Racková L, Jancinová V, Petriková M, Drábiková K, Nosál R, Stefek M, Kostálová D, Prónayová N, Kováčová M. Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin. *Nat. Prod. Res.* 2007;21(14):1234-41.
- 38 Kruk I, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 2000;41(7):1059-64.
- 39 Murcia MA, Egea I, Romojaro F, Parras P, Jiménez AM, Martínez-Tomé M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(7):1872-81.
- 40 Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 1997;46:382-91.
- 41 Leff JA, Repine JE. Neutrophil-mediated tissue injury. In: *The neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (red.) Oxford University Press, Oxford, 1993: 229-62.
- 42 Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 1989;320(6):365-76.
- 43 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86(6):985-90.

**Tabel 5.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Digestamin 1383.

<b>Digestamin 1383</b>		
Totaal fenolen-gehalte		9,9 ± 1,2 mg GZE/g <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	152,4 ± 13,3 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	780,8 ± 128,7 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	933,2 µmol TE/g <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Verdacht <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>f</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten. Omdat niet-fenolische inhoudsstoffen in Digestamin 1383 mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zo het gemeten totaal fenolen-gehalte kunnen beïnvloeden, dient het gemeten totaal fenolen-gehalte met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

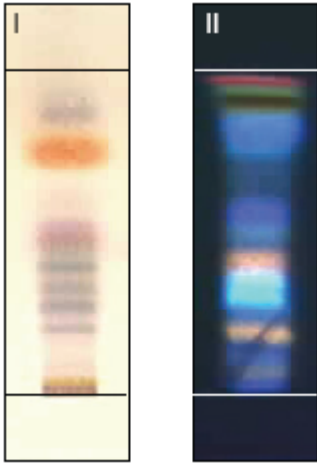
<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiele)} + ORAC_{(lipofiele)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

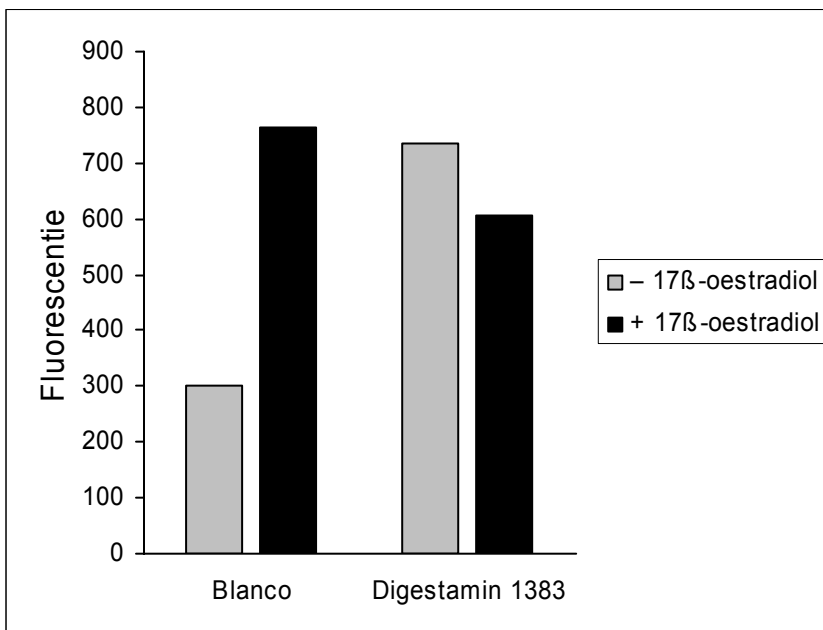
<sup>d</sup> Agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 3 mg product.

<sup>e</sup> Geen antagonistische activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 3 mg product.

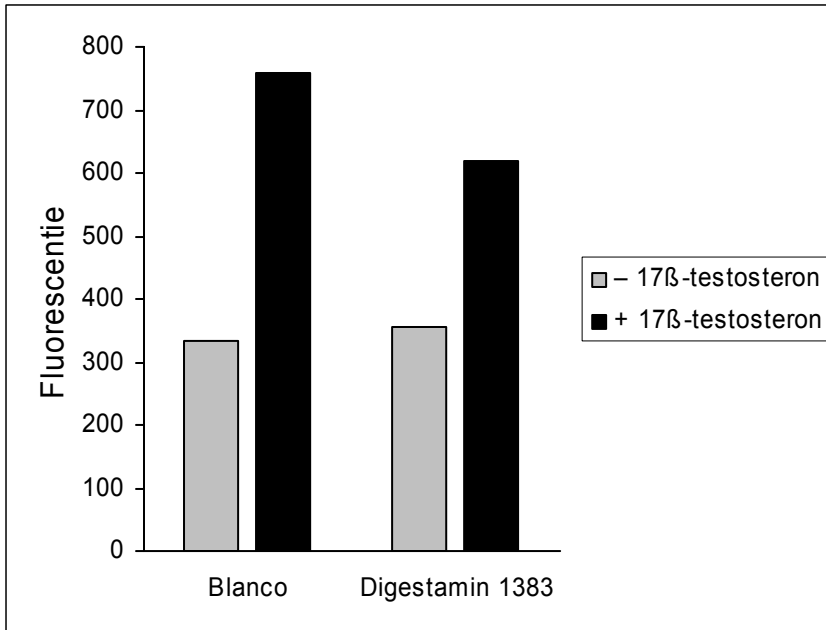
<sup>f</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



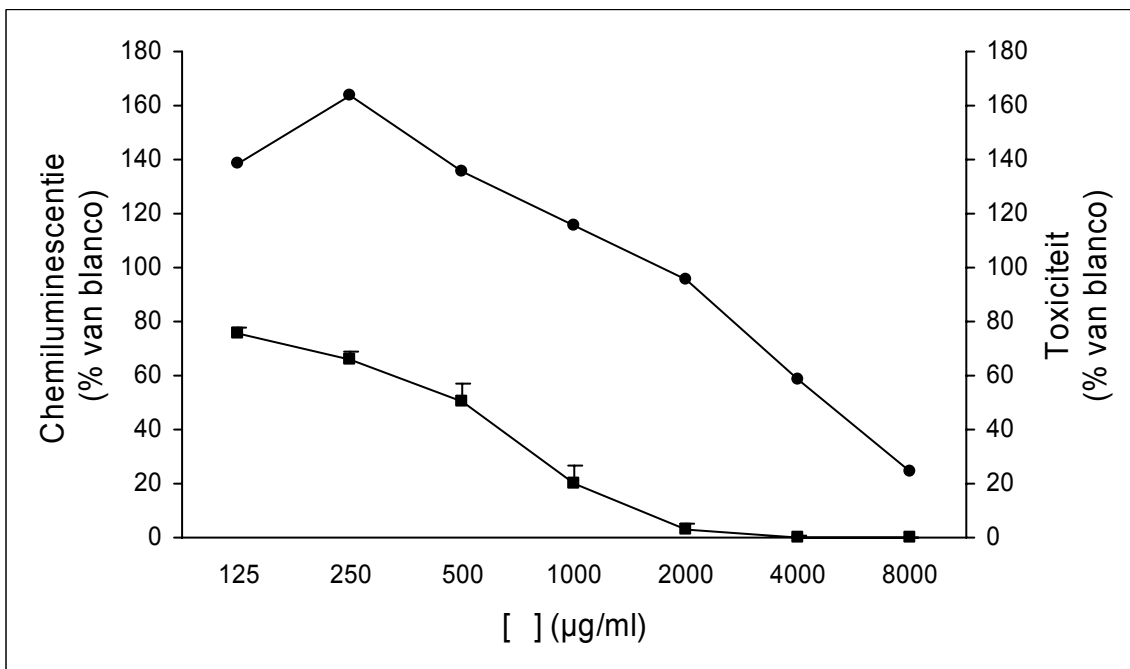
**Figuur 5.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Digestamin 1383 aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen: Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens.



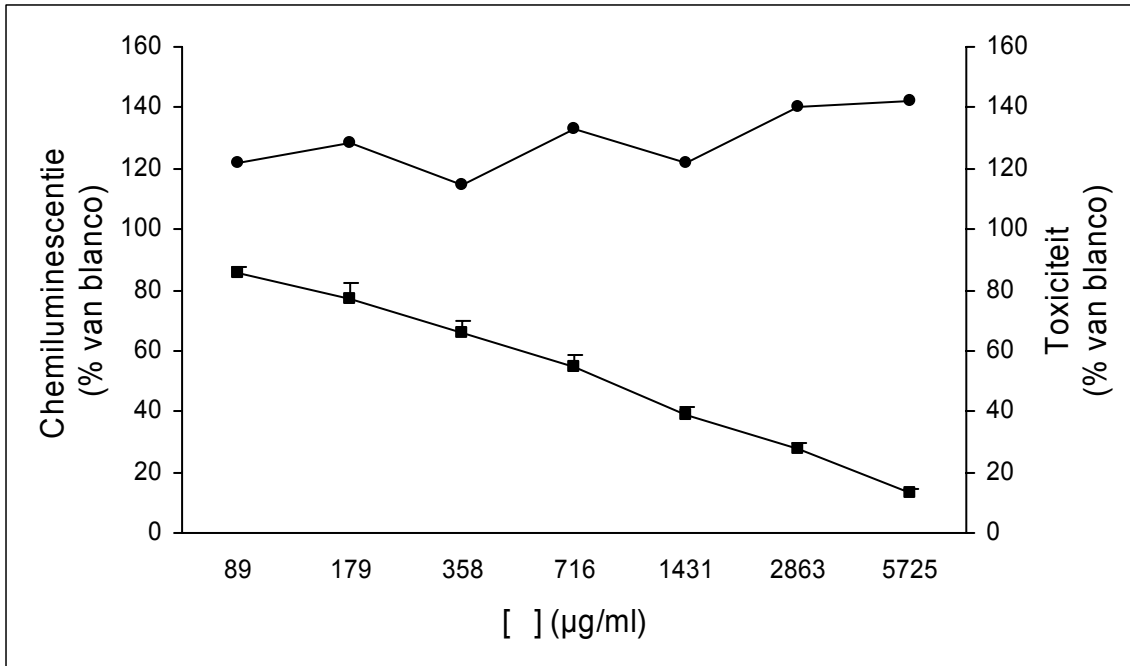
**Figuur 5.2.:** De oestrogen-agonerende activiteit van Digestamin 1383.



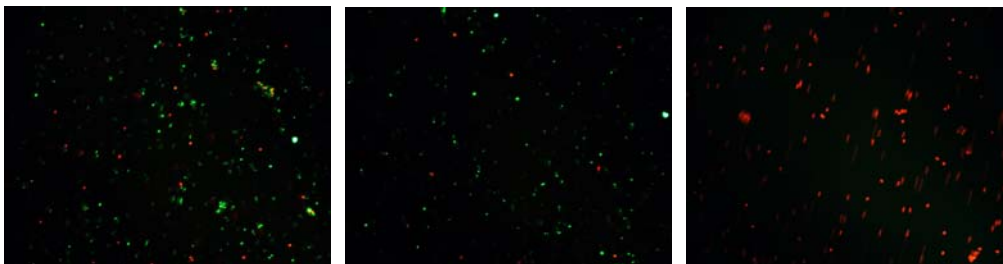
**Figuur 5.3.:** Het effect van Digestamin 1383 in de RIKILT androgene gist test.



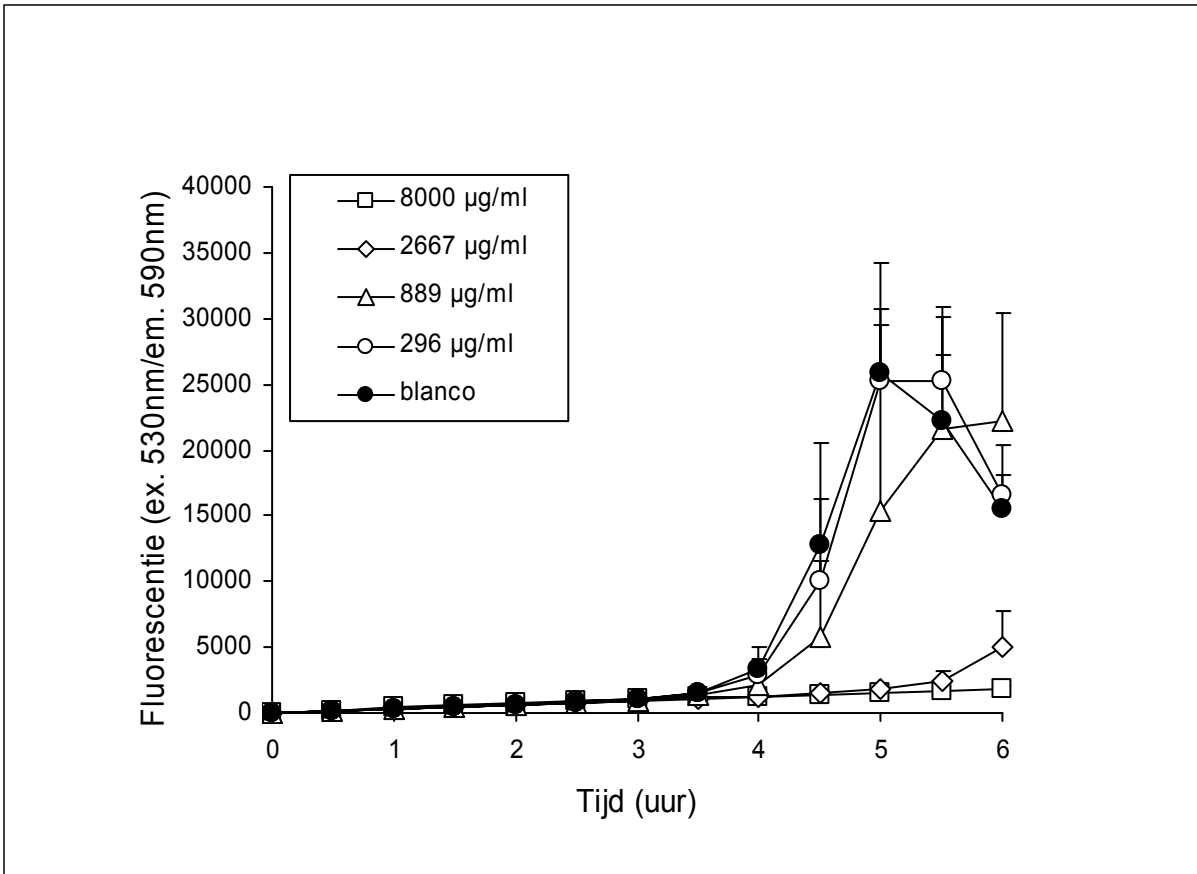
**Figuur 5.4.:** Effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



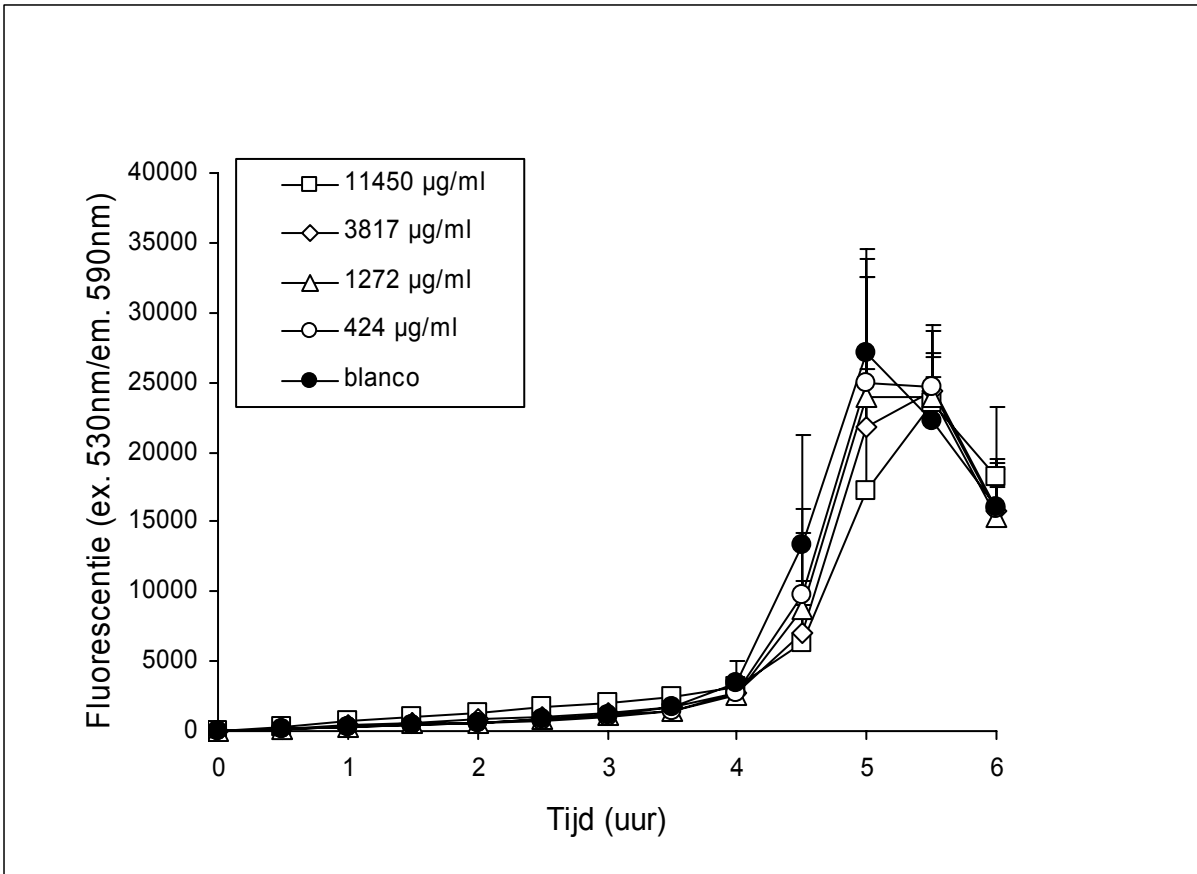
**Figuur 5.5.:** Effect van het ethanol-droogextract van Digestamin 1383 op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 5.6.:** Het effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 op de viabiliteit/toxiciteit van polymorf-kernige granulocyten (PMN's). De PMN's zijn vooraf beladen met carboxyfluoresceïne-diacetaat dat levende cellen groen kleurt waardoor deze gemakkelijk kunnen worden onderscheiden van met propidium-jodide rood gekleurde dode cellen. Cel-overleving in de met Digestamin 1383 geïncubeerde PMN's (foto links) is vergelijkbaar met onbehandelde PMN's (foto midden). Met Triton-X100 behandelde PMN's – resulterend in membraanschade van de PMN's – laten daarentegen duidelijk celdood zien (foto rechts).



**Figuur 5.7.:** Effect van het dichloormethaan-droogextract van Digestamin 1383 op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



**Figuur 5.8.:** Effect van het ethanol-droogextract van Digestamin 1383 op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



## 6. EIMERICOX

### 6.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vijf kruidenproducten geselecteerd die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) bij leghennen. Eén van deze producten is Eimericox waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het een gunstige invloed heeft op de darmlesies en mortaliteit ten gevolge van de *Eimeria*-besmettingen en/of de *Eimeria*-oöcysten belasting in de mest en/of de voederinname, voederconversie of groei [1]. Eimericox is in een gecontroleerde *challenge*-proef onderzocht op bovengenoemde parameters bij met verschillende *Eimeria*-soorten besmette leghennen en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Eimericox nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 6.2. Materiaal en methoden

#### 6.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Eimericox aanwezige inhoudsstoffen. Eimericox is in eerste instantie onderzocht met behulp van een algemeen protocol voor de analyse van (componenten uit) vluchtige oliën [3] omdat dit product volgens opgaaf van de producent/importeur planten bevat die rijk zijn aan deze inhoudsstoffen. In het kort, Eimericox wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

Verder is Eimericox onderzocht op de aanwezigheid van een alkaloid dat specifiek voorkomt in één van de plantaardige bestanddelen van dit product. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4]. In het kort, Eimericox wordt gemengd met methanol en gedurende 10 min geëxtraheerd bij 90 °C en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; methanol/water (7/3 v/v); jodobismutaat-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Eimericox (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 6.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of

meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Eimericox verrijkte kippenvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 6.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) [9].

Eimericox is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Eimericox is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Eimericox wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en  $\text{NH}_2$ -kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu\text{l}$  4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 6.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [12,13]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [12,13].

Eimericox, het Eimericox verrijkte kippenvoer en controle kippenvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [14]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [12,13].

#### 6.2.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [16].

Eimericox is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (collectienummer 465) uit kippen. Hiertoe is Eimericox met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met ethanol waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer is afgedampt en het residu vervolgens nog is gevriesdroogd. Van dit ethanol-droogextract zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (cn 465) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [16]. Bacteriegroei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 6.3. Resultaten en discussie

#### 6.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Eimericox verschillende vluchtige olie componenten bevat (Figuur 6.1., plaat I [3]) waarvan er met name één in hoge concentratie aanwezig is (Figuur 6.1., plaat I; de indigo-gekleurde vlek net onder het midden ( $R_f$ -waarde 0,4) van het chromatogram). Nader onderzoek waarbij het inhoudsstoffen-patroon wordt vergeleken met specifieke referenties is echter noodzakelijk om de precieze samenstelling van de vluchtige olie vast te kunnen stellen. Met behulp van een tweede DLC-systeem is aangetoond dat Eimericox ook nog een alkaloid bevat dat specifiek voorkomt in één van de plantaardige bestanddelen van dit product (Figuur 6.1., plaat II en III). Dit alkaloid geeft bij

belichting met UV 254 nm uitdoving (Figuur 6.1., plaat II) en na bespuiting met jodobismutaat-reagens een oranje-bruine vlek (Figuur 6.1., plaat III) op ongeveer een derde ( $R_f$ -waarde 0,32) van het chromatogram. Kleur-reactie en positie op het chromatogram komen overeen met de referentie en maken eenduidige identificatie mogelijk [4]). De aanwezigheid van de vluchtige olie componenten en het alkaloid in Eimericox bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Eimericox (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van vijf verschillende product-charges. Uit deze analyse-certificaten blijkt het gehalte aan vluchtige olie –één van de bestanddelen in dit product– binnen nauwe grenzen constant te zijn.

### 6.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Eimericox verrijkte kippenvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Zoals verwacht mag worden, blijkt het voer dat dient als positieve controle (monensin-gesuppleteerd) daarentegen wel positief voor ionoforen in een concentratie die gebruikelijk is voor de toepassing als additief. Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen zowel het met Eimericox verrijkte kippenvoer als het bijbehorende controle-voer remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Echter, omdat het remmende effect in beide voermonsters wordt gevonden, is het waarschijnlijk dat de groei-remming wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en niet is toe te schrijven aan de toevoeging van Eimericox. Deze veronderstelling wordt bevestigd door het feit dat een ethanol-droogextract van Eimericox geen *in vitro* antimicrobiële werking laat zien (zie ook hieronder).

### 6.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Eimericox lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 6.1.). Eimericox lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 6.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [10,11,17,18], bevat Eimericox wel duidelijk componenten die het signaal van 17 $\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 6.1.). Deze resultaten maken duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Eimericox wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudstoffen in Eimericox met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Eimericox mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

### 6.3.4. Antioxidant capaciteit

De antioxidant capaciteit van Eimericox –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat

weergegeven in Tabel 6.1.. De antioxidant capaciteit van Eimericox is hoger in de hydrofiele fractie dan in de lipofiele fractie (Tabel 6.1.). De voor Eimericox gevonden antioxidant capaciteit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen van enkele van de plantaardige bestanddelen hierin [19,20]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Eimericox kunnen verklaren. Aan de hand van literatuurgegevens is het echter aannemelijk dat fenolische componenten en alkaloiden in Eimericox, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [21,22].

De antioxidant capaciteit van het kippenvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen is eveneens bepaald. In het kippenvoer dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 59,0  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 46,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 12,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Eimericox verrijkte kippenvoer is een totale antioxidant capaciteit van 59,6  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 48,1 \pm 2,7 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 11,5 \pm 0,4 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)).

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van voer-supplementen en diervoeders zijn beschreven in de literatuur [23], ontbreekt het vooralsnog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Eimericox en het met Eimericox verrijkte kippenvoer in dit opzicht in perspectief te plaatsen. De voor Eimericox gemeten ORAC-waarden zijn –in vergelijking met ORAC-waarden van veel in humane voeding gebruikte ingrediënten [15]– in elk geval niet uitzonderlijk hoog. Toevoeging van Eimericox aan kippenvoer –in de door de fabrikant aanbevolen dosering– draagt daarnaast ook niet bij aan een significante toename van de antioxidant activiteit van de voermonsters. Dit laatste is echter ook niet het doel geweest dat de fabrikant voor ogen had bij de ontwikkeling van Eimericox.

#### 6.3.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Het ethanol-droogextract van Eimericox lijkt geen *in vitro* antimicrobiële werking te vertonen tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (cn 465) uit kippen; *E. coli* suspensies waar dit extract aan het groeimedium is toegevoegd, vertonen weinig tot geen verschil met onbehandelde *E. coli* suspensies wat betreft de bacteriële groei (Figuur 6.2.). De positieve controle (ampicilline) laat daarentegen in een dosering van 5  $\mu\text{g/ml}$  nog een volledige remming van de bacteriële groei zien (gegevens niet getoond). De waargenomen daling in het fluorescentie-sigitaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metaboliet (hydroresorufine) [24]. Omdat Eimericox vluchtige olie componenten bevat en aan dit soort stoffen over het algemeen wel een antimicrobiële activiteit toe kan worden geschreven (zie bijvoorbeeld [16]), kan het niet worden uitgesloten dat het product als zodanig of andere extracten hieruit –anders dan het hier onderzochte ethanol-droogextract– wel een antibacteriële activiteit bezitten.

#### 6.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Eimericox. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Eimericox vergelijkbaar zijn.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Eimericox verrijkt kippenvoer en het bijbehorende

controle-voer, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en is het niet toe te schrijven aan de toevoeging van Eimericox.

- Eimericox laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Eimericox ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Mogelijk kunnen de resultaten worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Eimericox is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn.

Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Eimericox waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Eimericox verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

- Eimericox bevat antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Eimericox is echter de vraag. Bij de dosering waarin Eimericox volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan antioxidanten in het diervoer.

- Het ethanol-droogextract van Eimericox heeft geen remmende werking op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *E. coli* uit kippen. Het kan echter niet worden uitgesloten dat het product als zodanig of andere extracten hieruit wel een antibacteriële activiteit bezitten.

- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen onderbouwing lijken te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Eimericox op de darmgezondheid van kippen, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat Eimericox onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat Eimericox wel degelijk een gunstige invloed heeft op de darmgezondheid en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose. Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van Eimericox op *Eimeria*-soorten echter niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om dit kruidenproduct nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. Uit de resultaten van dit *in vitro* onderzoek kan dan ook alleen worden geconcludeerd dat het ethanol-droogextract van Eimericox waarschijnlijk geen effect heeft bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Mogelijk heeft het product als zodanig wel een remmende werking op de groei van *E. coli* en zou het dus ook werkzaam kunnen zijn in deze gevallen. Nader onderzoek zal dit moeten bevestigen.

## 6.5. Dankbetuiging

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde,

Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit de kip.

## 6.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (coccidiose-*challenge*). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Wagner H, Blattl S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):149-93.
- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Fenugreek, trigonellae foenugraeci semen* (01/2008:1323).
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 13 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 14 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 15 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using

- randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 16 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
  - 17 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
  - 18 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
  - 19 Jung K, Richter J, Kabrodt K, Lücke IM, Schellenberg I, Herrling T. The antioxidant power AP –a new quantitative time dependent (2D) parameter for the determination of the antioxidant capacity and reactivity of different plants. *Spectrochim. Acta* 2006;63(A):846-50.
  - 20 Schmeda-Hirschmann G, Rodriguez JA, Theoduloz C, Astudillo SL, Feresin GE, Tapia A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. (Boldo). *Free Radic. Res.* 2003;37(4):447-52.
  - 21 O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem. Biol. Interact.* 2006;159:1-17.
  - 22 Rababah TM, Hettiarachchy NS, Horax R. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:5183-6.
  - 23 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
  - 24 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.



**Tabel 6.1.:** Antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Eimericox.

<b>Eimericox</b>		
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	425,0 ± 4,8 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	40,0 ± 4,9 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Totale ORAC-waarde	465,0 µmol TE/g <sup>b</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>e</sup>

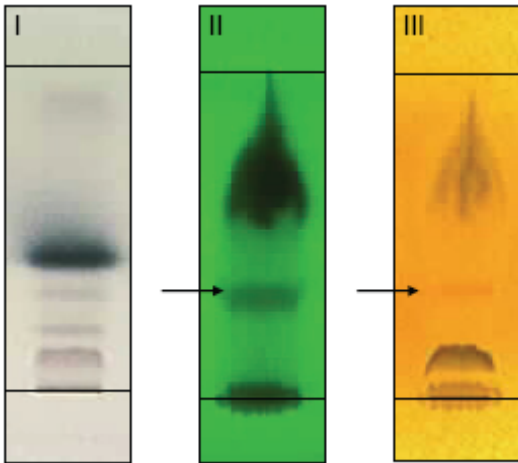
<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>b</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiele)} + ORAC_{(lipofiele)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

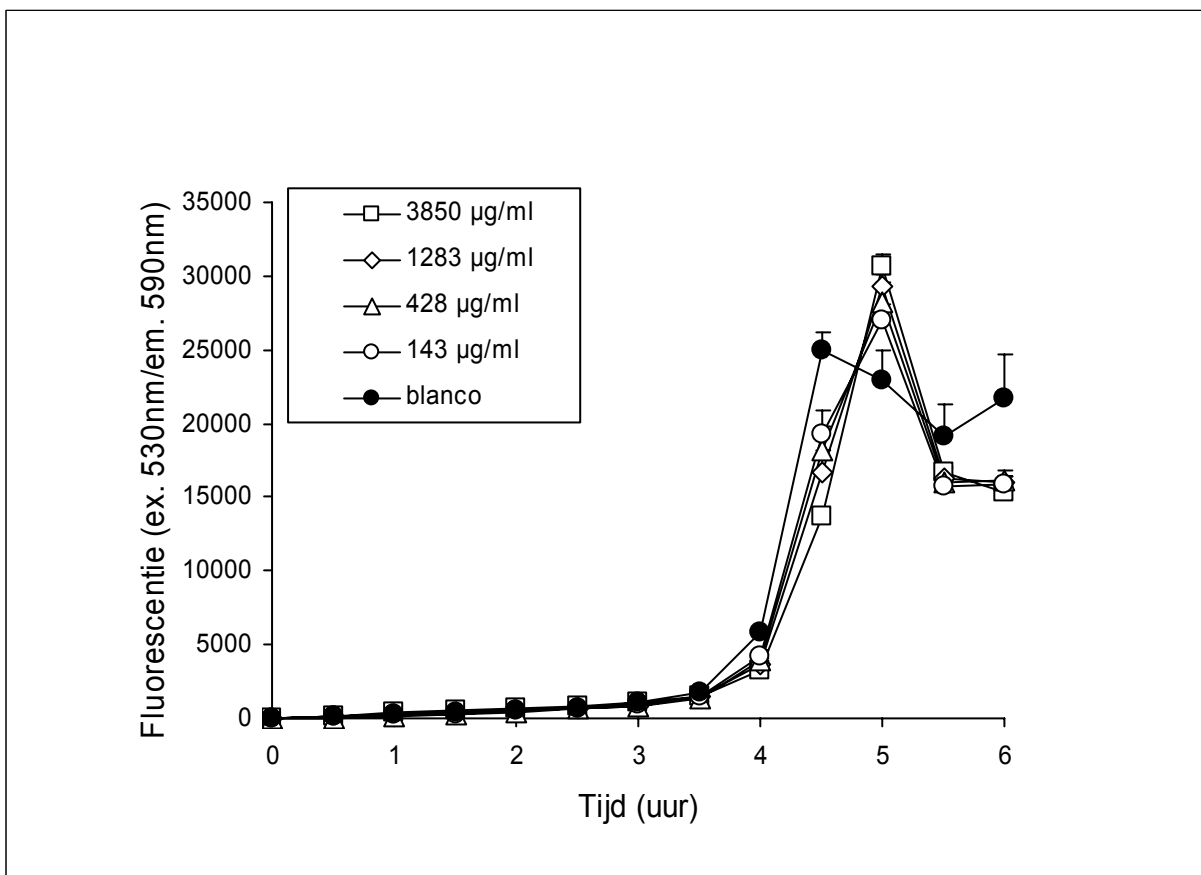
<sup>c</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.

<sup>d</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

<sup>e</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product.



**Figuur 6.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Eimericox aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. *Platen II en III:* DLC-systeem voor het aantonen van een alkaloid dat specifiek voorkomt in één van de plantaardige bestanddelen van Eimericox: Silica 60 F254; methanol/water (7/3 v/v); UV-254nm (plaat II) en jodobismutaat-reagens (plaat III). De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met trigonelline.



**Figuur 6.2.:** Effect van het ethanol-droogextract van Eimericox op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).

## 7. ENTEROGUARD

### 7.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vijf kruidenproducten geselecteerd die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) bij leghennen. Eén van deze producten is Enteroguard waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het een gunstige invloed heeft op de darmlesies en mortaliteit ten gevolge van de *Eimeria*-besmettingen en/of de *Eimeria*-oöcysten belasting in de mest en/of de voederinname, voederconversie of groei [1]. Enteroguard is in een gecontroleerde *challenge*-proef onderzocht op bovengenoemde parameters bij met verschillende *Eimeria*-soorten besmette leghennen en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Enteroguard nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 7.2. Materiaal en methoden

#### 7.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Enteroguard aanwezige inhoudsstoffen. Enteroguard is in eerste instantie onderzocht op de aanwezigheid van voor knoflook karakteristieke inhoudsstoffen omdat het product volgens de producent/importeur deze plant bevat. Hiertoe is enerzijds gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode voor de kwalitatieve analyse van allicin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide) [3]. In het kort, Enteroguard wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens). Anderzijds is de aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren in Enteroguard onderzocht omdat dit ook belangrijke inhoudsstoffen in knoflook zijn. Hiertoe is gebruik gemaakt van de in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4]. In het kort, Enteroguard wordt gemengd met methanol en gedurende 1 min geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens).

Enteroguard is verder onderzocht met behulp van een algemeen protocol voor de analyse van (componenten uit) vluchtige oliën [5] omdat dit product volgens opgaaf van de producent/importeur ook deze bestanddelen bevat. In het kort, Enteroguard wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Enteroguard (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

### 7.2.2 Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Enteroguard verrijkte kippenvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 7.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [6,7,8,9]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [10].

Enteroguard is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Enteroguard is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [11,12]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Enteroguard wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het

extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50 µl 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17β-estradiol) of androgeen (17β-testosteron) toegevoegd waarna 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 7.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [13,14]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [13,14].

Enteroguard, het Enteroguard verrijkte kippenvoer en controle kippenvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [15]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [16]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [13,14].

#### 7.2.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [17].

Enteroguard is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (collectienummer 465) uit kippen. Hiertoe is Enteroguard met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met ethanol waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdampers weer is afgedampt en het residu vervolgens nog is gevriesdroogd. Van dit ethanol-droogextract zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (cn 465) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [17]. Bacteriegroei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 7.3. Resultaten en discussie

#### 7.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat in Enteroguard voor knoflook specifieke inhoudsstoffen aanwezig zijn. Enteroguard blijkt geen thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan te bevatten; in het desbetreffende chromatogram zijn namelijk geen vlekken detecteerbaar die de voor deze stoffen karakteristieke oranje-bruine kleur-reactie geven (Figuur 7.1., plaat I) [3]. Enteroguard bevat daarentegen wel cysteïne-sulfoxide derivaten, met name alliïne, en mogelijk nog andere zwavelhoudende aminozuren. Dit is aangetoond met een tweede DLC-systeem waarin de roze-paars gekleurde vlek in het middelste deel van het chromatogram ( $R_f$ -waarde 0,5) overeenkomt met alliïne (Figuur 7.1., plaat II) [4]. De slechte ontwikkeling van deze voor alliïne karakteristieke vlek is waarschijnlijk te wijten aan de versturende invloed van andere (lipofiele) inhoudsstoffen in Enteroguard. De aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten is in overeenstemming met eerder gepubliceerde beschrijvingen van de inhoudsstoffen in knoflook(extracten) [18,19,20]. Naast de voor knoflook specifieke inhoudsstoffen zijn in Enteroguard ook verschillende vluchtige olie componenten aangetoond (Figuur 7.1., plaat III [5]). Nader onderzoek waarbij het inhoudsstoffen-patroon wordt vergeleken met specifieke referenties is echter noodzakelijk om de precieze samenstelling van de vluchtige olie vast te kunnen stellen. De aanwezigheid van inhoudsstoffen uit knoflook en vluchtige olie componenten bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Enteroguard (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van drie verschillende product-charges van beide plantaardige bestanddelen. Uit deze analyse-certificaten blijkt het gehalte van voor deze planten karakteristieke inhoudsstoffen slechts in zeer geringe mate te variëren. Daarnaast bevatten de analyse-certificaten gegevens over de nutritionele waarde van Enteroguard (onder meer eiwit-, vet- en suikergehalte) en wordt aangetoond dat potentiële verontreinigingen (waaronder verschillende zware metalen en micro-organismen) afwezig zijn.

#### 7.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Enteroguard verrijkte kippenvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Zoals verwacht mag worden, blijkt het voer dat dient als positieve controle (monensin-gesuppleerd) daarentegen wel positief voor ionoforen in een concentratie die gebruikelijk is voor de toepassing als additief. Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen zowel het met Enteroguard verrijkte kippenvoer als het bijbehorende controle-voer remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Echter, omdat het remmende effect in beide voermonsters wordt gevonden, is het waarschijnlijk dat de groei-remming wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf. Mogelijk draagt de toevoeging van Enteroguard aan het voer wel bij aan het remmende effect op de bacteriële groei omdat –ondanks het feit dat het ethanol-droogextract van Enteroguard geen *in vitro* antimicrobiële werking laat zien (zie hieronder)– voor dit product in eerdere instantie wel een antibacteriële activiteit is waargenomen [21].

### 7.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Enteroguard lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 7.1. en Figuren 7.2. en 7.3.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [11,12,22,23], bevat Enteroguard wel duidelijk componenten die het signaal van  $17\beta$ -estradiol in de OGT-test verlagen/onderdrukken en componenten die het signaal van  $17\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 7.1. en Figuren 7.2. en 7.3.). Deze bevindingen maken duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit van Enteroguard wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de OGT- en AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudstoffen in Enteroguard met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Wellicht kan ook nog een eerder voor inhoudstoffen uit knoflook, één van de bestanddelen in Enteroguard, gerapporteerde verhoging van de testosteron-afbraak –leidend tot testosteron-metabolieten die niet meer in staat zijn tot activatie van de androgeen-receptor– de gevonden resultaten (deels) verklaren [24]. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende activiteit van Enteroguard mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudstoffen met oestrogeen- en androgeen-antagonerende activiteit kunnen de uitslagen van de bepaling op de aanwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed. Dit vermoeden wordt bevestigd door reeds eerder in de literatuur gerapporteerde effecten van (inhoudstoffen uit) knoflook en kaneel op het oestrogeen- en/of androgeen-metabolisme die in tegenspraak lijken te zijn met de huidige resultaten [25,26,27].

### 7.3.4. Antioxidant capaciteit

De antioxidant capaciteit van Enteroguard –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 7.1.. De antioxidant capaciteit van Enteroguard is hoger in de hydrofiele fractie dan in de lipofiele fractie (Tabel 7.1.). Dit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen voor de plantaardige bestanddelen hierin [15]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Enteroguard kunnen verklaren. Aan de hand van literatuurgegevens is het echter aannemelijk dat verschillende zwavelhoudende verbindingen uit knoflook –één van de bestanddelen in Enteroguard– in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [28,29,30].

De antioxidant capaciteit van het kippenvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen is eveneens bepaald. In het kippenvoer dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van  $59,0 \mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 46,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 12,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Enteroguard verrijkte kippenvoer is een totale antioxidant capaciteit van  $55,3 \mu\text{mol TE}$  per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 42,6 \pm 2,0 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 12,7 \pm 0,1 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)).

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van voer-supplementen en diervoeders zijn beschreven in de literatuur [31], ontbreekt het vooralsnog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Enteroguard en het met Enteroguard verrijkte kippenvoer in dit opzicht in perspectief te plaatsen. De voor Enteroguard gemeten ORAC-waarden zijn –in vergelijking met ORAC-waarden van veel in humane voeding gebruikte ingrediënten [15]– in elk geval niet uitzonderlijk hoog. Toevoeging van Enteroguard aan

kippenvoer –in de door de fabrikant aanbevolen dosering– draagt daarnaast ook niet bij aan een toename van de antioxidant activiteit van de voermonsters. De antioxidant capaciteit van met Enteroguard verrijkt kippenvoer is zelfs iets lager dan dat van het controlevoer. Deze, in eerste instantie, onverwachte uitkomst, lijkt echter te wijten aan de normale experimentele variatie.

#### 7.3.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Het ethanol-droogextract van Enteroguard lijkt geen *in vitro* antimicrobiële werking te vertonen tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (cn 465) uit kippen; *E. coli* suspensies waar dit extract aan het groeimedium is toegevoegd, vertonen weinig tot geen verschil met onbehandelde *E. coli* suspensies wat betreft de bacteriële groei (Figuur 7.4.). De positieve controle (ampicilline) laat daarentegen in een dosering van 5 µg/ml nog een volledige remming van de bacteriële groei zien (gegevens niet getoond). De waargenomen daling in het fluorescentie-sigitaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metaboliet (hydroresorufine) [32]. Deze resultaten lijken in tegenspraak met eerdere publicaties waarin voor de plantaardige bestanddelen (of inhoudsstoffen hieruit) in Enteroguard wel antimicrobiële activiteiten tegen *E. coli* zijn beschreven [33,34,35]. Interne onderzoeken van de producent van Enteroguard hebben eveneens aangetoond dat de omzetting van alliïne in allicine leidt tot een significante antibacteriële activiteit, onder meer tegen *E. coli* [21]. Het is dan ook aannemelijk dat het product als zodanig, maar mogelijk ook andere –anders dan het hier onderzochte ethanol-droogextract– extracten van Enteroguard wel antimicrobiële activiteit bezitten.

#### 7.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Enteroguard. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Enteroguard vergelijkbaar zijn.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Enteroguard verrijkt kippenvoer en het bijbehorende controle-voer, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf maar is mogelijk ook deels toe te schrijven aan de toevoeging van Enteroguard.
- Enteroguard laat een anti-oestrogene en anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Enteroguard ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Enteroguard is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Enteroguard waargenomen anti-oestrogene en anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Enteroguard verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële



hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

- Enteroguard bevat antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Enteroguard is echter de vraag. Bij de dosering waarin Enteroguard volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan antioxidanten in het diervoer.

- Het ethanol-droogextract van Enteroguard heeft geen remmende werking op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *E. coli* uit kippen. Het is echter aannemelijk dat het product als zodanig, maar mogelijk ook andere extracten van Enteroguard wel antimicrobiële activiteit bezitten.

- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen onderbouwing lijken te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Enteroguard op de darmgezondheid van kippen, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat Enteroguard onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat Enteroguard wel degelijk een gunstige invloed heeft op de darmgezondheid en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose. Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van Enteroguard op *Eimeria*-soorten echter niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om dit kruidenproduct nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. Uit de resultaten van dit *in vitro* onderzoek kan dan ook alleen worden geconcludeerd dat het ethanol-droogextract van Enteroguard waarschijnlijk geen effect heeft bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Omdat voor het product als zodanig wel een remmende werking op de groei van *E. coli* is waargenomen, zou Enteroguard desalniettemin werkzaam kunnen zijn in deze gevallen. Nader onderzoek zal dit moeten bevestigen.

### **7.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit de kip.

### **7.6. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (coccidiose-*challenge*). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Wagner H, Blattl S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):291-303.

- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Garlic powder, allii sativi bulbi pulvis* (01/2008:1216).
- 5 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):149-93.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 8 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 9 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 10 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 11 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 12 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 13 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 14 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 15 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 17 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 18 Wereld Gezondheids Organisatie. Monografie: *Bulbus allii sativi*. In: WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva; 1999 (deel 1):16-32.
- 19 Brace LD. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L). *J. Cardiovasc. Nurs.* 2002;16(4):33-49.
- 20 Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 2006;136:716S-25S.
- 21 Van der Aa, ACM. Persoonlijke communicatie.

- 22 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
- 23 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
- 24 Pinto JT, Qiao C, Xing J, Suffoletto BP, Schubert KB, Rivlin RS, Huryk RF, Bacich DJ, Heston WDW. Alterations of prostate biomarker expression and testosterone utilization in human LNCaP prostatic carcinoma cells by garlic-derived S-allylmercaptocysteine. *Prostate* 2000;45:304-14.
- 25 Al-Bekairi AM, Shah AH, Qureshi S. Effects of *Allium sativum* on epididymal spermatozoa, estradiol-treated mice and general toxicity. *J. Ethnopharmacol.* 1990;29:117-25.
- 26 Mukherjee M, Das AS, Das D, Mukherjee S, Mitra S, Mitra C. Role of peritoneal macrophages and lymphocytes in the development of hypogonadal osteoporosis in an ovariectomized rat model: possible phytoestrogenic efficacy of oil extract of garlic to preserve skeletal health. *Phytother. Res.* 2007;21:1045-54.
- 27 Lee KH, Choi EM. Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* Blume on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother. Res.* 2006;20:952-60.
- 28 Okada Y, Tanaka K, Fujita I, Sato E, Okajima H. Antioxidant activity of thiosulfates derived from garlic. *Redox Rep.* 2005;10(2):96-102.
- 29 Okada Y, Tanaka K, Sato E, Okajima H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. *Org. Biomol. Chem.* 2006;4(22):4113-7.
- 30 Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food.* 2006;9(2):205-13.
- 31 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
- 32 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 33 Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999;1(2):125-9.
- 34 Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62(11):4238-42.
- 35 Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 2006;6:39.

**Tabel 7.1:** Antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Enteroguard.

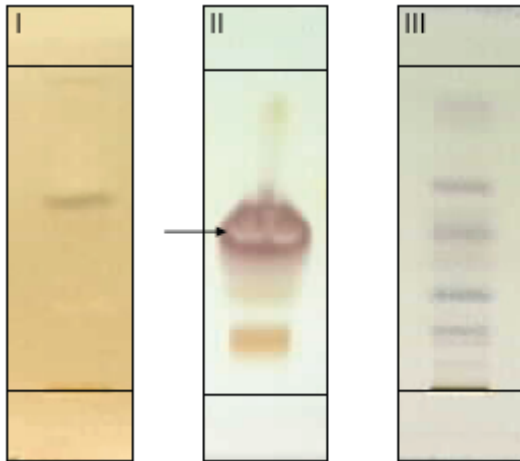
<b>Enteroguard</b>		
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	82,5 ± 3,4 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	28,0 ± 0,6 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Totale ORAC-waarde	110,5 µmol TE/g <sup>b</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>d</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

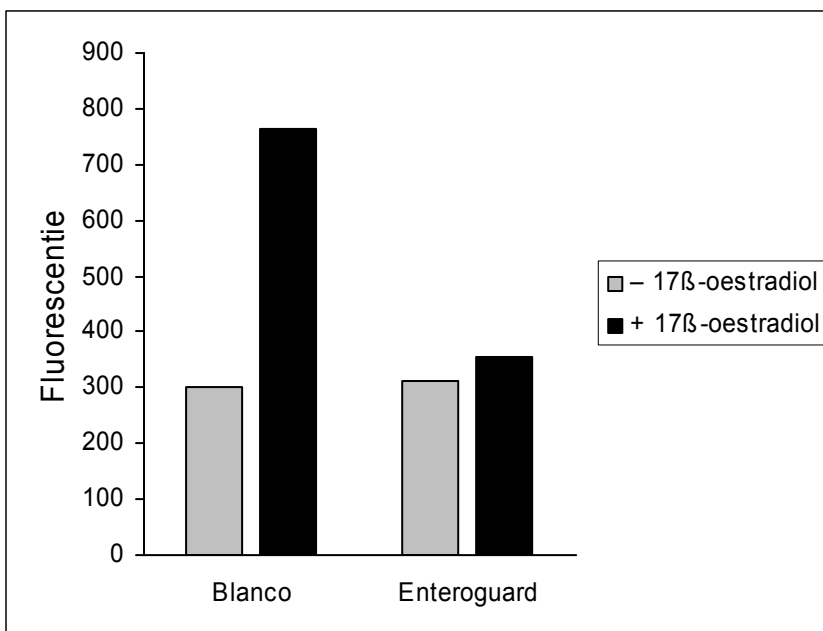
<sup>b</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

<sup>c</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

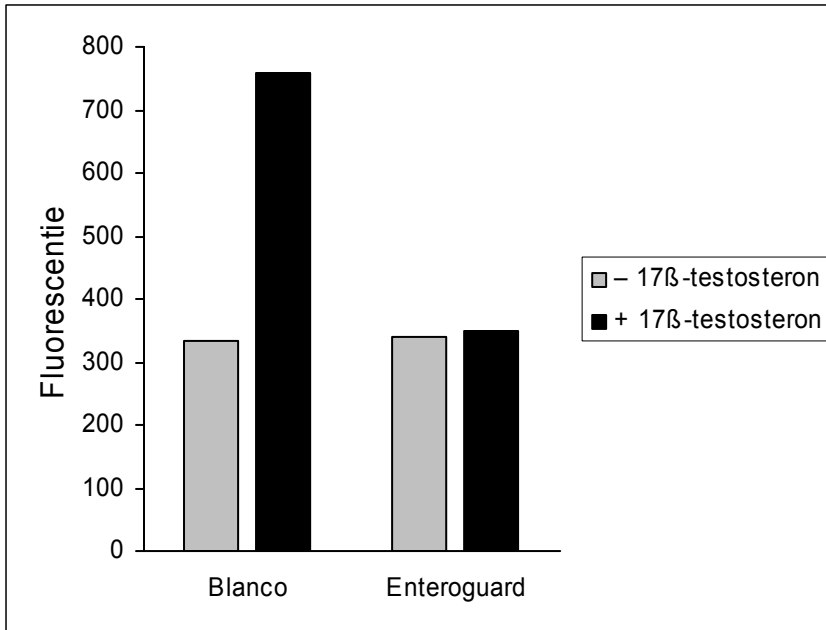
<sup>d</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



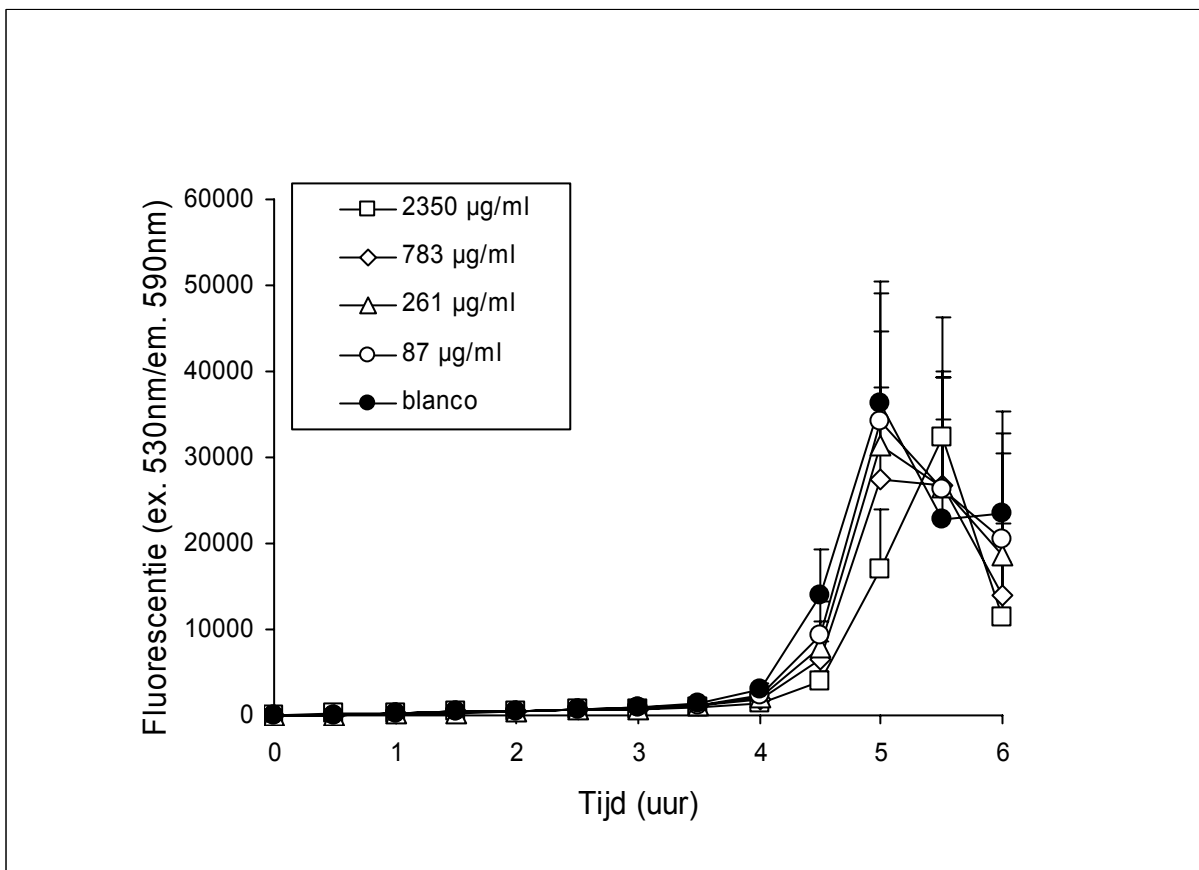
**Figuur 7.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Enteroguard aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van alliin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide): Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren: Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met alliïne. *Plaat III:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens.



**Figuur 7.2.:** Oestrogeen-antagonerende activiteit van Enteroguard.



**Figuur 7.3.:** Androgeen-antagonerende activiteit van Enteroguard.



**Figuur 7.4.:** Effect van een ethanol-droogextract van Enteroguard op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).

## 8. MICROBIOTICUM

### 8.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn drie kruidenproducten geselecteerd die mogelijk kunnen bijdragen aan het verbeteren van de uiergezondheid bij koeien. Eén van deze producten is Microbioticum waarmee melkveehouders in de praktijk positieve ervaringen hebben opgedaan [1]. Microbioticum is onderzocht in een praktijkproef bij koeien met een verhoogd celgetal en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Microbioticum nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 8.2. Materiaal en methoden

#### 8.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Microbioticum aanwezige inhoudsstoffen. Hiertoe is gebruik gemaakt van de in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode voor één van de hoofdbestanddelen in Microbioticum [3]. Omdat het plantenmateriaal in de vorm van extracten in Microbioticum aanwezig is, wordt het onverdunde product direct op de DLC-plaat aangebracht, geanalyseerd (Silica 60 F254; ethyl acetaat/methyl ethylketon/water/mierenzuur (5/3/1/1 v/v); natuurstof-reagens) en vergeleken met de referenties hyperosid, rutin, chlorogeenzuur en koffiezuur.

Verder is Microbioticum onderzocht op de aanwezigheid van fenylpropan- en lignaan-derivaten die specifiek voorkomen in één van de andere plantaardige (hoofd)bestanddelen van dit product. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4] en wordt het onverdunde product direct op de DLC-plaat aangebracht, geanalyseerd (Silica 60 F254; dichloormethaan/methanol/water (70/30/4 v/v); anijaldehyde-reagens) en vergeleken met de referenties esculin, catalpol,  $\alpha$ -bisabolol en chamazuleen.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Microbioticum (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 8.2.2. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [9].

Microbioticum is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Microbioticum is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Microbioticum wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50 µl 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17β-estradiol) of androgeen (17β-testosteron) toegevoegd waarna 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 8.2.3. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [12].

Microbioticum is onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe is Microbioticum direct verdund met een 3% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [13,14]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [12] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

#### 8.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïn geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïn waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [15,16]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [15,16].

Microbioticum is onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde is Microbioticum direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15,16]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde is Microbioticum geëxtraheerd met een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel. Na indampen van de lipofiele fase is het residu opgenomen in aceton, verder verdund in een 7%



(g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [17].

#### 8.2.5. *Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metabolieten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsignaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door PMN's [18,19].

Microbionicum is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Microbionicum van ethanol ontdaan door dit oplosmiddel onder verlaagde druk af te dampen en het residu te vriesdrogen. Van de droogrest zijn concentratie-reeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze concentratie-reeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-signaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [20]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door concentratie-reeksen van de Microbionicum-droogrest gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [21,22].

#### 8.2.6. *Effect op biofilm-formatie door Staphylococcus aureus*

Het effect van een (planten)stof of extract op de vorming van een beschermend kapsel van polysacchariden (biofilm) door bepaalde typen bacteriën kan worden gemeten met behulp van de biofilm-formatie test. Bij deze test wordt de door de bacteriën gevormde biofilm aangekleurd met safranine. De intensiteit van kleuring kan spectrofotometrisch worden bepaald en is een maat voor de hoeveelheid biofilm die is gevormd [23].

Microbionicum is onderzocht op eventuele effecten op de biofilm-formatie door de *Staphylococcus aureus* stam BMA/FR/032/0074 [24,25]. Hiertoe is Microbionicum van ethanol ontdaan door dit oplosmiddel onder verlaagde druk af te dampen en het residu te vriesdrogen. Van de droogrest zijn concentratie-reeksen in TSBg-groeimedium gemaakt. Deze concentratie-reeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074). De safranine-kleuring is vervolgens uitgevoerd volgens een eerder beschreven protocol [25] waarna de gevormde hoeveelheid biofilm is gekwantificeerd door de absorptie bij 540 nm te meten. Mogelijke beïnvloeding van de bacteriële groei (antimicrobiële activiteit) is bepaald door concentratie-reeksen van de Microbionicum-droogrest gedurende 16 uur te incuberen bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [26]. Bacterie-groei is hierbij gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 8.3. Resultaten en discussie

#### 8.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat het inhoudsstoffenpatroon van Microbionicum overeenkomsten vertoont met het profiel zoals dat is beschreven voor één van de plantaardige hoofdbestanddelen hierin (Figuur 8.1., plaat I). Met name de twee sterk wit/blauw fluorescerende vlekken (met  $R_f$ -waarden van 0,5 en 0,9) en een zwak geel/oranje vlek ( $R_f$ -waarde 0,25) tonen de identiteit van dit bestanddeel aan [3]. De aanwezigheid van andere planten(extracten) kan uit hetzelfde chromatogram worden afgeleid op basis van de aanwezigheid van onder meer een oranje fluorescerende vlek ( $R_f$ -waarde 0,3) die overeenkomt met rutin en enkele geel-groen fluorescerende vlekken laag op het chromatogram (Figuur 8.1., plaat I; de laatst genoemde vlekken zijn met het oog duidelijk zichtbaar maar worden fotografisch slecht gereproduceerd) [27,28]. Met behulp van een tweede DLC-systeem is ook de aanwezigheid van fenylpropaan- en lignaan-derivaten aangetoond die specifiek voorkomen in één van de andere plantaardige (hoofd)bestanddelen van Microbionicum (Figuur 8.1., plaat II) [4]. Het inhoudsstoffenpatroon zoals dat is verkregen met deze twee DLC-systemen bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

Door de producent zijn verschillende analyse-rapporten aangeleverd ter onderbouwing van de reproduceerbaarheid van het productieproces van Microbionicum (*batch-to-batch consistency*). De verstrekte gegevens zijn echter vooralsnog van dien aard dat hieruit niet eenduidig geconcludeerd kan worden dat de samenstelling van Microbionicum per productie-charge constant is; met name omdat geen enkele inhoudsstof in het mengsel wordt geïdentificeerd en het inhoudsstoffenpatroon (het chromatogram) per productie-charge kwalitatief en/of kwantitatief varieert.

#### 8.3.2. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Microbionicum lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 8.1.). Microbionicum lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 8.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoeders, melkpoeders en droge diervoeders [10,11,29,30], bevat Microbionicum wel duidelijk componenten die het signaal van  $17\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 8.1.). Deze bevinding is in overeenstemming met literatuurgegevens waarin aan *Echinacea purpurea*, één van de bestanddelen in Microbionicum, een anti-androgene werking wordt toegeschreven [31,32]. Deze resultaten maken tevens duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Microbionicum wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Microbionicum met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Microbionicum mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

#### 8.3.3. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Microbionicum staat weergegeven in Tabel 8.1.. De gemeten waarde komt enigszins overeen met een eerder in de literatuur gerapporteerd totaal fenol-gehalte van een tinctuur van het kruid van *Echinacea purpurea*, één van de

hoofdcomponenten in Microbioticum [33]. Bij de interpretatie van deze gegevens dient echter de nodige voorzichtigheid te worden betracht omdat andere plantaardige componenten die aanwezig zijn in Microbioticum mogelijk ook een bijdrage leveren aan het totaal fenolen-gehalte van dit preparaat. Daarnaast kunnen andere –niet-fenolische– inhoudsstoffen in Microbioticum mogelijk ook interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zodoende de gevonden waarde voor het totaal fenolen-gehalte beïnvloeden.

Op basis van het voor Microbioticum gemeten totale fenolen-gehalte kan worden berekend dat in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal per dag ruim 60 mg fenolische verbindingen extra wordt toegediend aan de dieren in de met Microbioticum behandelde groep (bij gebruik van dagelijks 1 ml/18 kg lichaamsgewicht Microbioticum conform het onderzoeksprotocol). In vergelijking met de normale dagelijkse inname van fenolische verbindingen uit het voer (alleen al voor voederbrokken geschat op ruim 10 g/kg) is deze additionele bron van fenolen verwaarloosbaar klein; dit zal dan ook geen consequenties hebben voor de totale nutritionele waarde van het koeivoer.

De antioxidant capaciteit van Microbioticum –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 8.1.. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan momenteel niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de antioxidant capaciteit van Microbioticum kunnen verklaren. Het is wel aannemelijk dat de fenolische verbindingen in Microbioticum, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan deze werking [13,14].

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van diervoeders en voer-supplementen zijn beschreven in de literatuur [34], ontbreekt het vooralsnog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Microbioticum in dit opzicht in perspectief te plaatsen. Het is echter wel duidelijk dat de antioxidant capaciteit van Microbioticum in vergelijking met de normale dagelijkse inname van antioxidanten via het voer gering is. Zo komt de in de praktijk-proef bij koeien gebruikte dosering van Microbioticum overeen met ongeveer 1,4 mmol Trolox-equivalenten (= ORAC<sub>totaal</sub>; bij gebruik van dagelijks 1 ml/18 kg lichaamsgewicht Microbioticum, conform het onderzoeksprotocol) terwijl de totale antioxidant capaciteit van voederbrokken alleen al wordt geschat op ruim 150 mmol Trolox-equivalenten per kilogram.

#### *8.3.4. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

In de concentratie-reeks die is getest, laat Microbioticum geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Microbioticum vertoont wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuur 8.2.). De IC50-waarde van Microbioticum (de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-sigitaal 50% wordt geremd) is in deze test  $1,7 \pm 0,3$  µl/ml (gemiddelde  $\pm$  SD; n = 3 experimenten). De remming van het chemiluminescentie-sigitaal is niet toe te schrijven aan een toxische werking van Microbioticum op de PMN's omdat de omzetting van resazurine niet negatief wordt beïnvloed en de metabole activiteit van deze cellen dus intact is (Figuur 8.2.). Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-sigitaal daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of dat Microbioticum alleen reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten wegvangt. Literatuurgegevens ontbreken in dit opzicht. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapolbaar zijn naar PMN's van de koe.

Nader onderzoek moet ook duidelijk maken of het hier waargenomen effect op het functioneren van de PMN relevant is in verband met de voor Microbioticum gedeclareerde positieve beïnvloeding van de uiergezondheid. PMN's behoren namelijk tot de eerste-lijns afweer tegen in de uier binnendringende bacteriën door deze te fagocyteren en te doden met behulp van, onder meer, reactieve zuurstof-metabolieten [35,36,37]. Remming van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten of het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten door Microbioticum, lijkt in dit verband dan ook negatieve gevolgen te kunnen hebben voor deze afweer-respons. Daarentegen is overmatige of langdurige productie van reactieve zuurstof-metabolieten in de uier gerelateerd aan cellulaire beschadigingen van de melkklier, een verlaging van de melkproductie en verslechtering van de melk-kwaliteit [37,38,39]. In dit opzicht kan de voor Microbioticum gevonden activiteit dan weer wel een positieve uitwerking hebben op de uier. Met name ook omdat een verminderd vrijkomen van reactieve zuurstof-metabolieten in het klierweefsel en de melk de behoefte aan endogene en exogene antioxidanten verlaagt. Dit heeft weer een gunstige uitwerking op de antioxidant-status in de uier en hiermee op de uiergezondheid [40,41].

#### 8.3.5. *Effect op biofilm-formatie door Staphylococcus aureus*

Microbioticum vertoont een dosis-afhankelijk effect op de biofilm-formatie door *St. aureus*. Bij een hoge dosering van Microbioticum lijkt de biofilm-formatie te worden geremd (Figuur 8.3.). Nader onderzoek moet uitwijzen of bij deze dosering van Microbioticum daadwerkelijk de vorming van een biofilm wordt geremd of dat het gevonden effect eerder is toe te schrijven aan een directe antibacteriële activiteit, met name omdat Microbioticum in een vergelijkbaar doseringsbereik ook een duidelijke inhibitie van de bacteriële groei van *St. aureus* laat zien (Figuur 8.4.). Bij lagere doseringen van Microbioticum, lijkt sprake te zijn van een verhoogde biofilm-formatie. Hier lijkt echter sprake van een artefact en lijkt het waarschijnlijk dat de verhoogde kleurreactie het gevolg is van incorporatie in de biofilm van polysacchariden of chromoforen uit Microbioticum zelf. Voor zover kan worden nagegaan, is dit de eerste keer dat voor Microbioticum of de plantaardige bestanddelen hierin een mogelijke remmende werking op de biofilm-formatie wordt beschreven.

#### 8.4. *Conclusies en samenvatting*

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Microbioticum. Het is daarentegen vooralsnog niet eenduidig aangetoond dat de samenstelling van Microbioticum per product-charge constant is.
- Microbioticum laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Microbioticum ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Microbioticum is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Microbioticum waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die dit product toegediend krijgen; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).
- Microbioticum bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Microbioticum is echter de vraag omdat de hoeveelheid

fenolen en antioxidanten in Microbioticum –in vergelijking met de inname via het diervoer–  
gering is.

- Microbioticum vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).
- Microbioticum vertoont een dosis-afhankelijke remming van de biofilm-formatie door *St. aureus*. Nader onderzoek moet uitwijzen of Microbioticum daadwerkelijk de vorming van biofilms vertraagt of dat het gevonden effect is gerelateerd aan de antibacteriële werking van Microbioticum.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Microbioticum op de uiergezondheid, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Microbioticum en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in het lichaam van de koe daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.

### 8.5. Dankbetuiging

Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr M. Melchior en Prof. Dr J. Fink-Gremmels van de afdeling Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *St. aureus* stam BMA/FR/032/0074.

### 8.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 2: uiergezondheid (fytotherapie en celgetal). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Purple coneflower herb, echinaceae purpureae herba* (01/2008:1823).
- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Eleutherococcus, eleutherococci radix* (01/2008:1419).
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.

- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 13 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric.Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 14 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric.Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 15 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 17 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 18 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
- 19 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
- 20 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
- 21 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 22 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
- 23 Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988;7(1):30-3.

- 24 Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B* 2006;53:326-32.
- 25 Hensen SM. Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis, bacterial adhesion and invasion in relation to pathogenesis and antimicrobial sensitivity. Proefschrift Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht; 2000.
- 26 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 27 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Matricaria liquid extract, matricariae extractum fluidum* (01/2008:1544).
- 28 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Wild pansy (flowering aerial parts), violae herba cum flore* (01/2008:1855).
- 29 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
- 30 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
- 31 Skaudickas D, Kondrotas AJ, Baltrusaitis K, Vaitiekaitis G. Effect of echinacea (*Echinacea purpurea* L. Moench) preparations on experimental prostate gland. *Medicina* 2003;39(8):761-6.
- 32 Skaudickas D, Kondrotas AJ, Baltrusaitis K. The effect of *Echinacea purpurea* extract on sexual glands of male rats. *Medicina* 2004;40(12):1211-8.
- 33 Masteikova R, Muselik J, Bernatoniene J, Bernatoniene R. Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures. *Medicina* 2007;43(4):306-9.
- 34 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
- 35 Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 2004;87:4150-62.
- 36 Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2002;7(2):109-21.
- 37 Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 2003;34:521-64.
- 38 Kehrl ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1994;77:619-27.
- 39 Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet. Res.* 2003;34:629-45.
- 40 Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J. Anim. Sci.* 1997;75:1659-65.
- 41 Erskine RJ. Nutrition and mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1993;9(3):551-61.

**Tabel 8.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Microbioticum.

<b>Microbioticum</b>		
Totaal fenolen-gehalte		2073 ± 252 µg GZE/ml <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	41,9 ± 2,5 µmol TE/ml <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	6,2 ± 0,1 µmol TE/ml <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	48,1 µmol TE/ml <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten.

<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

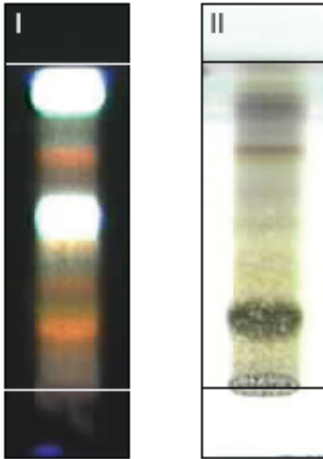
<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiele)} + ORAC_{(lipofiele)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

<sup>d</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 33 mg product.

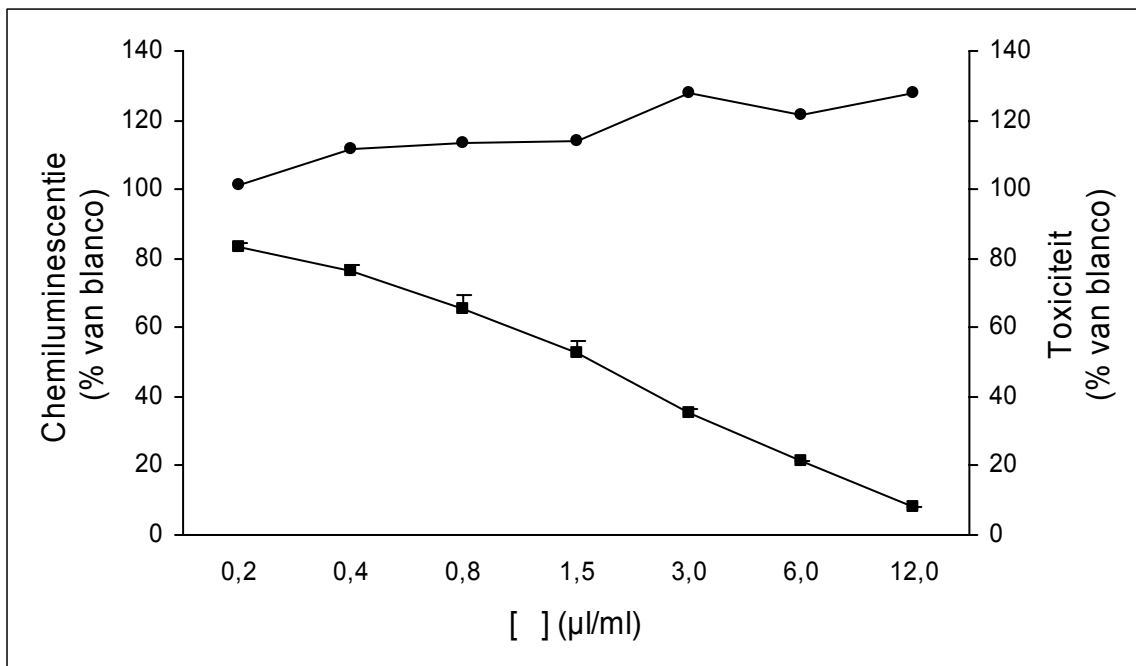
<sup>e</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

<sup>f</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product.

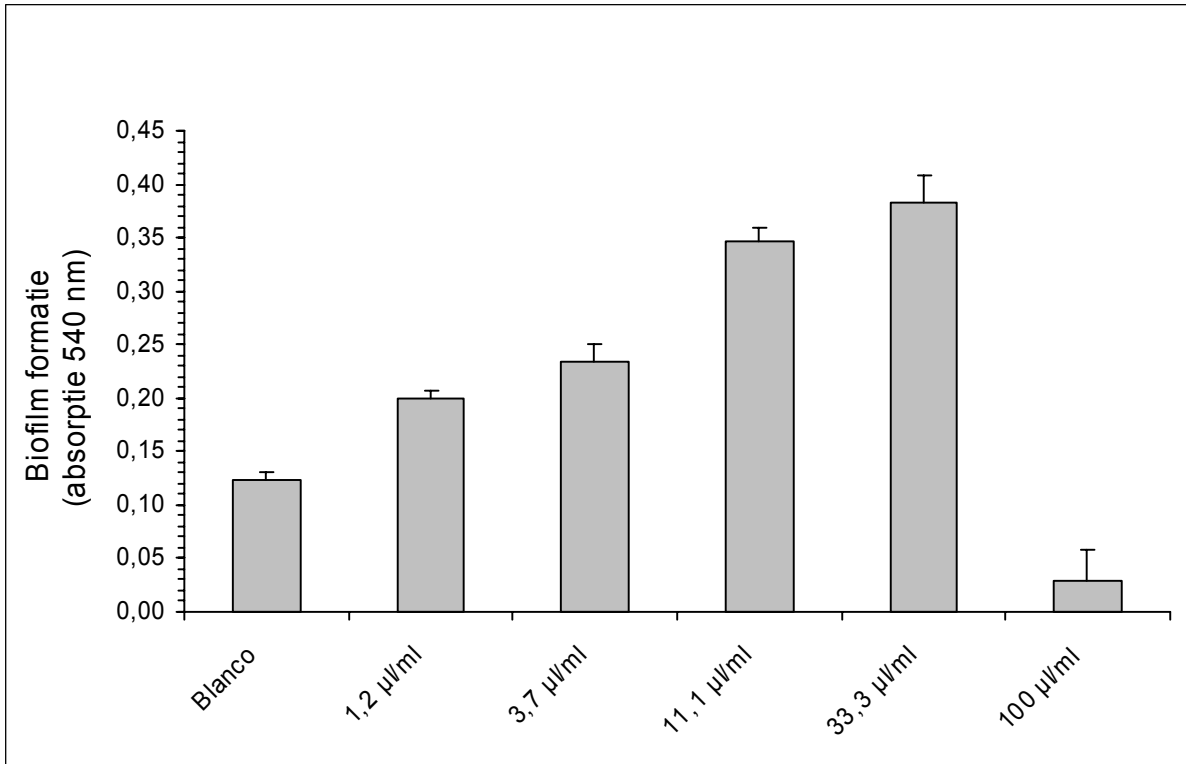




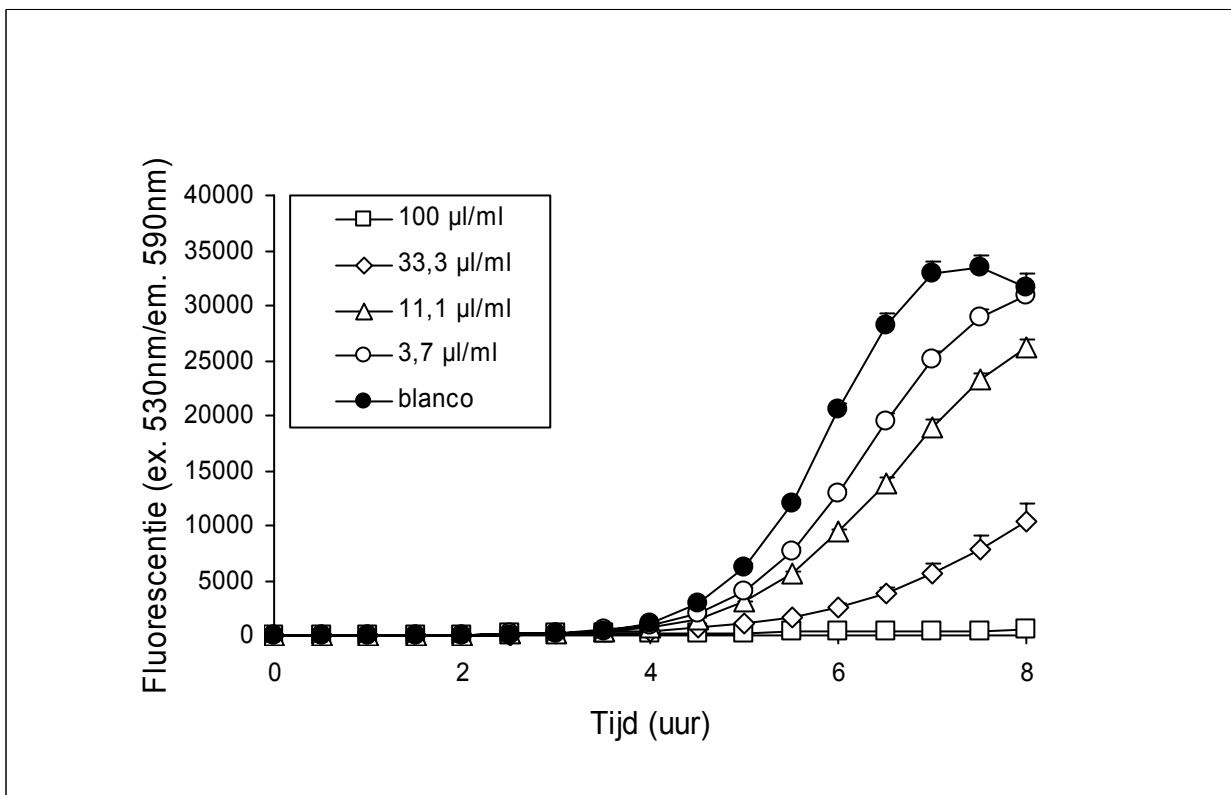
**Figuur 8.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Microbioticum aanwezige plantaardige bestanddelen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van flavonoïden/fenolen in één van de hoofdbestanddelen in Microbioticum: Silica 60 F254; ethyl acetaat/methyl ethylketon/water/mierenzuur (5/3/1/1 v/v); natuurstofreagens. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van fenylpropaan- en lignaan-derivaten die specifiek voorkomen in één van de andere plantaardige (hoofd)bestanddelen van Microbioticum: Silica 60 F254; dichloormethaan/methanol/water (70/30/4 v/v); anijaldehyde-reagens.



**Figuur 8.2.:** Effect van Microbioticum op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 8.3.:** Effect van Microbionicum op de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*.



**Figuur 8.4.:** Effect van Microbionicum op de bacteriële groei van *Staphylococcus aureus* (antimicrobiële activiteit).

## 9. NATUSTAT

### 9.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vijf kruidenproducten geselecteerd die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) bij leghennen. Eén van deze producten is Natustat waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het een gunstige invloed heeft op de darmlesies en mortaliteit ten gevolge van de *Eimeria*-besmettingen en/of de *Eimeria*-oöcysten belasting in de mest en/of de voederinname, voederconversie of groei [1]. Natustat is in een gecontroleerde *challenge*-proef onderzocht op bovengenoemde parameters bij met verschillende *Eimeria*-soorten besmette leghennen en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Natustat nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 9.2. Materiaal en methoden

#### 9.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Natustat aanwezige plantaardige inhoudsstoffen. Omdat het product volgens de producent/importeur een extract van een kruid bevat waarvoor in de geraadpleegde literatuur geen specifieke analyse-methoden beschikbaar waren, is Natustat geanalyseerd op het algemene voorkomen van hydrofiele inhoudsstoffen (met name flavonoïden/fenolen) en componenten uit vluchtige oliën en andere lipofiele inhoudsstoffen. Hiertoe is gebruik gemaakt van twee in de literatuur beschreven methoden [3,4]. In het kort, Natustat wordt voor de analyse van hydrofiele inhoudsstoffen (flavonoïden/fenolen) gemengd met ethanol en gedurende 10 min geëxtraheerd bij 90 °C en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens). Voor de analyse van vluchtige olie componenten en andere lipofiele inhoudsstoffen wordt Natustat gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Natustat (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 9.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinaire toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met

behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Natustat verrijkte kippenvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 9.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [9].

Natustat is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Natustat is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoerders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Natustat wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu$ l 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 9.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [12,13]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [12,13].

Natustat, het Natustat verrijkte kippenvoer en controle kippenvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [14]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [12,13].

#### 9.2.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [16].

Natustat is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (collectienummer 465) uit kippen. Hiertoe is Natustat met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens dichloormethaan en ethanol. Deze oplosmiddelen zijn onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer afgedampt en het residu van het ethanol-extract is ook nog gevriesdroogd. Van deze dichloormethaan- en ethanol-droogextracten zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (cn 465) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [16]. Bacterie-groei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 9.3. Resultaten en discussie

#### 9.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Natustat fenolische verbindingen of andere met het natuurstof-reagens kleurende verbindingen bevat (Figuur 9.1., plaat I; blauw-fluorescerende vlekken [3]) die in algemene zin aangeven dat hydrofiele extracten en/of ruw plantenmateriaal (kunnen) zijn verwerkt in het product. Met behulp van een tweede DLC-systeem is aangetoond dat Natustat ook nog een groot aantal verschillende vluchtige olie componenten en/of andere lipofiele inhoudsstoffen bevat (Figuur 9.1., plaat I [4]). Nader onderzoek waarbij het inhoudsstoffen-patroon wordt vergeleken met specifieke referenties is

echter noodzakelijk om de precieze samenstelling van het mengsel van lipofiele inhoudsstoffen vast te kunnen stellen. Aan de hand van analyse-certificaten van de producent/importeur is daarnaast vastgesteld dat Natustat tevens organo-metaal verbindingen bevat. De aanwezigheid van zowel hydrofiele als lipofiele plantenstoffen alsmede organo-metaal verbindingen in Natustat bevestigt de door producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Natustat (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van drie verschillende product-charges. Uit deze analyse-certificaten blijkt het gehalte aan organo-metaal verbindingen binnen nauwe grenzen constant te zijn.

### 9.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Natustat verrijkte kippenvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Zoals verwacht mag worden, blijkt het voer dat dient als positieve controle (monensin-gesuppleteerd) daarentegen wel positief voor ionoforen in een concentratie die gebruikelijk is voor de toepassing als additief. Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertoont het controle-kippenvoer remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is.

### 9.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Natustat lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 9.1.). Natustat lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 9.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [10,11,17,18], bevat Natustat wel duidelijk componenten die het signaal van  $17\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 9.1.). Deze bevinding maakt duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Natustat wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Natustat met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Wellicht kan de aanwezigheid van resveratrol en op resveratrol gelijkende inhoudsstoffen uit *Yucca schidigera* –één van de plantaardige bestanddelen in Natustat– de gevonden resultaten ook (deels) verklaren [19]. Van resveratrol is namelijk bekend dat het het functioneren van de androgeen-receptor kan beïnvloeden [20]. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Natustat mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

### 9.3.4. Antioxidant capaciteit

De antioxidant capaciteit van Natustat –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 9.1.. De antioxidant capaciteit van Natustat is hoger in de hydrofiele fractie dan in de lipofiele fractie (Tabel 9.1.). De voor Natustat gevonden antioxidant capaciteit is in lijn met

eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen van één van de bestanddelen hierin [21,22]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Natustat kunnen verklaren. Aan de hand van literatuurgegevens is het echter aannemelijk dat fenolische componenten uit *Yucca schidigera* –één van de plantaardige bestanddelen in Natustat– in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [21,22]. Daarnaast zijn aan het in Natustat aanwezige spoorelement zink ook antioxidatieve werkingen toegeschreven; zo vormt zink een essentieel onderdeel van superoxide dismutase en beschermt het tegen ijzer-geïnduceerde radicaalvorming [23]. Het is momenteel echter onduidelijk of deze fysiologische antioxidatieve werking van zink de in de ORAC-test gevonden resultaten kan verklaren.

De antioxidant capaciteit van het kippenvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen is eveneens bepaald. In het kippenvoer dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 59,0 µmol Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $ORAC_{(hydrofiel)} = 46,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $ORAC_{(lipofiel)} = 12,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD (n = 2 experimenten)). In het met Natustat verrijkte kippenvoer is een totale antioxidant capaciteit van 61,7 µmol TE per gram gevonden ( $ORAC_{(hydrofiel)} = 48,5 \pm 1,7 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $ORAC_{(lipofiel)} = 13,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD (n = 2 experimenten)).

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van voer-supplementen en diervoeders zijn beschreven in de literatuur [24], ontbreekt het vooral nog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Natustat en het met Natustat verrijkte kippenvoer in dit opzicht in perspectief te plaatsen. De voor Natustat gemeten ORAC-waarden zijn –in vergelijking met ORAC-waarden van veel in humane voeding gebruikte ingrediënten [15]– in elk geval niet uitzonderlijk hoog. Toevoeging van Natustat aan kippenvoer –in de door de fabrikant aanbevolen dosering– draagt daarnaast ook niet bij aan een significante toename van de antioxidant activiteit van de voermonsters.

#### 9.3.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Natustat lijken geen *in vitro* antimicrobiële werking te vertonen tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (cn 465) uit kippen; *E. coli* suspensies waar deze extracten aan het groeimedium zijn toegevoegd, vertonen weinig tot geen verschil met onbehandelde *E. coli* suspensies wat betreft de bacteriële groei (Figuren 9.2. en 9.3.). De positieve controle (ampicilline) laat daarentegen in een dosering van 5 µg/ml nog een volledige remming van de bacteriële groei zien (gegevens niet getoond). De waargenomen daling in het fluorescentie-sigitaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metabool (hydroresorufine) [25]. Deze resultaten lijken in tegenspraak met een eerdere publicatie waarin voor een plantaardig bestanddeel (of inhoudsstoffen hieruit) in Natustat wel een beïnvloeding van de groei van *E. coli* is beschreven [26]. Het is dan ook mogelijk dat het product als zodanig of andere –anders dan de hier onderzochte dichloormethaan- en ethanol-droogextracten– extracten van Natustat wel antimicrobiële activiteit bezitten. Nader onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

#### 9.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Natustat. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Natustat vergelijkbaar zijn.

- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Natustat verrijkt kippenvoer en het bijbehorende controle-voer, vertoont de laatste toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf.
- Natustat laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Natustat ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Natustat is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Natustat waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Natustat verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).
- Natustat bevat antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Natustat is echter de vraag. Bij de dosering waarin Natustat volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan antioxidanten in het diervoer.
- Dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Natustat hebben geen remmende werking op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *E. coli* uit kippen. Het kan echter niet worden uitgesloten dat het product als zodanig of andere extracten hieruit wel een antibacteriële activiteit bezitten.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen onderbouwing lijken te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Natustat op de darmgezondheid van kippen, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat Natustat onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat Natustat wel degelijk een gunstige invloed heeft op de darmgezondheid en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose. Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van Natustat op *Eimeria*-soorten echter niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om dit kruidenproduct nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. Uit de resultaten van dit *in vitro* onderzoek kan dan ook alleen worden geconcludeerd dat de dichloormethaan- en ethanol-droogextracten van Natustat waarschijnlijk geen effect hebben bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Mogelijk heeft het product als zodanig wel een remmende werking op de groei van *E. coli* en zou het dus ook werkzaam kunnen zijn in deze gevallen. Nader onderzoek zal dit moeten bevestigen.

### **9.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van



het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit de kip.

## 9.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (coccidiose-challenge). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):195-245.
- 4 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):149-93.
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 13 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 14 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.

- 15 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 16 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
- 17 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
- 18 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
- 19 Oleszek W, Sitek M, Stochmal A, Piacente S, Pizza C, Cheeke P. Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roetzl.. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:747-52.
- 20 Harada N, Murata Y, Yamaji R, Miura T, Inui H, Nakano Y. Resveratrol down-regulates the androgen receptor at the post-translational level in prostate cancer cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2007;53:556-60.
- 21 Piacente S, Montoro P, Oleszek W, Pizza C. *Yucca schidigera* bark: phenolic constituents and antioxidant activity. *J. Nat. Prod.* 2004;67:882-5.
- 22 Olas B, Wachowicz B, Nowak P, Stochmal A, Oleszek W, Glowacki R, Bals E. Comparative studies of the antioxidant effects of a naturally occurring resveratrol analogue –*trans*-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene– and resveratrol against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. *Cell. Biol. Toxicol.* DOI 10.1007/s10565-007-9045-7.
- 23 Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 2006;80:1-9.
- 24 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
- 25 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 26 Sen S, Makkar HP, Muetzel S, Becker K. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998;27(1):35-8.

**Tabel 9.1.:** Antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Natustat.

<b>Natustat</b>		
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	77,8 ± 6,7 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	35,6 ± 2,2 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Totale ORAC-waarde	113,4 µmol TE/g <sup>b</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>e</sup>

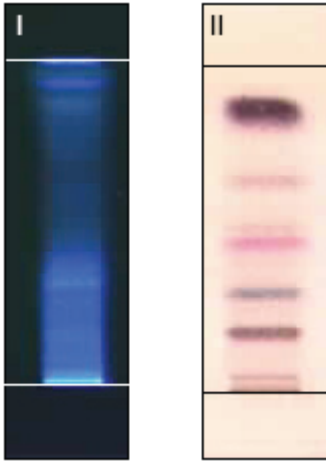
<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>b</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

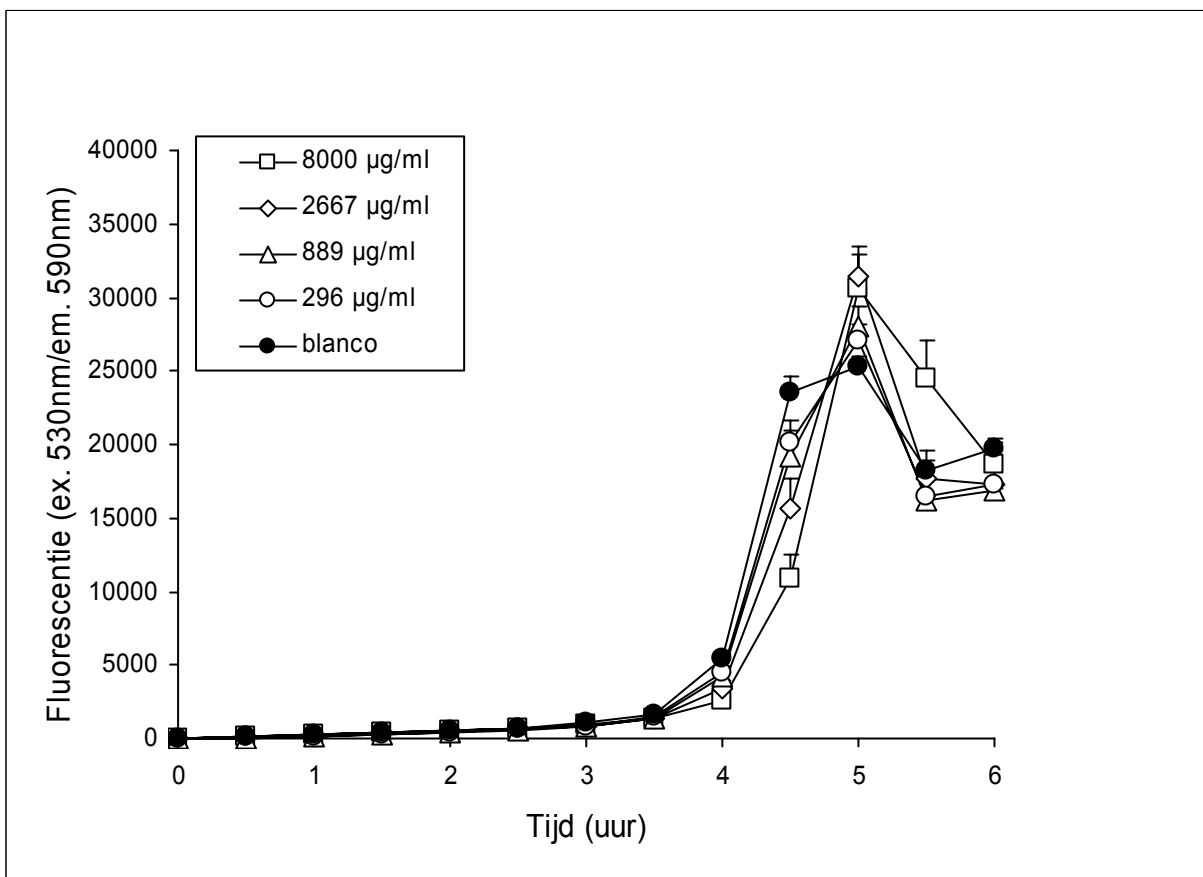
<sup>c</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.

<sup>d</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

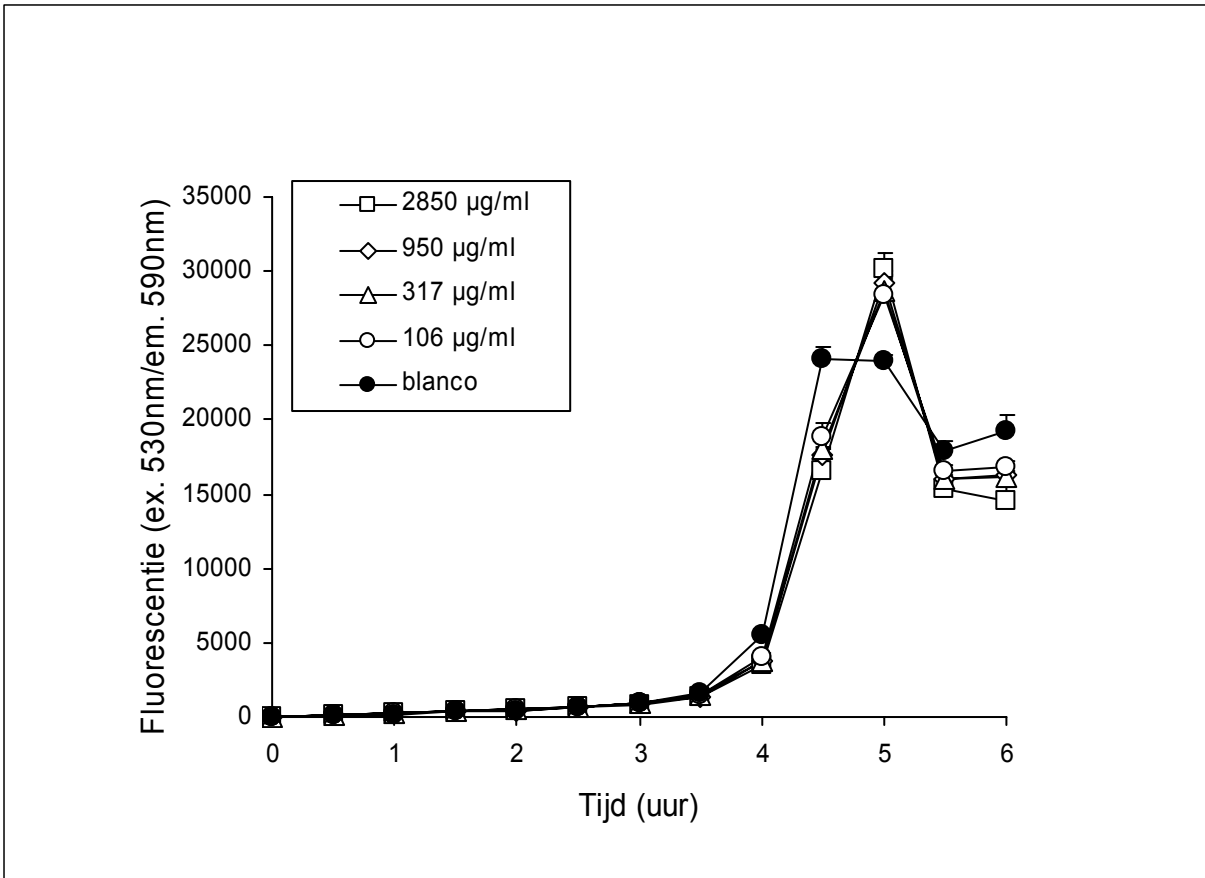
<sup>e</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



**Figuur 9.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Natustat aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen: Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van componenten uit vluchtige oliën: Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (93/7 v/v); vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens.



**Figuur 9.2.:** Effect van van het dichloormethaan-droogextract van Natustat op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).



**Figuur 9.3.:** Effect van van het ethanol-droogextract van Natustat op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).

## 10. ROPADIAR

### 10.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vier kruidenproducten geselecteerd die mogelijk de darmgezondheid van varkens verbeteren en zodoende kunnen bijdragen aan een verhoging van de opbrengst van varkens. Eén van deze producten is Ropadiar waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het de voederopname en/of voederconversie en/of opbrengst gunstig beïnvloedt [1]. Ropadiar is in een praktijkcentrum voor de biologische varkenshouderij en bij een biologische varkenshouder onderzocht op de effecten op groei, gezondheid en slachtparameters bij varkens en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Ropadiar is daarnaast ook geselecteerd als één van de vijf kruidenproducten die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) bij leghennen. Voor dit product is namelijk in verschillende vergelijkende onderzoeken aangetoond dat het een gunstige invloed heeft op de darmlesies en mortaliteit ten gevolge van de *Eimeria*-besmettingen en/of de *Eimeria*-oöcysten belasting in de mest en/of de voederinname, voederconversie of groei [3]. Ropadiar is daarom ook in een gecontroleerde *challenge*-proef onderzocht op bovengenoemde parameters bij met verschillende *Eimeria*-soorten besmette leghennen en de resultaten van dit onderzoek worden eveneens in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel aan deze dierproeven zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumexperimenten gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Ropadiar nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 10.2. Materiaal en methoden

#### 10.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Ropadiar aanwezige inhoudsstoffen. Ropadiar is onderzocht op de aanwezigheid van thymol en carvacrol, twee van de belangrijkste componenten in de vluchtige olie waaruit dit product volgens opgaaf van de producent bestaat. Hiertoe is gebruik gemaakt van een in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4]. In het kort, Ropadiar wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Ropadiar (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.

#### 10.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinaire toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica.

In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Ropadiar verrijkte varkens- en kippenvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens en gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, cocciostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 10.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [5,6,7,8]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [9].

Ropadiar is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Ropadiar is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [10,11]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Ropadiar wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu$ l 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in

de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu$ l van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

#### 10.2.4. Totaal fenolen-gehalte

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [12].

Ropadiar, het Ropadiar verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer zijn onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe zijn Ropadiar, het Ropadiar verrijkte varkensvoer en controle varkensvoer opgenomen in een 1,5% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol/water (1/1 v/v) en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [13,14]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [12] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

#### 10.2.5. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [15,16]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [15,16].

Ropadiar, het Ropadiar verrijkte varkens- en kippenvoer en controle varkens- en kippenvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [17]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [18]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [15,16].

#### 10.2.6. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metaboliëten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsigitaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een



chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door PMN's [19,20].

Ropadiar is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Ropadiar met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met dichloormethaan waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer is afgedampt. Van dit dichloormethaan-droogextract zijn verdunningsreeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met uit humaan bloed geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-sigitaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [21]. Mogelijke toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van het dichloormethaan-droogextract van Ropadiar gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor celviabiliteit/toxiciteit [22,23].

#### 10.2.7. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-sigitaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [24].

Ropadiar is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen klinische isolaten van *Escherichia coli* (K88<sup>+</sup>, collectienummer 295) uit varkens en van *Escherichia coli* (collectienummer 465) uit kippen. Hiertoe is Ropadiar met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met dichloormethaan waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer weer is afgedampt. Van dit dichloormethaan-droogextract zijn verdunningsreeksen in LB-groeimedium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295 dan wel cn 465) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [24]. Bacterie-groei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### 10.3. Resultaten en discussie

#### 10.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat Ropadiar thymol en carvacrol bevat (Figuur 10.1.). Deze vluchtige olie componenten geven een karakteristieke roze verkleuring na reactie met het vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens net onder het midden van het chromatogram (Rf-waarde 0,4-0,45) [4]. Naast deze twee verbindingen zijn in het chromatogram ook andere vluchtige olie componenten aantoonbaar (Figuur 10.1.). De aanwezigheid van met name thymol en carvacrol, alsmede de onderlinge verhouding tussen deze twee componenten, bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Ropadiar (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur aangetoond met analyse-certificaten van vier verschillende product-charges. Uit deze analyse-certificaten blijkt het gehalte aan thymol en carvacrol –twee van de componenten in de vluchtige olie waaruit dit product bestaat– binnen nauwe grenzen constant te zijn.

### 10.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Ropadiar verrijkte varkens- of kippenvoer en de bijbehorende controle-voeren geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Zoals verwacht mag worden, blijkt het kippenvoer dat dient als positieve controle (monensin-gesuppleteerd) daarentegen wel positief voor ionoforen in een concentratie die gebruikelijk is voor de toepassing als additief. Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen de met Ropadiar verrijkte varkensvoeren (baby-biggen korrel en eindvoer) en enkele van de voermonsters die dienen als controle (baby-biggen korrel en eindvoer) wel remming van de bacteriële groei. Zowel het met Ropadiar verrijkte kippenvoer als het bijbehorende controle-voer vertonen eveneens remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Mogelijk worden deze resultaten deels verklaard door in Ropadiar aanwezige stoffen met antibacteriële activiteit (zie hieronder). Echter, omdat het remmende effect ook in voermonsters wordt gevonden waaraan geen Ropadiar is toegevoegd, is het waarschijnlijk dat de groei-remming tevens wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf.

### 10.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Ropadiar lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 10.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [10,11,25,26], bevat Ropadiar wel duidelijk componenten die het signaal van 17 $\beta$ -estradiol in de OGT-test verlagen/onderdrukken en componenten die het signaal van 17 $\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 10.1.). Deze bevindingen zijn (deels) in overeenstemming met literatuurgegevens waarin aan thymol, één van de inhoudsstoffen in Ropadiar, een anti-androgene werking wordt toegeschreven [27]. Deze resultaten maken tevens duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit van Ropadiar wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de OGT- en AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Ropadiar met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende activiteit van Ropadiar mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met oestrogeen- en androgeen-antagonerende activiteit kunnen de uitslagen van de bepaling op de aanwezigheid van oestrogeen- en androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

### 10.3.4. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Ropadiar staat weergegeven in Tabel 10.1.. Het totaal fenolen-gehalte van het varkensvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totaal fenolen-gehalte gemeten van  $9,8 \pm 3,4$  mg galluszuur-equivalenten (GZE) per gram. In het met Ropadiar verrijkte varkensvoer is een totaal fenolen-gehalte van  $8,0 \pm 1,8$  mg GZE/g gevonden. Dit verschil in totaal fenolen-gehalte tussen beide varkensvoeren is echter niet-significant en

waarschijnlijk te wijten aan inhomogeniteit van de onderzochte voermonsters en/of de monsternamen en/of spreiding in de gebruikte bepalingmethode.

De antioxidant capaciteit van Ropadiar –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 10.1.. De antioxidant capaciteit van Ropadiar is hoger in de lipofiele fractie dan in de hydrofiele fractie. Dit verschil in antioxidant capaciteit kan worden verklaard door de aanwezigheid van vooral lipofiele bestanddelen in de vluchtige olie van *Origanum vulgare* (zie ook de paragraaf *kwalitatieve analyse*). De gevonden antioxidant capaciteit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen [28,29]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Ropadiar kunnen verklaren. Het is echter aannemelijk dat de fenolische componenten uit de vluchtige olie –vooral carvacrol en thymol– in Ropadiar, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [28,29].

De antioxidant capaciteit van het varkens- en kippenvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proeven bij varkens en de gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen is eveneens bepaald. In het varkensvoer (baby-biggen korrel) dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 114,8  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 59,6 \pm 5,9$   $\mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 55,2 \pm 2,5$   $\mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Ropadiar verrijkte varkensvoer is een totale antioxidant capaciteit van 95,8  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 57,2 \pm 1,8$   $\mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 38,6 \pm 0,6$   $\mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). Deze verlaging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Ropadiar aan het varkensvoer; bij suppletie van 0,5 g Ropadiar per kilogram varkensvoer (conform onderzoeksprotocol) kan namelijk juist een geringe toename van  $5,7 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{mol TE/g}$  worden berekend. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat de oorzaak is van deze verlaging van de antioxidant capaciteit in het met Ropadiar verrijkte varkensvoer. Mogelijk is dit verschil echter te wijten aan (geringe) verschillen in de samenstelling van de geteste voermonsters. Deze suggestie wordt versterkt door de eveneens waargenomen variatie in totaal fenolen-gehalte van de voermonsters.

In het kippenvoer dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 59,0  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 46,2 \pm 1,2$   $\mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 12,8 \pm 0,5$   $\mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Ropadiar verrijkte kippenvoer is een totale antioxidant capaciteit van 63,7  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 48,1 \pm 0,4$   $\mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 15,6 \pm 0,1$   $\mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). Deze verhoging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Ropadiar aan het kippenvoer; bij suppletie van 1 g Ropadiar per kilogram kippenvoer (conform onderzoeksprotocol) kan namelijk slechts een zeer geringe toename van 0,11  $\mu\text{mol TE/g}$  worden berekend. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat de oorzaak is van de additionele verhoging van de antioxidant capaciteit in het met Ropadiar verrijkte kippenvoer. Mogelijk is dit verschil echter te wijten aan (geringe) verschillen in de samenstelling van de geteste voermonsters.

#### 10.3.5. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

In de concentratie-reeks die is getest, laat Ropadiar geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Ropadiar vertoont wel een dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuur 10.2.). De IC50-waarde van Ropadiar (de concentratie van het product waarbij het chemiluminescentie-signaal 50% wordt geremd) is in deze test  $119 \pm 23$   $\mu\text{g/ml}$  (gemiddelde  $\pm$  SD;  $n = 3$  experimenten). De remming

van het chemiluminescentie-signaal is niet toe te schrijven aan een toxische werking van Ropadiar op de PMN's omdat de omzetting van resazurine niet negatief wordt beïnvloed en de metabole activiteit van deze cellen dus intact is (Figuur 10.2.). Aanvullende experimenten zijn nodig om vast te stellen of de remming van het chemiluminescentie-signaal daadwerkelijk het gevolg is van een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN. Literatuurgegevens doen vermoeden dat enkele van de bestanddelen in de vluchtige olie waar Ropadiar uit bestaat inderdaad deze werking kunnen hebben [30,31]. Op basis van andere literatuurgegevens [31,32] maar ook de hier gerapporteerde antioxidatieve capaciteit van Ropadiar, kan echter niet worden uitgesloten dat de remming van het chemiluminescentie-signaal het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten. Aanvullende experimenten moeten tevens uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapoleerbaar zijn naar PMN's van het varken.

Het hier waargenomen effect van Ropadiar op het functioneren van de PMN kan mogelijk de gedeclareerde positieve beïnvloeding van de darmgezondheid verder onderbouwen. Het wordt namelijk algemeen aangenomen dat langdurige of overmatige activatie van PMN's en/of productie van reactieve zuurstof-metabolieten weefselbeschadiging kan veroorzaken, onder meer door lipiden-peroxidatie (leidend tot schade aan de celmembraan) en door afbraak van collageen en andere biologische macromoleculen [33,34,35]. Hoewel een dergelijke negatief effect van de PMN op het darm-epitheel van gespeende biggen –voor zover bekend– nog niet is beschreven, kan worden verondersteld dat de kans hierop, juist in een periode dat er veel veranderingen plaats vinden in het voedingspatroon, de mucosale afweerreactie en de lokale bacteriële flora, groot is. Om deze hypothese verder te bewijzen, is echter aanvullend onderzoek nodig.

#### *10.3.6. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van Escherichia coli*

Ropadiar vertoont een dosis-afhankelijke antimicrobiële werking tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (K88<sup>+</sup>; cn 295) uit het varken (Figuur 10.3.). Ropadiar remt ook dosis-afhankelijk de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *E. coli* (cn 465) uit kippen (Figuur 10.4.). Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere publicaties waarin voor de vluchtige olie (of inhoudsstoffen hieruit) in Ropadiar eveneens een antimicrobiële activiteit tegen *E. coli* is beschreven [24,28,36]. De waargenomen daling in het fluorescentie-signaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metaboliet (hydroresorufine) [22].

#### **10.4. Conclusies en samenvatting**

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Ropadiar. Analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Ropadiar vergelijkbaar zijn.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinaire toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Ropadiar verrijkt varkens- en kippenvoer en de bijbehorende controle-voeders, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. De antibacteriële eigenschappen van Ropadiar kunnen dit resultaat mogelijk deels verklaren maar het is waarschijnlijk dat een of meerdere component(en) in het voer zelf ook bijdragen.
- Ropadiar laat een anti-oestrogene en anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat

Ropadiar ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstof waaruit Ropadiar is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Ropadiar waargenomen anti-oestrogene en anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Ropadiar verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).

- Ropadiar bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Ropadiar is echter de vraag. Bij de dosering waarin Ropadiar volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolen en antioxidanten in het diervoer.
- Ropadiar vertoont een sterke, dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's. Nader onderzoek moet aantonen of het waargenomen effect inderdaad is toe te schrijven aan een verminderde productie van reactieve zuurstof-metabolieten door de PMN of eerder het gevolg is van het wegvangen van reeds gevormde reactieve zuurstof-metabolieten (antioxidant activiteit).
- Ropadiar vertoont een dosis-afhankelijke remming van de bacteriële groei van klinische isolaten van *E. coli* uit het varken en de kip.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van Ropadiar op de darmgezondheid van varkens, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. Behalve een uitbreiding en verdieping van het hier beschreven onderzoek naar een mogelijk werkingsmechanisme, zou de farmacokinetiek en metabolisatie van Ropadiar en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit in de darm van het varken daarbij een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.
- Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van Ropadiar op *Eimeria*-soorten niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om dit kruidenproduct nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. Uit de resultaten van dit *in vitro* onderzoek kan worden geconcludeerd dat Ropadiar mogelijk ook een gunstig effect kan hebben bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. De uitkomsten van het *in vitro* onderzoek lijken daarom eveneens een verdere onderbouwing te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Ropadiar op de darmgezondheid van kippen. Aanvullende studies zijn echter nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven.

### **10.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde,

Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit het varken en de kip.

### 10.6. Referenties

- 1 Van Asseldonk AGM, Kleijer-Ligtenberg G. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 3: kruidenpreparaten voor varkens, groeibevordering door (darm)gezondheidsbevordering. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (*coccidiose-challenge*). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Thyme, thymi herba* (01/2008:0865).
- 5 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 8 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 9 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 10 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 11 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 12 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 13 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric.Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 14 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric.Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 15 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system

- coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 17 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
  - 18 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
  - 19 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
  - 20 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
  - 21 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
  - 22 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
  - 23 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
  - 24 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
  - 25 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
  - 26 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
  - 27 Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007;221:278-84.
  - 28 Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:1822-8.
  - 29 Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2007;58(2):87-93.
  - 30 Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 2006;76(2):61-8.
  - 31 Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Tagaki N. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J Dent Res.* 1986;65(1):53-6.

- 32 Kruk I, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 2000;41(7):1059-64.
- 33 Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm. Res.* 1997;46:382-91.
- 34 Leff JA, Repine JE. Neutrophil-mediated tissue injury. In: *The neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (red.) Oxford University Press, Oxford, 1993: 229-62.
- 35 Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 1989;320(6):365-76.
- 36 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86(6):985-90.



**Tabel 10.1.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Ropadiar.

<b>Ropadiar</b>		
Totaal fenolen-gehalte		16,6 ± 4,2 mg GZE/g <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	33,1 ± 2,6 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	79,9 ± 1,3 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	113 µmol TE/g <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>e</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>f</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten. Omdat niet-fenolische inhoudsstoffen in Ropadiar mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zo het gemeten totaal fenolen-gehalte kunnen beïnvloeden, dient het gemeten totaal fenolen-gehalte met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

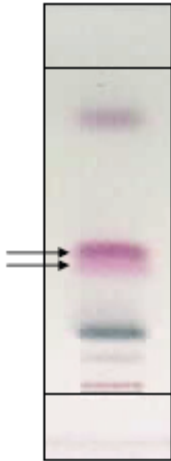
<sup>c</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

<sup>d</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 1 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

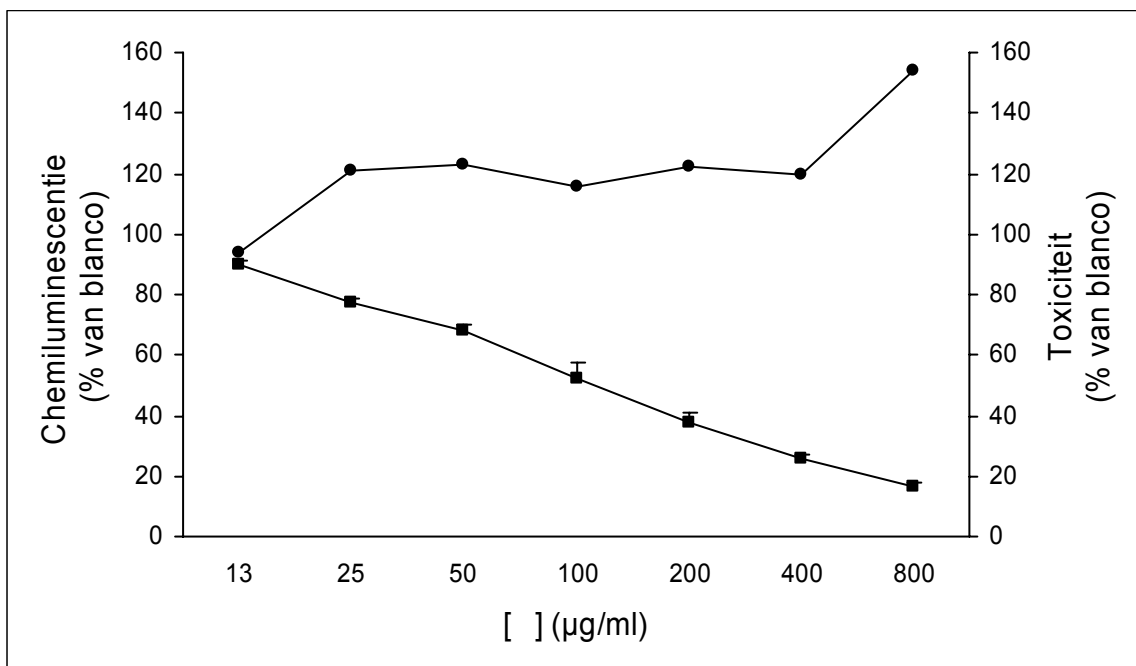
<sup>e</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 1 mg product.

<sup>f</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

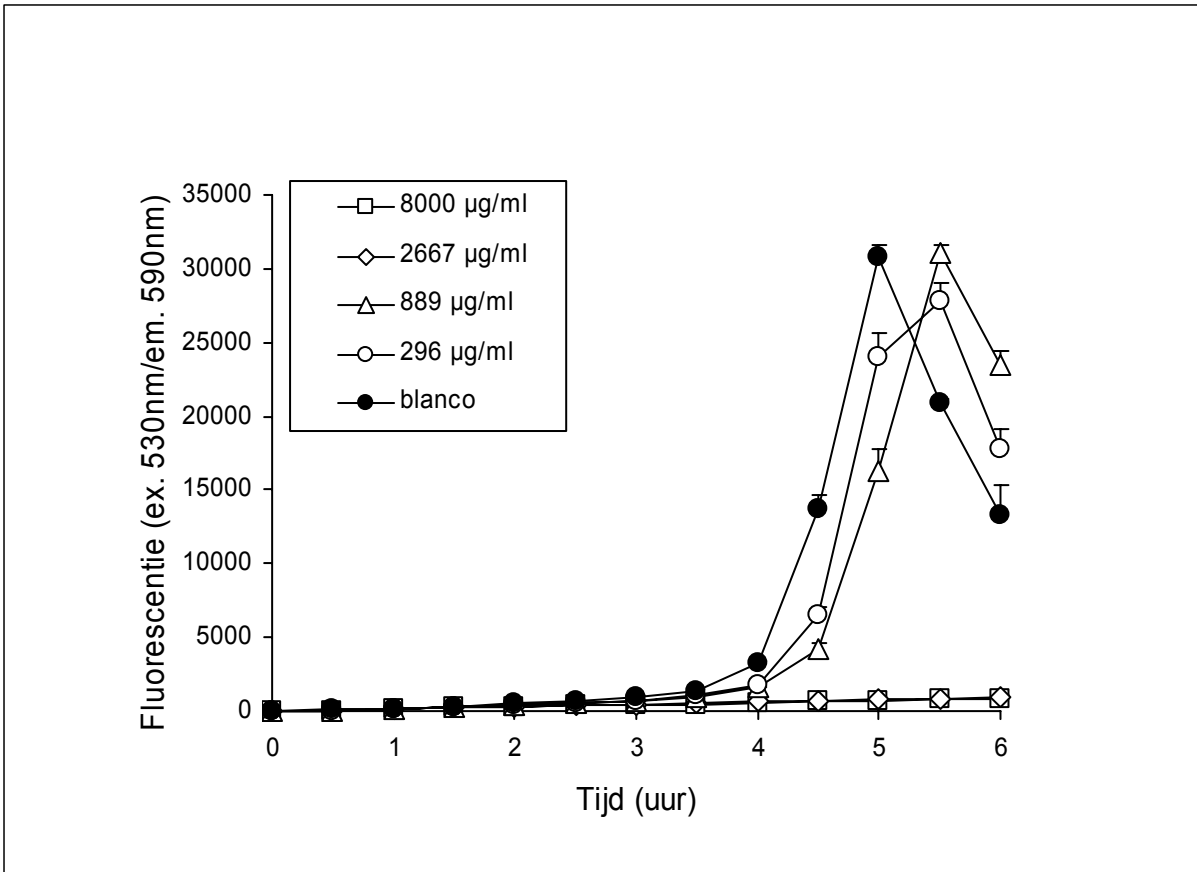
<sup>g</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 10 mg product.



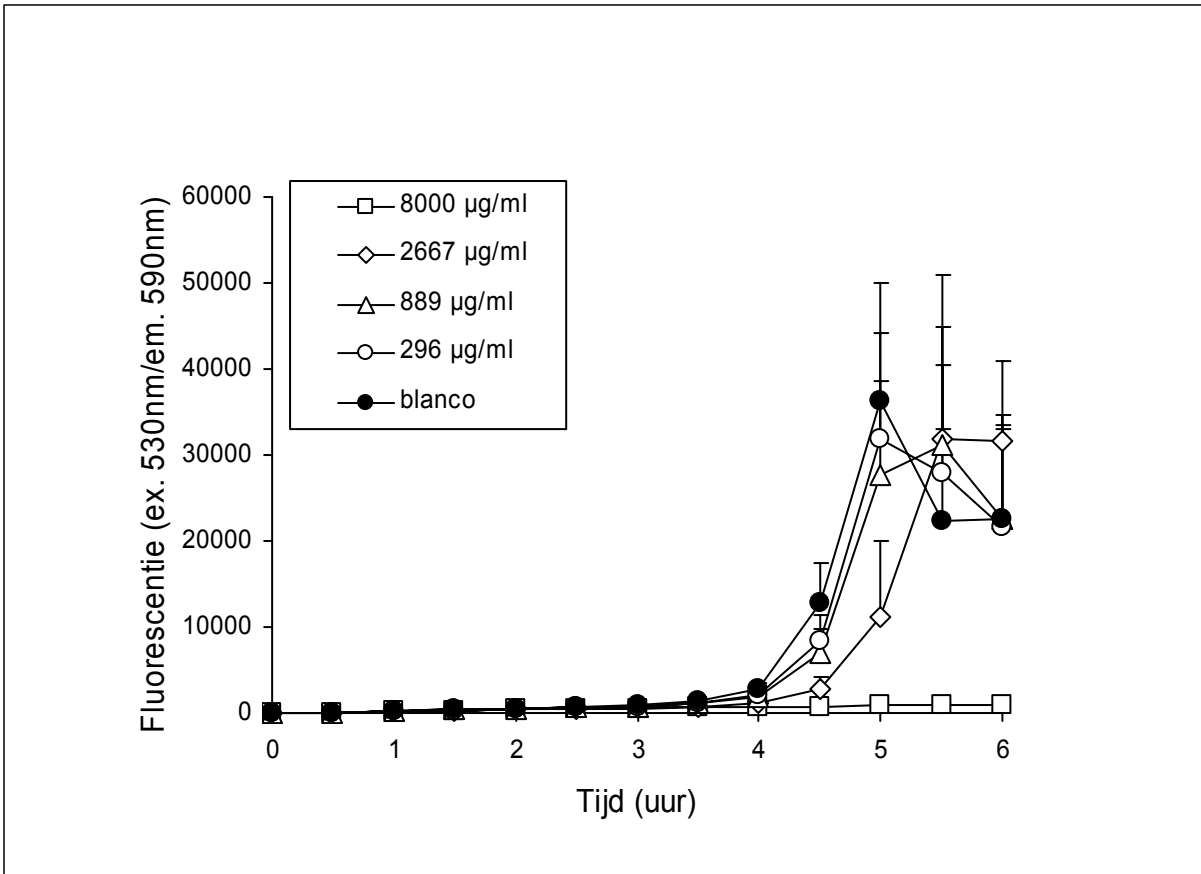
**Figuur 10.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Ropadiar aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). Met het gebruikte DLC-systeem kunnen componenten uit vluchtige oliën worden aangetoond: Silica 60 F254; dichloormethaan; vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reagens. De pijlen geven de vlekken aan die corresponderen met thymol (boven) en carvacrol (onder).



**Figuur 10.2.:** Effect van Ropadiar op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 10.3.:** Effect van Ropadiar op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit varkens (antimicrobiële activiteit).



**Figuur 10.4.:** Effect van Ropadiar op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).

## 11. SEL-PLEX

### 11.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn drie kruidenproducten geselecteerd die mogelijk kunnen bijdragen aan het verbeteren van de uiergezondheid bij koeien. Eén van deze producten is Sel-plex waarvoor kwantitatieve gegevens met betrekking tot de werkzaamheid beschikbaar zijn uit enkele vergelijkende onderzoeken [1]. Sel-plex is onderzocht in een praktijkproef bij koeien met een verhoogd celgetal en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Sel-plex nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 11.2. Materiaal en methoden

#### 11.2.1. Kwantitatieve analyse van het seleen-gehalte

Het seleen-gehalte in Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer is op twee manieren bepaald. In eerste instantie is het totaal seleen-gehalte vastgesteld waarbij het voersupplement en de voermonsters zijn gedestruerd met behulp van 65% salpeterzuur onder verhitting in een magnetron. De gebruikte methode voor ontsluiting van seleen is gevalideerd voor zware metalen en arseen en is volgens de literatuur ook geschikt voor ontsluiting van seleen. De destruatens zijn geanalyseerd met twee onafhankelijke technieken, *graphite furnace atomic absorption spectrometry* (GF-AAS) en *inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS), volgens respectievelijk RIKILT-protocol A1057 en concept RIKILT-protocol A1058.

Daarnaast zijn de verschillende seleen-bevattende inhoudsstoffen in Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer geïdentificeerd. Hiertoe is gebruik gemaakt van verschillende, eerder in de literatuur beschreven extractiemethoden [3,4,5]. De verschillende organisch seleen-verbindingen (seleno-DL-cystine, seleno-DL-methionine, Se-methyl-seleno-L-cysteïne en dimethylselenide) worden gescheiden met behulp van *high-performance liquid chromatography* (HPLC) waarna detectie plaats vindt met behulp van ICP-MS.

#### 11.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder

in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Sel-plex verrijkte koeienvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### *11.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit*

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [6,7,8,9]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) [10].

Sel-plex is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Sel-plex is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoeders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [11,12]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Sel-plex wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en  $\text{NH}_2$ -kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50  $\mu\text{l}$  4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-sigitaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen ( $17\beta$ -estradiol) of androgeen ( $17\beta$ -testosteron) toegevoegd waarna 200  $\mu\text{l}$  van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-sigitaal wordt gemeten.

### *11.2.4. Totaal fenolen-gehalte*

Het totaal fenolen-gehalte van een stof of extract kan worden bepaald met de Folin-Ciocalteu test. Bij deze test wordt een stof of extract gemengd met een heteropoly-fosfo-wolframaat-molybdaat complex waardoor fenolische verbindingen worden omgezet (geoxideerd) tot semi-quinonen. Bij deze reactie wordt een blauw-gekleurd product gevormd

dat spectrofotometrisch kan worden gekwantificeerd waarbij de kleur-intensiteit van de oplossing evenredig is aan het fenolen-gehalte van de geteste stof of het extract [13].

Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer zijn onderzocht op het totaal fenolen-gehalte met behulp van de Folin-Ciocalteu-test. Hiertoe zijn Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer opgenomen in een 1,5% (v/v) zoutzuur-oplossing in methanol/water (1/1 v/v) en gedurende drie uur verwarmd bij 90 °C. Tijdens deze hydrolyse-stap worden eventuele gebonden fenolen vrijgemaakt [14,15]. Na bekoelen wordt het hydrolysaat gecentrifugeerd en het supernatant getest op het gehalte aan fenolische verbindingen met behulp van een eerder in de literatuur beschreven methode [13] die is aangepast voor het gebruik van microtiter-platen.

#### 11.2.5. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-sigitaal langzaam dooft [16,17]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-sigitaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-sigitaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [16,17].

Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [18]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [19]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [16,17].

#### 11.2.6. Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten

Het effect van een stof of extract op de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (PMN's) kan worden bepaald met behulp van de chemiluminescentie-test. Bij deze test worden uit vers bloed geïsoleerde PMN's geactiveerd met membraan-fragmenten van gistcellen. De door de PMN's vrijgemaakte reactieve zuurstof-metaboliëten reageren vervolgens met luminol waardoor een lichtsigitaal wordt gegenereerd. De hoeveelheid licht kan worden gekwantificeerd met een chemiluminometer en is een maat voor de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door PMN's [20,21].

Sel-Plex is onderzocht op eventuele beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metaboliëten door gestimuleerde PMN's met behulp van de chemiluminescentie-test. Hiertoe is Sel-Plex met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met ethanol. De ethanol is onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer afgedampt en het residu gevriesdroogd. Van dit ethanol-droogextract zijn verdunningsreeksen in HBSS buffer pH=7,4 gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn geïncubeerd met vers geïsoleerde PMN's, luminol en met serum gepreïncubeerde gistcel-wanden waarna het chemiluminescentie-sigitaal is gemeten gedurende 30 min volgens een eerder beschreven protocol [22]. Mogelijke

toxische effecten zijn bepaald door verdunningsreeksen van het ethanol-droogextract van Sel-Plex gedurende 30 min te incuberen met vers geïsoleerde PMN's en resazurine. Resazurine wordt door levende cellen omgezet in een fluorescerend reactieproduct en kan daarom als indicator worden gebruikt voor cel-viabiliteit/toxiciteit [23,24].

#### *11.2.7. Effect op biofilm-formatie door Staphylococcus aureus*

Het effect van een (planten)stof of extract op de vorming van een beschermend kapsel van polysacchariden (biofilm) door bepaalde typen bacteriën kan worden gemeten met behulp van de biofilm-formatie test. Bij deze test wordt de door de bacteriën gevormde biofilm aangekleurd met safranine. De intensiteit van kleuring kan spectrofotometrisch worden bepaald en is een maat voor de hoeveelheid biofilm die is gevormd [25].

Sel-plex is onderzocht op eventuele effecten op de biofilm-formatie door de *Staphylococcus aureus* stam BMA/FR/032/0074 [26,27]. Hiertoe is Sel-Plex met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met ethanol. De ethanol is onder verlaagde druk aan een rotatieverdamer afgedampt en het residu gevriesdroogd. Van dit ethanol-droogextract zijn concentratie-reeksen in TSBg-groeimedium gemaakt. Deze concentratie-reeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074). De safranine-kleuring is vervolgens uitgevoerd volgens een eerder beschreven protocol [27] waarna de gevormde hoeveelheid biofilm is gekwantificeerd door de absorptie bij 540 nm te meten. Mogelijke beïnvloeding van de bacteriële groei (antimicrobiële activiteit) is bepaald door concentratie-reeksen van het ethanol-droogextract van Sel-plex gedurende 16 uur te incuberen bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *St. aureus* (BMA/FR/032/0074) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [28]. Bacteriegroei is hierbij gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

### **11.3. Resultaten en discussie**

#### *11.3.1. Kwantitatieve analyse van het seleen-gehalte*

Het totale seleen-gehalte in Sel-plex, het Sel-plex verrijkte koeienvoer en controle koeienvoer zoals die is bepaald met GF-AAS en ICP-MS staat weergegeven in Tabel 11.1.. Hoewel de totaal seleen-gehalten voor de beide detectie-technieken redelijk goed overeen komen, moeten de gevonden waarden als indicatief worden beschouwd omdat de gebruikte methoden niet zijn gevalideerd. Desalniettemin zijn de gevonden totale seleen-gehalten in Sel-plex in lijn met specificaties van de fabrikant. Het totale seleen-gehalte in het Sel-plex verrijkte voermonster is iets lager dan verwacht mag worden op grond van de gebruikte dosering in het voer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal. Dit verschil is mogelijk te wijten aan inhomogeniteit van het onderzochte voermonster en/of de monsternamen en/of een onvolledige extractie en/of spreiding in de gebruikte bepalingmethode.

Uit speciatie-analyse van de verschillende seleen-bevattende inhoudsstoffen in Sel-plex, blijkt dat ongeveer 50% van het totale seleen-gehalte zoals dat is gemeten na destructie, kan worden teruggevonden indien gebruik wordt gemaakt van een extractiemethode met behulp van enzymen [4,5]. Sel-plex blijkt in dit geval vooral seleno-DL-methionine (99%) te bevatten en sporen van seleno-DL-cystine (1%). Dit is in overeenstemming met specificaties van de fabrikant. Waarschijnlijk door de erg lage extractie-efficiëntie van de gebruikte extractie-methoden voor diervoer-matrices, kan in het met Sel-plex verrijkte koeienvoer en het controle koeienvoer geen van de organische seleen-verbindingen worden aangetoond.



Daarom kan ook geen uitspraak worden gedaan over de vorm waarin seleen voorkomt in deze voermonsters.

### 11.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het Sel-plex verrijkte koeienvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen zowel het Sel-plex verrijkte koeienvoer als het bijbehorende controle-voer remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Echter, omdat het remmende effect in beide voermonsters wordt gevonden, is het waarschijnlijk dat de groei-remming wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en niet is toe te schrijven aan de toevoeging van Sel-plex.

### 11.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Sel-plex lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 11.2.). Sel-plex lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 11.2.).

### 11.3.4. Totaal fenolen-gehalte en antioxidant capaciteit

Het totaal fenolen-gehalte van Sel-plex staat weergegeven in Tabel 11.2.. Het totaal fenol-gehalte van voederbrokken zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal is eveneens bepaald. In voederbrokken die zijn verstrekt aan de controle-groep is een totaal fenolen-gehalte gemeten van  $11,2 \pm 1,7$  mg galluszuur-equivalenten (GZE) per gram. In met Sel-plex verrijkte voederbrokken is een totaal fenolen-gehalte van  $14,7 \pm 3,8$  mg GZE/g gevonden. Deze –niet-significante– verhoging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Sel-plex aan de voederbrokken; bij suppletie van 3 g Sel-plex per kilogram voederbrok (conform onderzoeksprotocol) bedraagt de theoretische toename slechts 27  $\mu$ g GZE/g en dit is ruim een factor 100 lager dan het experimenteel waargenomen verschil tussen de twee soorten voederbrokken. Zeer waarschijnlijk is het verschil in totaal fenolen-gehalte van de controle en Sel-plex verrijkte voederbrokken dan ook te wijten aan verschillen in de samenstelling van de geteste voederbrokken [29].

De antioxidant capaciteit van Sel-plex –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 11.2.. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gevonden antioxidant capaciteit van Sel-plex kunnen verklaren. Echter, selenium is een sporelement dat een belangrijke rol vervult bij de bescherming tegen oxidatieve weefselschade. Zo vormt selenium een essentieel onderdeel van glutathionperoxidase [30] en zijn organische selenium verbindingen als zodanig ook in staat om reactieve zuurstof en stikstof metabolieten onschadelijk te maken [31]. Het is dan ook aannemelijk dat de organische selenium verbindingen in Sel-plex, in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de waargenomen antioxidant activiteit. Daarnaast zou de aanwezigheid van fenolen in Sel-plex ook een rol kunnen spelen omdat dit soort verbindingen ook een antioxidatieve werking hebben [14,15].

De antioxidant capaciteit van voederbrokken uit de praktijk-proef bij koeien met een verhoogd celgetal is eveneens bepaald. In voederbrokken die zijn verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van 163,9  $\mu\text{mol}$  Trolox-equivalenten (TE) per gram ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 117,9 \pm 8,2 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 46,0 \pm 1,4 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In met Sel-plex verrijkte voederbrokken is een totale antioxidant capaciteit van 133,2  $\mu\text{mol}$  TE per gram gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiel})} = 96,8 \pm 4,5 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiel})} = 36,4 \pm 1,8 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). Deze verlaging kan niet worden gerelateerd aan de toevoeging van Sel-plex aan de voederbrokken; bij suppletie van 3 g Sel-plex per kilogram voederbrok (conform onderzoeksprotocol) kan namelijk juist een toename van 0,25  $\mu\text{mol}$  TE/g worden berekend. Zeer waarschijnlijk is het verschil in totale antioxidant capaciteit van de controle en Sel-plex verrijkte voederbrokken dan ook eerder te wijten aan verschillen in de samenstelling van de geteste voederbrokken [29].

#### 11.3.5. *Beïnvloeding van de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten*

In de concentratie-reeks die is getest, laat Sel-plex geen stimulatie zien van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (gegevens niet getoond). Sel-plex vertoont ook geen dosis-afhankelijke remming van de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie door gestimuleerde PMN's (Figuur 11.1.). Sel-plex heeft evenmin een effect op de metabole activiteit van PMN's omdat de omzetting van resazurine niet wordt beïnvloed (Figuur 11.1.). Deze resultaten lijken in eerste instantie in tegenspraak met literatuurgegevens waarin bij melkvee een relatie is gevonden tussen de inname van selenium-verrijkt voer en een verbetering van het functioneren van PMN's, waaronder een verhoogde intracellulaire doding van (pathogene) bacterien en een hiermee geassocieerde toename in de productie van reactie zuurstof-metabolieten [32]. Deze *in vivo* resultaten zijn echter moeilijk te vergelijken met de hier gerapporteerde bevindingen uit *in vitro* onderzoek. Met name omdat in het *in vitro* onderzoek alleen is gekeken naar het korte-termijn effect van (een extract van) Sel-plex terwijl in de dierproeven onderzoek is verricht naar de fysiologische effecten op langere termijn. Deze verschillen kunnen resulteren in wezenlijke andere onderzoeks-uitkomsten. Dit wordt bevestigd door het feit dat selenium bij koeien niet direct het cellulaire mechanisme lijkt te beïnvloeden dat de PMN aanzet tot een verhoogde productie van reactieve zuurstof-metabolieten. Selenium lijkt daarentegen meer een indirect effect op de PMN te hebben; selenium verbetert de activiteit van het enzym glutathionperoxidase in de PMN waardoor de PMN ook in staat is tot een verhoogde productie van reactieve zuurstof-metabolieten [32]. De hier beschreven resultaten zijn in dit opzicht dus wel in lijn met deze eerder gerapporteerde indirecte effecten van selenium op het functioneren van de PMN omdat een direct effect van Sel-plex op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde PMN's wordt uitgesloten. Aanvullende experimenten moeten uitwijzen of de hier gevonden resultaten extrapolerbaar zijn naar PMN's van de koe.

#### 11.3.6. *Effect op biofilm-formatie door Staphylococcus aureus*

Sel-plex lijkt geen effect te hebben op de biofilm-formatie door *St. aureus* (Figuur 11.2.). Sel-plex beïnvloedt de bacteriële groei van *St. aureus* evenmin (gegevens niet getoond). De positieve controle (ampicilline) laat daarentegen wel een dosis-afhankelijke remming van de biofilm-formatie en bacteriële groei zien (gegevens niet getoond).

#### **11.4. Conclusies en samenvatting**

- De resultaten van de kwantitatieve analyse van het seleen-gehalte en de speciatie-analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Sel-plex. Door de producent verstrekte analyse-certificaten tonen daarnaast aan dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van Sel-plex vergelijkbaar zijn.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Sel-plex verrijkt koeienvoer en het bijbehorende controle-voer, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en is het niet toe te schrijven aan de toevoeging van Sel-plex.
- Sel-plex vertoont geen activiteit in functionele testen voor (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit.
- Sel-plex bevat fenolen en antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Sel-plex is echter de vraag. Bij de dosering waarin Sel-plex volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolen en antioxidanten in het diervoer.
- Sel-plex heeft geen effect op de luminol-geïnduceerde chemiluminescentie of op de biofilm-formatie door *St. aureus*.
- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen onderbouwing lijken te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Sel-plex op de uiergezondheid, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat Sel-plex onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat Sel-plex wel degelijk een gunstige invloed heeft op de uiergezondheid. Mogelijk moet daarom worden geconcludeerd dat de in dit *in vitro* onderzoek gebruikte experimentele methoden (extract-bereiding en/of test-systemen) niet geschikt zijn voor het onderbouwen van de werking van Sel-plex.

#### **11.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee en medewerkers van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. Met dank aan Dr H. Mol en medewerkers van het RIKILT, WageningenUR, voor de seleen-bepalingen. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr M. Melchior en Prof. Dr J. Fink-Gremmels van de afdeling Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *St. aureus* stam BMA/FR/032/0074.

#### **11.6. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 2: uiergezondheid (fytotherapie en celgetal). Instituut voor Ethnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Ethnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.

- 3 Nash M, McSheehy S. Determination of selenomethionine in nutritional supplements using HPLC coupled to the X series<sup>II</sup> ICP-MS with CCT. Application Note 40745, Thermo Fisher Scientific.
- 4 Siwek M, Galunsky B, Niemeyer B. Isolation of selenium organic species from antarctic krill after enzymatic hydrolysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;381:737-41.
- 5 Polatajko A, Banas B, Encinar JR. Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC-ICP MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;381:844-9.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 8 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
- 9 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
- 10 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
- 11 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
- 12 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
- 13 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 1999;299:152-78.
- 14 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:3630-4.
- 15 Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:5315-21.
- 16 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
- 17 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
- 18 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
- 19 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using

- randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
- 20 DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 1982;129(4):1589-93.
  - 21 Vilim V, Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:623-9.
  - 22 Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.
  - 23 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
  - 24 Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Meth.* 1997;204:205-8.
  - 25 Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988;7(1):30-3.
  - 26 Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B* 2006;53:326-32.
  - 27 Hensen SM. Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis, bacterial adhesion and invasion in relation to pathogenesis and antimicrobial sensitivity. Proefschrift Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht; 2000.
  - 28 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
  - 29 Hansma H. Persoonlijke communicatie.
  - 30 Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell. mol. Life Sci.* 2000;57:1825-35.
  - 31 Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium, and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 2003;133:1448S-51S.
  - 32 Ibeagha AE, Ibeagha-Awemu EM, Mehrzad J, Zhao X. Selenium, immune functions, and health of dairy cattle. In: Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 23<sup>rd</sup> annual symposium; the new energy crisis: food, feed or fuel? Lyons TP, Jacques KA, Hower JM (red.) Nottingham University Press, Nottingham, 2007: 289-303.

**Tabel 11.1.:** Kwantitatieve analyse van het totale seleen-gehalte in Sel-plex, Sel-plex verrijkt koeienvoer en controle koeienvoer

	GF-AAS detectie	ICP-MS detectie
Sel-plex	1800 mg seleen/kg	2100 mg seleen/kg
Sel-plex verrijkt koeienvoer	4,1 mg seleen/kg	4,3 mg seleen/kg
Controle koeienvoer	0,5 mg seleen/kg <sup>a</sup>	0,6 mg seleen/kg <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gevonden waarde ligt rond de geschatte detectiegrens.

**Tabel 11.2.:** Totaal fenolen-gehalte, antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Sel-plex.

<b>Sel-plex</b>		
Totaal fenolen-gehalte		9,0 ± 1,9 mg GZE/g <sup>a</sup>
Antioxidant activiteit	Hydrofiële ORAC-waarde	61,6 ± 0,5 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	20,2 ± 2,9 µmol TE/g <sup>b</sup>
	Totale ORAC-waarde	81,8 µmol TE/g <sup>c</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>e</sup>

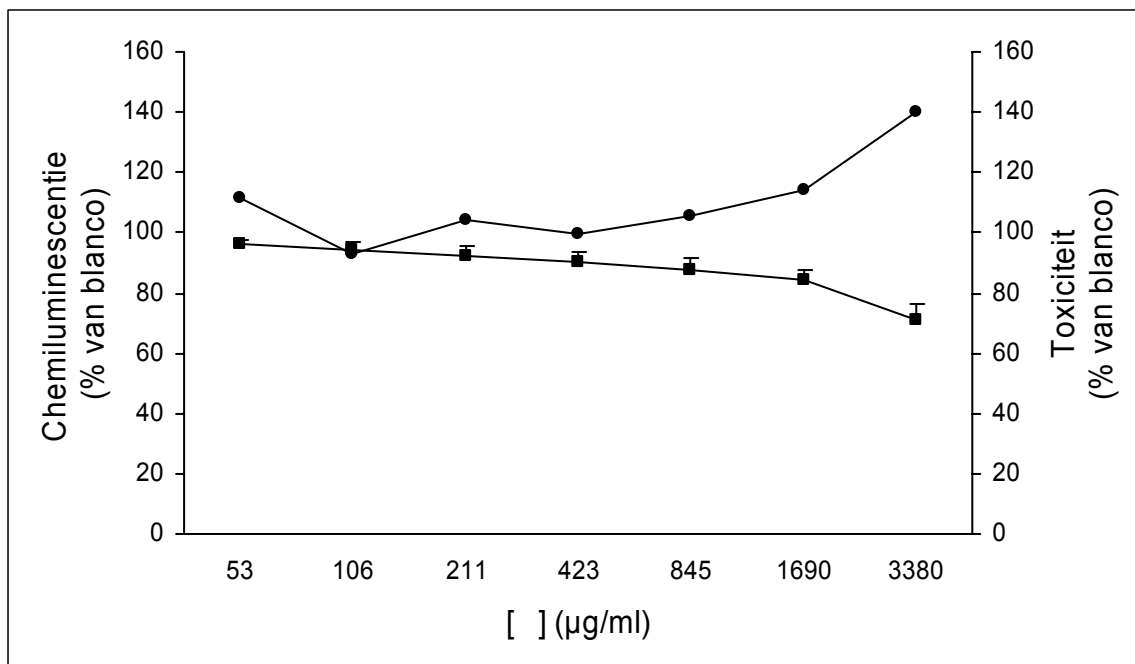
<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 3 experimenten); GZE = Galluszuur-equivalenten. Omdat niet-fenolische inhoudsstoffen in Sel-plex mogelijk ook kunnen interfereren in de kleur-reactie die ten grondslag ligt aan de Folin-Ciocalteu test en zo het gemeten totaal fenolen-gehalte kunnen beïnvloeden, dient het gemeten totaal fenolen-gehalte met voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd.

<sup>b</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

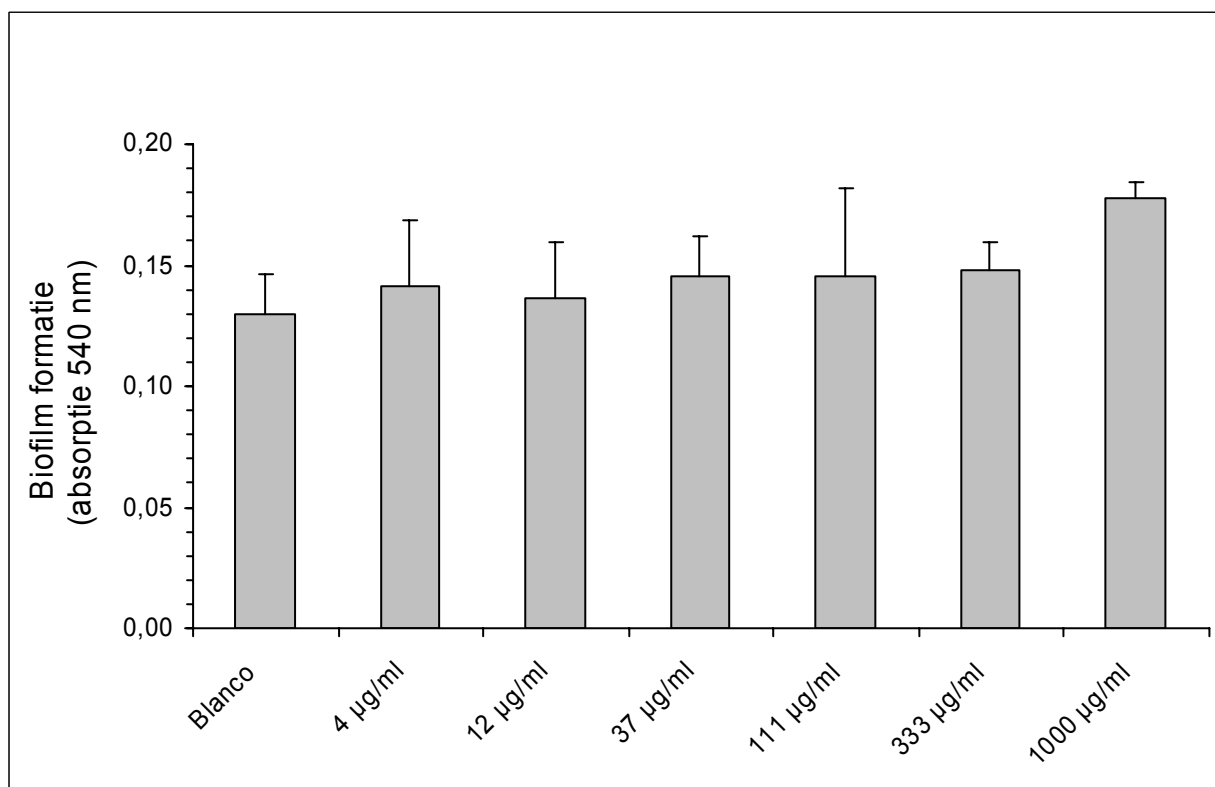
<sup>c</sup> ORAC<sub>(totaal)</sub> = ORAC<sub>(hydrofiel)</sub> + ORAC<sub>(lipofiel)</sub>; TE = Trolox-equivalenten.

<sup>d</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 33 mg product.

<sup>e</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product.



**Figuur 11.1.:** Effect van Sel-plex op de productie van reactieve zuurstof-metabolieten door gestimuleerde polymorf-kernige granulocyten (■) en op de metabole activiteit van deze cellen als maat voor mogelijke toxiciteit (●).



**Figuur 11.2.:** Effect van Sel-plex op de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*.

## 12. ZICOMILL

### 12.1. Inleiding

In het kader van het door het Ministerie van LNV gesubsidieerde project “Ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” zijn vijf kruidenproducten geselecteerd die mogelijk een gunstig effect hebben bij *Eimeria*-besmettingen (coccidiose) bij leghennen. Eén van deze producten is Zicomill waarvoor in verschillende vergelijkende onderzoeken is aangetoond dat het een gunstige invloed heeft op de darmlesies en mortaliteit ten gevolge van de *Eimeria*-besmettingen en/of de *Eimeria*-oöcysten belasting in de mest en/of de voederinname, voederconversie of groei [1]. Zicomill is in een gecontroleerde *challenge*-proef onderzocht op bovengenoemde parameters bij met verschillende *Eimeria*-soorten besmette leghennen en de resultaten van dit onderzoek worden in het deelverslag van werkpakket Deel 2B gepresenteerd [2]. Parallel hieraan zijn binnen werkpakket Deel 2A diverse laboratoriumproeven gedaan om de kwaliteit en *in vitro* biologische activiteit van Zicomill nader te karakteriseren. In dit hoofdstuk worden de resultaten van deze experimenten besproken.

### 12.2. Materiaal en methoden

#### 12.2.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC) is een kwalitatieve analyse gemaakt van enkele van de in Zicomill aanwezige inhoudsstoffen. Zicomill is in eerste instantie onderzocht op de aanwezigheid van voor knoflook karakteristieke inhoudsstoffen omdat het product volgens de producent/importeur deze plant bevat. Hiertoe is enerzijds gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode voor de kwalitatieve analyse van allicin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide) [3]. In het kort, Zicomill wordt gemengd met dichloormethaan en gedurende 15 min onder continu schudden geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens). Anderzijds is de aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren in Zicomill onderzocht omdat dit ook belangrijke inhoudsstoffen in knoflook zijn. Hiertoe is gebruik gemaakt van de in de Europese Farmacopee beschreven en gevalideerde methode [4]. In het kort, Zicomill wordt gemengd met methanol en gedurende 1 min geëxtraheerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens). Verder is Zicomill onderzocht op de aanwezigheid van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen omdat het product volgens de producent/importeur ook een mengsel van andere kruiden bevat waarvoor in de geraadpleegde literatuur geen specifieke analyse-methoden beschikbaar waren. Voor de flavonoïden/fenolen-analyse is gebruik gemaakt van een in de literatuur beschreven methode [5]. In het kort, Zicomill wordt gemengd met ethanol en gedurende 10 min geëxtraheerd bij 90 °C en vervolgens gecentrifugeerd. Het supernatant wordt gebruikt voor DLC-analyse (Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens).

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Zicomill (*batch-to-batch consistency*) is onderzocht aan de hand van door de producent/importeur aangeleverde gegevens. In dit verband is met name een vergelijking gemaakt van de kwalitatieve en/of kwantitatieve resultaten van analyse-certificaten van enkele verschillende product-charges.



### 12.2.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

RIKILT heeft twee geaccrediteerde en gevalideerde analysemethoden ontwikkeld –de bacteriespectrum-methode en een test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie– voor het analyseren van diervoeders op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. In de bacteriespectrum-methode wordt de remmende werking van een extract van een diervoeder op de groei van een aantal geselecteerde micro-organismen onderzocht met behulp van de plaat-methode. Deze micro-organismen zijn specifiek gevoelig voor één of meerder antibiotica stoffen/stofgroepen. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere tylosine, lincomycine, spiramycine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine), chinolonen (onder andere flumequine) en avilamycine aangetoond worden in diervoeders. Met de tweede methode wordt een extract van een diervoeder in een gebufferde agar-gel geëlectroforeerd. De identificatie van de verschillende bacteriegroei-remmende stoffen berust op het verschil in verplaatsing naar de anode of kathode onder invloed van een elektrisch veld in de agar-gel. De bacteriegroei-remmende stoffen worden aangetoond door middel van bioautografie. Met deze methode kunnen  $\beta$ -lactamen (onder andere amoxicilline), macroliden (onder andere lincomycine, spiramycine, tylosine), virginiamycine, tetracyclinen (onder andere oxytetracycline), ionoforen (onder andere monensin, salinomycine, narasin), trimethoprim, avilamycine, avoparcine, flavofosfolipol, sulfonamiden (onder andere sulfadiazine) en zinkbacitracine aangetoond worden in diervoeders.

Het met Zicomill verrijkte kippenvoer en de bijbehorende controle voermonsters zoals die zijn gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen zijn getest op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica met de bovenbeschreven testen. Hiertoe zijn van de betreffende voermonsters extracten gemaakt in mengsels van methanol/water en aceton/water/zoutzuur.

### 12.2.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

De RIKILT oestrogene gist test (OGT) en de RIKILT androgene gist test (AGT) bestaan uit gemodificeerde gistcellen die na blootstelling aan stoffen of extracten met respectievelijk een oestrogene of androgene activiteit, een groen fluorescerend eiwit (yEGFP) aanmaken. De gemeten fluorescentie is een rechtstreekse maat voor de hoeveelheid oestrogene (OGT) of androgene (AGT) activiteit van de geteste stoffen of extracten [6,7,8,9]. Hoewel deze testen niet zijn gevalideerd voor het aantonen van een anti-oestrogene of anti-androgene werking, kunnen ze hiervoor wel worden gebruikt door te onderzoeken wat het effect is van stoffen of extracten op de sterkte van het fluorescentie-sigitaal na toediening van extra oestrogeen (17 $\beta$ -estradiol) of androgeen (17 $\beta$ -testosteron) [10].

Zicomill is onderzocht op eventuele (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit met behulp van deze testen. Zicomill is opgewerkt volgens beschreven en voor voeders gevalideerde methoden voor het aantonen van oestrogenen en androgenen in brijvoerders, melkpoeders en diervoeders met behulp van de OGT- en AGT-test [11,12]. De opwerking is niet identiek voor de OGT- en AGT-test, maar vertoont wel grote overeenkomsten. In het kort, een hoeveelheid Zicomill wordt geëxtraheerd met een methanol/natriumacetaat buffer (1/1 v/v) en daarna gecentrifugeerd. Het supernatant wordt op pH=4,8 gesteld met azijnzuur en over een C18- en NH<sub>2</sub>-kolom gezuiverd. Het op deze manier verkregen acetonitril-extract wordt gebruikt voor de bepaling van de (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit in de OGT- en AGT-test door in drievoud een hoeveelheid van het extract (hoogste niet-toxische

dosering) in 96-wells microtiterplaten met 50 µl 4% DMSO oplossing te pipetteren. Om de acetonitril kwijt te raken wordt de plaat gedroogd. Voor het bepalen van de oestrogene of androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing direct 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie toegevoegd en vervolgens het fluorescentie-signaal gemeten. Voor het bepalen van de anti-oestrogene of anti-androgene activiteit wordt aan het residu in de 4% DMSO oplossing eerst oestrogeen (17β-estradiol) of androgeen (17β-testosteron) toegevoegd waarna 200 µl van een OGT- of AGT-gistsuspensie wordt toegevoegd en het fluorescentie-signaal wordt gemeten.

#### 12.2.4. Antioxidant activiteit

De antioxidant activiteit van een stof of extract kan worden bepaald met de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) test. Bij deze test wordt fluoresceïne geïncubeerd met een peroxy-radicaal generator (2,2'-azobis(2-amidinopropaan) dihydrochloride; AAPH). De gevormde peroxy-radicalen beschadigen het fluoresceïne waardoor het fluorescentie-signaal langzaam dooft [13,14]. Toevoeging van stoffen of extracten die de peroxy-radicalen onschadelijk kunnen maken (antioxidanten), leidt tot een vertraagde uitdoving van het fluorescentie-signaal. De mate waarin de uitdoving van het fluorescentie-signaal wordt vertraagd is een maat voor de antioxidant activiteit van de toegevoegde stof of het extract [13,14].

Zicomill, het Zicomill verrijkte kippenvoer en controle kippenvoer zijn onderzocht op eventuele antioxidant activiteit met behulp van de ORAC-test. De monsters zijn in een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met achtereenvolgens een hexaan/dichloormethaan (1/1 v/v) mengsel en een aceton/water/azijnzuur (70/29,5/0,5 v/v) mengsel [15]. Voor het bepalen van de lipofiele ORAC-waarde zijn de hexaan/dichloormethaan-extracten ingedampt, residuen opgenomen in aceton, verder verdund in een 7% (g/v) cyclodextrine-oplossing in water/aceton (1/1 v/v) en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [16]. Voor het bepalen van de hydrofiele ORAC-waarde zijn de aceton/water/azijnzuur-extracten direct verdund in een fosfaatbuffer pH=7,4 en getest volgens een in de literatuur beschreven en gevalideerde methode [13,14].

#### 12.2.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

De antimicrobiële activiteit van een (planten)stof of extract kan worden bepaald door middel van bacteriële groei-curves. Bij deze test wordt de proliferatie van bacteriën gemeten in een groeimedium waaraan ook resazurine is toegevoegd. Hierbij wordt het resazurine door de levende bacteriën omgezet in een fluorescerend reactieproduct. Het fluorescentie-signaal kan worden gekwantificeerd met een fluorescentie-meter en is een maat voor het aantal bacteriën [17].

Zicomill is onderzocht op eventuele antimicrobiële activiteit tegen een klinisch isolaat van *Escherichia coli* (collectienummer 465) uit kippen. Hiertoe is Zicomill met een *accelerated solvent extractor* (ASE-apparaat) geëxtraheerd met ethanol waarna dit oplosmiddel onder verlaagde druk aan een rotatieverdampers weer is afgedampt en het residu vervolgens nog is gevriesdroogd. Van dit ethanol-droogextract zijn verdunningsreeksen in LB-groei-medium gemaakt. Deze verdunningsreeksen zijn gedurende 16 uur geïncubeerd bij 37 °C met een 1:50.000 verdunde overnacht-cultuur van *E. coli* (cn 465) in aanwezigheid van resazurine volgens een aangepaste versie van een eerder beschreven protocol [17]. Bacteriegroei is gekwantificeerd door iedere 30 min de fluorescentie te meten.

## 12.3. Resultaten en discussie

### 12.3.1. Kwalitatieve analyse

Met behulp van DLC-analyse is aangetoond dat in Zicomill voor knoflook specifieke inhoudsstoffen aanwezig zijn. Zicomill blijkt geen thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan te bevatten; in het desbetreffende chromatogram zijn namelijk geen vlekken detecteerbaar die de voor deze stoffen karakteristieke oranje-bruine kleur-reactie geven (Figuur 12.1., plaat I) [3]. Zicomill bevat daarentegen wel cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliïne) en andere zwavelhoudende aminozuren. Dit is aangetoond met een tweede DLC-systeem waarin de roze-paars gekleurde vlekken in het middelste deel van het chromatogram ( $R_f$ -waarde 0,4-0,6) duiden op de aanwezigheid van deze inhoudsstoffen (Figuur 12.1., plaat II) [4]. De aanwezigheid van cysteïne-sulfoxide derivaten is in overeenstemming met eerder gepubliceerde beschrijvingen van de inhoudsstoffen in knoflook(extracten) [18,19,20]. Naast de voor knoflook specifieke inhoudsstoffen zijn in Zicomill ook nog flavonoïden en andere fenolische verbindingen aangetoond (Figuur 12.1., plaat III; respectievelijk oranje/geel- en blauw-fluorescerende vlekken [5]) die in algemene zin aangeven dat hydrofiele extracten en/of ruw plantenmateriaal (kunnen) zijn verwerkt in het product. De aanwezigheid van de voor knoflook karakteristieke inhoudsstoffen, flavonoïden en andere fenolische verbindingen in Zicomill bevestigt de door de producent gedeclareerde samenstelling.

De reproduceerbaarheid van het productieproces van Zicomill (*batch-to-batch consistency*) is door de producent/importeur ten dele onderbouwd met analyse-certificaten van vier verschillende product-charges. Uit deze analyse-certificaten blijkt de nutritionele waarde van Zicomill (onder meer het gehalte aan eiwitten, vetten en ruwe vezels) binnen nauwe grenzen constant te zijn en wordt aangetoond dat potentiële verontreinigingen (waaronder verschillende bacteriën en schimmels) afwezig zijn. Daarnaast voldoen de product-charges aan enkele organoleptische criteria. In de analyse-certificaten worden echter geen kwalitatieve en/of kwantitatieve gegevens over (het gehalte aan) plantaardige inhoudsstoffen genoemd. Of de toegevoegde plantaardige bestanddelen per product-charge vergelijkbaar zijn qua samenstelling, kan uit de verstrekte gegevens dan ook niet worden afgeleid.

### 12.3.2. Analyse op antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica

Uit de bacteriespectrum-test en de test waarbij agar-gel hoogspanningselectroforese wordt gecombineerd met bioautografie blijkt dat het met Zicomill verrijkte kippenvoer en het bijbehorende controle-voer geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica bevatten (de detectie-limiet van de gebruikte methoden ligt tussen de 0,25 mg/kg en 3 mg/kg, afhankelijk van de onderzochte toevoegingen). Zoals verwacht mag worden, blijkt het voer dat dient als positieve controle (monensin-gesuppleteerd) daarentegen wel positief voor ionoforen in een concentratie die gebruikelijk is voor de toepassing als additief. Ondanks de afwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica vertonen zowel het met Zicomill verrijkte kippenvoer als het bijbehorende controle-voer remming van de bacteriële groei. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen wat hiervan de oorzaak is. Echter, omdat het remmende effect in beide voermonsters wordt gevonden, is het waarschijnlijk dat de groei-remming wordt veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en niet is toe te schrijven aan de toevoeging van Zicomill. Deze veronderstelling wordt bevestigd door het feit dat een ethanol-droogextract van Zicomill geen *in vitro* antimicrobiële werking laat zien (zie ook hieronder).

### 12.3.3. (Anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit

Zicomill lijkt geen *in vitro* oestrogeen- en/of androgeen-agonerende activiteit te bezitten (Tabel 12.1.). Zicomill lijkt ook geen *in vitro* oestrogeen-antagonerende activiteit te bezitten (Tabel 12.1.). In tegenstelling tot kalf urine, brijvoerders, melkpoeders en droge diervoeders [11,12,21,22], bevat Zicomill wel duidelijk componenten die het signaal van  $17\beta$ -testosteron in de AGT-test onderdrukken (Tabel 12.1.). Deze bevinding is in overeenstemming met literatuurgegevens waarin aan een inhoudsstof uit *Embelia ribes*, één van de bestanddelen in Zicomill, een anti-androgene werking wordt toegeschreven [23]. Deze resultaten maken tevens duidelijk dat meer onderzoek naar de (anti-)androgene activiteit van Zicomill wenselijk is. In de eerste plaats om vast te stellen of de onderdrukking van de signalen in de AGT-test wordt veroorzaakt door een interactie van de inhoudsstoffen in Zicomill met de receptor of door niet-specifiek remmende effecten op de gistcellen, bijvoorbeeld toxische effecten die niet direct zichtbaar zijn omdat de gistgroei niet wordt geremd maar wel de normale respons van de cellen op agonisten verstoren. Wellicht kan ook nog een eerder voor inhoudsstoffen uit knoflook, een ander bestanddeel van Zicomill, gerapporteerde verhoging van de testosteron-afbraak –leidend tot testosteron-metabolieten die niet meer in staat zijn tot activatie van de androgeen-receptor– de gevonden resultaten (deels) verklaren [24]. Meer onderzoek is daarnaast ook gewenst om vast te stellen of de afwezigheid van androgeen-agonerende activiteit van Zicomill mogelijk een vals negatief test-resultaat betreft. Ten gevolge van de gelijktijdige aanwezigheid van inhoudsstoffen met androgeen-antagonerende activiteit kan de uitslag van de bepaling op de aanwezigheid van androgeen-agonerende stoffen namelijk (negatief) worden beïnvloed.

### 12.3.4. Antioxidant capaciteit

De antioxidant capaciteit van Zicomill –uitgedrukt als ORAC-waarde in vergelijking met de referentiestof Trolox (een water-oplosbare analoog van vitamine E)– staat weergegeven in Tabel 12.1.. De antioxidant capaciteit van Zicomill is hoger in de hydrofiele fractie dan in de lipofiele fractie (Tabel 12.1.). Dit is in lijn met eerder in de literatuur gerapporteerde waarnemingen voor enkele van de plantaardige bestanddelen hierin [15,25]. Op basis van de uitgevoerde experimenten kan niet worden vastgesteld welke inhoudsstoffen de gemeten antioxidant capaciteit van Zicomill kunnen verklaren. Aan de hand van literatuurgegevens is het echter aannemelijk dat verschillende zwavelhoudende verbindingen uit knoflook alsmede een benzoquinon uit *Embelia ribes* –twee van de bestanddelen in Zicomill– in ieder geval ten dele, zullen bijdragen aan de antioxidant activiteit [25,26,27,28].

De antioxidant capaciteit van het kippenvoer zoals dat is gebruikt in de, ook in het kader van het Fyto-V project uitgevoerde, gecontroleerde *challenge*-proef bij kippen is eveneens bepaald. In het kippenvoer dat is verstrekt aan de controle-groep is een totale antioxidant capaciteit gemeten van  $59,0 \mu\text{mol Trolox-equivalenten (TE) per gram}$  ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 46,2 \pm 1,2 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 12,8 \pm 0,5 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)). In het met Zicomill verrijkte kippenvoer is een totale antioxidant capaciteit van  $57,0 \mu\text{mol TE per gram}$  gevonden ( $\text{ORAC}_{(\text{hydrofiele})} = 44,7 \pm 1,1 \mu\text{mol TE/g}$ ;  $\text{ORAC}_{(\text{lipofiele})} = 12,3 \pm 0,8 \mu\text{mol TE/g}$ ; gemiddelde  $\pm$  SD ( $n = 2$  experimenten)).

Hoewel bepalingen van de totale antioxidant capaciteit van voer-supplementen en diervoeders zijn beschreven in de literatuur [29], ontbreekt het vooralsnog aan voldoende gegevens om de antioxidant capaciteit van Zicomill en het met Zicomill verrijkte kippenvoer in dit opzicht in perspectief te plaatsen. De voor Zicomill gemeten ORAC-waarden zijn –in vergelijking met ORAC-waarden van veel in humane voeding gebruikte ingrediënten [15]– in elk geval niet uitzonderlijk hoog. Toevoeging van Zicomill aan kippenvoer –in de door de fabrikant aanbevolen dosering– draagt daarnaast ook niet bij aan een toename van de antioxidant activiteit van de voermonsters. De antioxidant capaciteit van met Zicomill verrijkt

kippenvoer is zelfs iets lager dan dat van het controlevoer. Deze, in eerste instantie, onverwachte uitkomst, lijkt echter te wijten aan de normale experimentele variatie.

#### 12.3.5. Antimicrobiële activiteit ten opzichte van *Escherichia coli*

Zicomill lijkt geen *in vitro* antimicrobiële werking te vertonen tegen een klinisch isolaat van *E. coli* (cn 465) uit kippen; *E. coli* suspensies waar aan het groeimedium Zicomill is toegevoegd, vertonen weinig tot geen verschil met onbehandelde *E. coli* suspensies wat betreft de bacteriële groei (Figuur 12.2.). Slechts bij de hoogste dosering van Zicomill die is getest, lijkt de proliferatie van bacteriën in geringe mate geremd (Figuur 12.2.). De positieve controle (ampicilline) laat daarentegen in een dosering van 5 µg/ml nog een volledige remming van de bacteriële groei zien (gegevens niet getoond). De waargenomen daling in het fluorescentie-signaal na meer dan 5 uur meten, kan niet worden toegeschreven aan een verminderde bacteriële groei maar is waarschijnlijk het gevolg van een verdere omzetting van het door de bacteriën uit resazurine gevormde fluorescerende reactieproduct (resorufine) in een kleurloos en niet-fluorescerende metaboliet (hydroresorufine) [30]. Deze resultaten lijken in tegenspraak met eerdere publicaties waarin voor enkele van de plantaardige bestanddelen (of inhoudsstoffen hieruit) in Zicomill wel antimicrobiële activiteiten tegen *E. coli* zijn beschreven [31,32,33,34]. Het is dan ook mogelijk dat het product als zodanig of andere – anders dan het hier onderzochte ethanol-droogextract – extracten van Zicomill wel antimicrobiële activiteit bezitten. Nader onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

#### 12.4. Conclusies en samenvatting

- De resultaten van de kwalitatieve analyse bevestigen de gedeclareerde samenstelling van Zicomill. Het is daarentegen vooralsnog niet eenduidig aangetoond dat de samenstelling van Zicomill per product-charge constant is.
- Hoewel is aangetoond dat antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica afwezig zijn in met Zicomill verrijkt kippenvoer en het bijbehorende controle-voer, hebben deze voermonsters toch een remmende werking op de bacteriële groei. Waarschijnlijk wordt dit effect veroorzaakt door een of meerdere component(en) in het voer zelf en is het niet toe te schrijven aan de toevoeging van Zicomill.
- Zicomill laat een anti-androgene activiteit zien in een functionele test. Hoewel deze test normaal gesproken wordt toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt de waargenomen werking er in dit geval niet op dat Zicomill ook daadwerkelijk deze contaminanten bevat. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit Zicomill is bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor Zicomill waargenomen anti-androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met Zicomill verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen dosering is zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja).
- Zicomill bevat antioxidanten. Of deze verbindingen bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten van Zicomill is echter de vraag. Bij de dosering waarin Zicomill volgens instructie van de producent aan het diervoer is toegevoegd, is namelijk geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan antioxidanten in het diervoer.
- Het ethanol-droogextract van Zicomill heeft geen duidelijk remmende werking op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *E. coli* uit kippen. Het kan echter niet worden

uitgesloten dat het product als zodanig of andere extracten hieruit wel een antibacteriële activiteit bezitten.

- Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen onderbouwing lijken te geven voor de veronderstelde positieve effecten van Zicomill op de darmgezondheid van kippen, mag hieruit niet geconcludeerd worden dat Zicomill onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat Zicomill wel degelijk een gunstige invloed heeft op de darmgezondheid en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose. Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van Zicomill op *Eimeria*-soorten echter niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om dit kruidenproduct nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. Uit de resultaten van dit *in vitro* onderzoek kan dan ook alleen worden geconcludeerd dat het ethanol-droogextract van Zicomill waarschijnlijk geen effect heeft bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Mogelijk heeft het product als zodanig wel een remmende werking op de groei van *E. coli* en zou het dus werkzaam kunnen zijn in deze gevallen. Nader onderzoek zal dit moeten bevestigen.

### **12.5. Dankbetuiging**

Met dank aan Dr H. van Egmond van het RIKILT, WageningenUR, voor de analyse van voermonsters op de aanwezigheid van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en veterinair toegepaste antibiotica. Met dank aan Dr T. Bovee van het RIKILT, WageningenUR, voor de bepaling van de (anti-) oestrogene en (anti-)androgene activiteit. De bepalingen van de antioxidant activiteit werden gefinancierd uit een aanvullende subsidie van het Ministerie van LNV (project-nr. 77244001). Met dank aan Dr E. van Duijkeren en Dr W. Gaastra van de afdeling Infectieziekten en Immunologie van de faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, voor het ter beschikking stellen van de *E.coli* klinische isolaten uit de kip.

### **12.6. Referenties**

- 1 Van Asseldonk AGM. Fyto-V intern rapport; overzicht van de achtergrondliteratuur bij de Fyto-V dierproeven, deel 1: pluimvee (coccidiose-challenge). Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2007.
- 2 Kleijer-Ligtenberg G, Van Asseldonk AGM. Deelverslag werkpakket 2B project Fyto-V; kruidenpreparaten getest bij vleesvarkens, legkippen en melkvee. Instituut voor Etnobotanie en Zoöfarmacognosie, Beek-Ubbergen, 2008.
- 3 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):291-303.
- 4 Europese Farmacopee 6.0. Monografie: *Garlic powder, allii sativi bulbi pulvis* (01/2008:1216).
- 5 Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis; a thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlijn; 1996 (tweede druk):195-245.
- 6 Bovee TFH, Helsdingen JR, Koks PD, Kuiper HA, Hoogenboom LAP, Keijer J. Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene* 2004;325:187-200.
- 7 Bovee TFH, Helsdingen JR, Rietjens IMCM, Keijer J, Hoogenboom LAP. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and green

- fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004;91:99-109.
- 8 Bovee TFH, Helsdingen JR, Hamers ARM, Van Duursen MBM, Nielen MWF, Hoogenboom LAP. A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonist and antagonists. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;389:1549-58.
  - 9 Bovee TFH, Lommerse JPM, Peijnenburg AACM, Antunes Fernandes E, Nielen MWF. A new highly androgen specific yeast biosensor, enabling optimisation of (Q)SAR model approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008;108:121-31.
  - 10 Bovee TFH, Schoonen WGEJ, Hamers ARM, Jorge Bento M, Peijnenburg AACM. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1111-9.
  - 11 Bovee TFH, Bor G, Heskamp HH, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation and application of a robust yeast estrogen bioassay for the screening of estrogenic activity in animal feed. *Food Addit. Contam.* 2006;23:556-68.
  - 12 Bovee TFH, Heskamp HH, Bor G, Lasaroms JJP, Helsdingen JR, Hoogenboom LAP, Nielen MWF. Validation of a yeast bioassay for screening androgenic activity in calf urine and feed. Manuscript in voorbereiding, 2008.
  - 13 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4619-26.
  - 14 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:4437-44.
  - 15 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.
  - 16 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as a solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:1815-21.
  - 17 Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003;36:162-7.
  - 18 Wereld Gezondheids Organisatie. Monografie: *Bulbus allii sativi*. In: WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva; 1999 (deel 1):16-32.
  - 19 Brace LD. Cardiovascular benefits of garlic (*Allium sativum* L). *J. Cardiovasc. Nurs.* 2002;16(4):33-49.
  - 20 Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.* 2006;136:716S-25S.
  - 21 Nielen MWF, Bovee TFH, Heskamp HH, Lasaroms JJP, Sanders MB, Van Rhijn JA, Groot MJ, Hoogenboom LAP. Screening for estrogen residues in calf urine: comparison of a validated yeast estrogen bioassay and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 2006;23:1123-31.
  - 22 Nielen MWF, Lasaroms JJP, Essers ML, Sanders MB, Heskamp HH, Bovee TFH, Van Rhijn J, Groot MJ. The ultimate veal calf reference experiment: Hormone residue analysis data obtained by gas liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007;586:30-4.
  - 23 Agrawal S, Chauhan S, Mathur R. Antifertility effects of embelin in male rats. *Andrologia* 1986;18(2):125-31.

- 24 Pinto JT, Qiao C, Xing J, Suffoletto BP, Schubert KB, Rivlin RS, Huryk RF, Bacich DJ, Heston WDW. Alterations of prostate biomarker expression and testosterone utilization in human LNCaP prostatic carcinoma cells by garlic-derived S-allylmercaptocysteine. *Prostate* 2000;45:304-14.
- 25 Joshi R, Kamat JP, Mukherjee T. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies. *Chem. Biol. Interact.* 2007;167:125-34.
- 26 Okada Y, Tanaka K, Fujita I, Sato E, Okajima H. Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. *Redox Rep.* 2005;10(2):96-102.
- 27 Okada Y, Tanaka K, Sato E, Okajima H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. *Org. Biomol. Chem.* 2006;4(22):4113-7.
- 28 Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J. Med. Food.* 2006;9(2):205-13.
- 29 Smet K, Raes K, De Smet S. Novel approaches in measuring the antioxidative potential of animal feeds: the FRAP and DPPH methods. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86:2412-6.
- 30 O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. j. Biochem.* 2000;267:5421-6.
- 31 Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999;1(2):125-9.
- 32 Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62(11):4238-42.
- 33 Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2007;29(2):79-92.
- 34 Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Ethnopharmacol.* 2004;94(1):49-54.



**Tabel 12.1.:** Antioxidant activiteit, oestrogeen-(ant)agonerende activiteit en androgeen-(ant)agonerende activiteit van Zicomill.

<b>Zicomill</b>		
Antioxidant activiteit	Hydrofiele ORAC-waarde	334,9 ± 15,9 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Lipofiele ORAC-waarde	21,6 ± 2,8 µmol TE/g <sup>a</sup>
	Totale ORAC-waarde	356,5 µmol TE/g <sup>b</sup>
RIKILT oestrogene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
	Antagonerende activiteit	Negatief <sup>c</sup>
RIKILT androgene gist test	Agonerende activiteit	Negatief <sup>d</sup>
	Antagonerende activiteit	Verdacht <sup>e</sup>

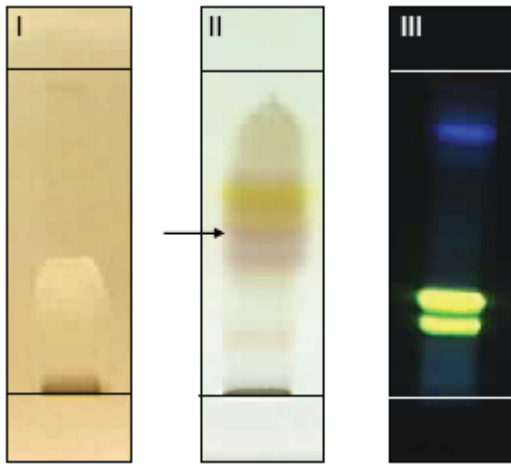
<sup>a</sup> Waarde uitgedrukt als gemiddelde ± SD (n = 2 experimenten); TE = Trolox-equivalenten.

<sup>b</sup>  $ORAC_{(totaal)} = ORAC_{(hydrofiel)} + ORAC_{(lipofiel)}$ ; TE = Trolox-equivalenten.

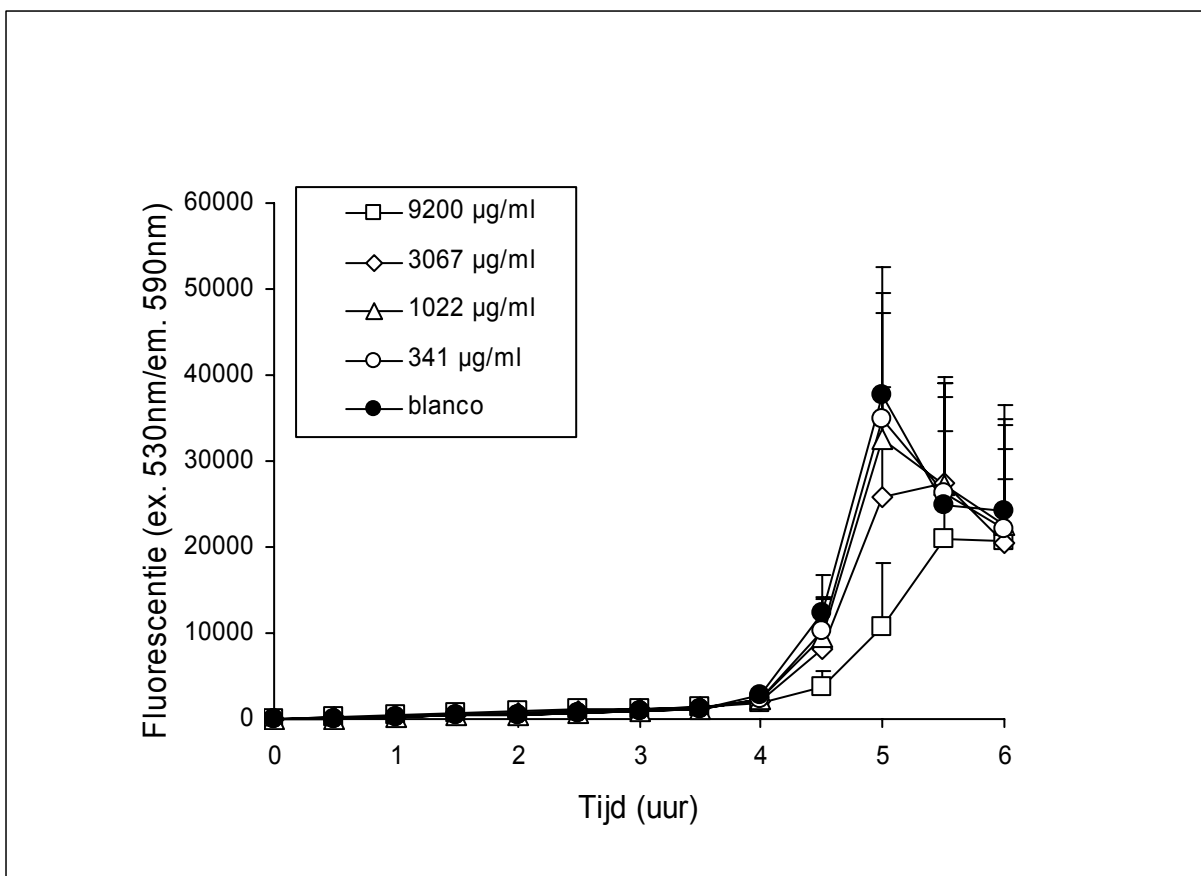
<sup>c</sup> Geen (ant)agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 33 mg product.

<sup>d</sup> Geen agonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product. Omdat het extract wel een antagonerende werking heeft, is er echter een verhoogde kans dat deze uitslag vals negatief is.

<sup>e</sup> Antagonerende activiteit waargenomen bij een extract-dosering die equivalent is aan 60 mg product.



**Figuur 12.1.:** Kwalitatieve analyse van de in Zicomill aanwezige inhoudsstoffen met behulp van dunne-laag chromatografie (DLC). *Plaat I:* DLC-systeem voor het aantonen van alliin en andere thiosulfinaten en afbraakproducten hiervan (waaronder diallyl-sulfide): Silica 60 F254; toluen/ethyl acetaat (10/3 v/v); palladium-(II)-chloride-reagens. *Plaat II:* DLC-systeem voor het aantonen van cysteïne-sulfoxide derivaten (waaronder alliiene) en andere zwavelhoudende aminozuren: Silica 60 F254; ethanol/propanol/water/azijnzuur (2/1/1/1 v/v); ninhydrine-reagens. De pijl geeft de vlek aan die correspondeert met alliiene. *Plaat III:* DLC-systeem voor het aantonen van algemeen in planten voorkomende flavonoïden/fenolen: Silica 60 F254; ethyl acetaat/water/mierenzuur/azijnzuur (100/27/11/11 v/v); natuurstof-reagens.



**Figuur 12.2.:** Effect van het ethanol-droogextract van Zicomill op de bacteriële groei van een klinisch isolaat van *Escherichia coli* uit kippen (antimicrobiële activiteit).

### 13. EINDCONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- De resultaten van de kwalitatieve analyse van het inhoudsstoffenpatroon van de geselecteerde kruidenproducten zoals die is uitgevoerd met dunne-laag chromatografie of spectrometrische technieken, bevestigen de door de producenten/importeurs gedeclareerde samenstelling. Voor acht van de in dit onderzoek betrokken kruidenproducten is door de producenten/importeurs tevens aangetoond dat het productieproces reproduceerbaar is, dat wil zeggen dat de verschillende product-charges van deze kruidenproducten vergelijkbaar zijn qua samenstelling. Echter, voor drie van de onderzochte kruidenproducten kan vooralsnog geen uitspraak worden gedaan over de reproduceerbaarheid van het productieproces; enerzijds omdat de producenten/importeurs geen uitgebreide productinformatie of analyse-certificaten ter beschikking hebben gesteld of anderzijds omdat de verstrekte gegevens van dien aard zijn dat hieruit niet eenduidig geconcludeerd kan worden dat de samenstelling van het betreffende product per productie-charge constant is. Een constante samenstelling van de kruidenproducten (standaardisatie) vormt de beste garantie voor een betrouwbare effectiviteit. Immers, als de kruidenproducten die in de dagelijkse praktijk van de biologische veehouderij toegepast (gaan) worden qua inhoudsstoffenpatroon vergelijkbaar zijn met de producten die onder gecontroleerde proefomstandigheden en/of praktijkproeven als werkzaam zijn bevonden dan zullen deze naar alle waarschijnlijkheid ook vergelijkbaar zijn in werkzaamheid. **Het wordt daarom aanbevolen om aan dit punt van reproduceerbaarheid (standaardisatie) in de toekomst extra aandacht te besteden.**

- In de met de geselecteerde kruidenproducten verrijkte diervoeders en bijbehorende controlevoeders –zoals die in het kader van werkpakket Deel 2B zijn gebruikt in praktijkproeven bij koeien met een verhoogd celgetal, praktijkproeven met varkens en een gecontroleerde *challenge*-proef bij jonge leghennen– zijn geen antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica aangetroffen. Desondanks is met de gebruikte test-systemen voor verscheidene van de voermonsters aangetoond dat deze toch een remmende werking op bacteriële groei hebben. De antibacteriële eigenschappen van (inhoudsstoffen in) enkele van de kruidenproducten kunnen dit resultaat mogelijk deels verklaren maar het is waarschijnlijk dat een of meerdere component(en) in het voer zelf ook bijdragen. **Het wordt daarom aangeraden om de geschiktheid van de gebruikte test-systemen nader te onderbouwen. De momenteel gebruikte methodieken zijn namelijk specifiek ontwikkeld voor het opsporen van antimicrobiële groeibevorderaars, coccidiostatica en/of veterinair toegepaste antibiotica. Inhoudsstoffen uit kruiden kunnen (in hoge doseringen) echter ook een antibacteriële activiteit vertonen. Hiermee moet bij de interpretatie van de test-resultaten rekening worden gehouden om vals-positieve uitslagen ten gevolge van de toevoeging van diervoederadditieven op kruidenbasis te voorkomen. Het wordt ook aanbevolen om nader onderzoek te doen naar de identiteit van plantaardige componenten met een antimicrobiële activiteit omdat dit bij kan dragen aan de validering van de test-systemen.**

- Met behulp van functionele testen voor (anti-)oestrogene en (anti-)androgene activiteit is aangetoond dat één kruidenproduct oestrogene activiteit bezit en dat enkele andere kruidenproducten een anti-oestrogene en/of anti-androgene werking hebben (respectievelijk drie en negen van de onderzochte kruidenproducten). Hoewel deze functionele testen normaal gesproken worden toegepast om (synthetische) hormonale residuen in diervoeders op te sporen, duidt deze positieve uitslag er in dit geval niet op dat de betreffende kruidenproducten ook daadwerkelijk deze contaminanten bevatten. Het is waarschijnlijker dat de resultaten kunnen worden verklaard uit de aanwezigheid van bepaalde inhoudsstoffen die

van nature (in kleine hoeveelheden) voorkomen in de plantaardige grondstoffen waaruit de kruidenproducten zijn bereid en die door de gebruikte extractie-procedure in hogere doseringen in de test-monsters aanwezig zijn. Overigens is het niet aannemelijk dat de voor de kruidenproducten waargenomen (anti-)oestrogene en/of (anti-)androgene activiteit ook daadwerkelijk zal resulteren in een beïnvloeding van de hormoonhuishouding van dieren die met deze producten verrijkte diervoeders eten; de aanbevolen doseringen van de kruidenproducten zijn zo laag dat hiervan geen fysiologische effecten zijn te verwachten, of in ieder geval geen effecten die uitstijgen boven de potentiële hormonale beïnvloeding die het gevolg is van bestanddelen die normaliter in basisvoer voorkomen (zoals bijvoorbeeld soja). **Het wordt aangeraden om de geschiktheid van de gebruikte test-systemen nader te onderbouwen. De momenteel gebruikte methodieken zijn namelijk specifiek ontwikkeld voor het opsporen van (synthetische) hormonale residuen. Inhoudsstoffen uit kruiden kunnen (in hoge doseringen) echter ook een (anti-)oestrogene en/of (anti-)androgene activiteit vertonen. Hiermee moet bij de interpretatie van de test-resultaten rekening worden gehouden om vals-positieve uitslagen ten gevolge van de toevoeging van diervoederadditieven op kruidenbasis te voorkomen. Het wordt ook aanbevolen om nader onderzoek te doen naar de identiteit van plantaardige componenten met een (anti-)oestrogene en/of (anti-) androgene activiteit omdat dit bij kan dragen aan de validering van de test-systemen.**

- Alle onderzochte kruidenproducten blijken fenolen en/of antioxidanten te bevatten. Bij de doseringen waarin de kruidenproducten volgens instructie van de producent aan het diervoer zijn toegevoegd, wordt echter geen significante toename gevonden in het totale gehalte aan fenolische verbindingen en/of antioxidanten in het diervoer. Ook bij de twee kruidenproducten die als zodanig aan dieren worden verstrekt, blijkt de inname van fenolen en antioxidanten bij gebruik volgens voorschrift van de producent gering in vergelijking met de totale hoeveelheid fenolische verbindingen en antioxidanten die in het dagelijkse voer aanwezig zijn. Het is dan ook de vraag of de fenolische verbindingen en antioxidanten in de kruidenproducten bijdragen aan de potentiële gezondheidseffecten hiervan.

- Twee van de drie kruidenproducten die zijn onderzocht op aan uiergezondheid gerelateerde onderzoeksparameters vertonen activiteit ten aanzien van het functioneren van polymorf-kernige granulocyten (PMN's) en de biofilm-formatie door *Staphylococcus aureus*. Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van deze twee kruidenproducten op de uiergezondheid, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. **Behalve een uitbreiding en verdieping van het in dit rapport beschreven onderzoek naar het mogelijke werkingsmechanisme, zou daarbij de farmacokinetiek en metabolisatie van de kruidenproducten, en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit, in het lichaam van de koe een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.**

- Voor het derde kruidenproduct dat is onderzocht op aan uiergezondheid gerelateerde onderzoeksparameters, lijken de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek geen nadere onderbouwing te geven van de door de producent gedeclareerde effecten. Hieruit mag echter niet worden geconcludeerd dat dit kruidenproduct onwerkzaam is. Door de producent is tijdens de inventarisatie (werkpakket Deel 1) namelijk met meerdere dierproeven aangetoond dat dit kruidenproduct wel degelijk een gunstige invloed heeft op de uiergezondheid. Het kan daarom niet worden uitgesloten dat de in dit *in vitro* onderzoek gebruikte experimentele methoden (extract-bereiding en/of test-systemen) niet geschikt zijn voor het onderbouwen van de werking van dit kruidenproduct. Dit wordt bevestigd door enkele onderzoeken waaruit blijkt dat een ander werkingsmechanisme ten grondslag ligt aan de positieve beïnvloeding van de uiergezondheid door dit product. **Het wordt daarom aanbevolen om de bruikbaarheid van de beschikbare *in vitro* testen ter onderbouwing van de**

**uiergezondheid nader te evalueren en zo mogelijk nieuwe, relevantere onderzoeksparameters te identificeren.**

- Alle vier de kruidenproducten die zijn onderzocht op aan darmgezondheid bij varkens gerelateerde onderzoeksparameters vertonen activiteit ten aanzien van het functioneren van PMN's en de groei van *Escherichia coli* bacteriën. Hoewel de uitkomsten van het *in vitro* onderzoek een verdere onderbouwing lijken te vormen voor de veronderstelde positieve effecten van deze kruidenproducten op de darmgezondheid van varkens, is aanvullend onderzoek nodig om hierover een eenduidig oordeel te kunnen geven. **Behalve een uitbreiding en verdieping van het in dit rapport beschreven onderzoek naar het mogelijke werkingsmechanisme, zou daarbij de farmacokinetiek en metabolisatie van de kruidenproducten, en/of de werkzame inhoudsstoffen hieruit, in de darm van het varken een belangrijk punt van aandacht moeten zijn.**

- Binnen de ter beschikking staande laboratorium-faciliteiten was *in vitro* onderzoek naar het directe effect van de kruidenproducten op *Eimeria*-soorten niet mogelijk. In verband met het in de praktijk waargenomen potentiërende effect van *E. coli* op de darmschade en/of mortaliteit ten gevolge van *Eimeria*-besmetting, is er daarom voor gekozen om enkele droogextracten van deze kruidenproducten nader te analyseren op een eventuele antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen. De resultaten van dit *in vitro* onderzoek laten zien dat de geteste droogextracten van vier van de vijf kruidenproducten geen antibacteriële activiteit vertonen. Het is echter niet uitgesloten dat de producten als zodanig wel een effect hebben op de groei van *E. coli* en dus van nut kunnen zijn bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. Nader onderzoek zal dit moeten uitwijzen. Het droogextract van het vijfde kruidenproduct vertoont wel antibacteriële activiteit tegen klinische isolaten van *E. coli* uit kippen en dit kruidenproduct is dus mogelijk ook van nut bij gevallen van coccidiose die worden gecompliceerd door additionele bacteriële besmettingen. **Omdat de toegepaste *in vitro* test in dit geval beperkte relevantie lijkt te hebben voor de onderbouwing van de darmgezondheid bij kippen, en dan met name in verband met de weerstand tegen coccidiose, wordt het aanbevolen om beter bruikbare onderzoeksparameters te identificeren en de geselecteerde kruidenproducten hierin nader te onderzoeken.**





# Onderzoek naar biomarkers

## Aanvullend onderzoek project Fyto-V

*Rapport VFFT*

Dr. J. Schrickx , Faculteit Diergeneeskunde, Afd. Farmacologie, Farmacie en Toxicologie (VFFT)

Drs. F. Woutersen van Nijnanten VFFT

Dhr. G. De Vrieze, VFFT

Prof. Dr. J. Fink-Gremmels VFFT

Drs. G. Kleijer-Ligtenberg, IEZ, coördinator werkpakket 2 B

Dr. M. Groot, RIKILT, project coördinator



**Faculteit Diergeneeskunde**  
**Afdeling Farmacologie, Farmacie en Toxicologie (VFFT)**  
**Universiteit Utrecht**  
**Yalelaan 104**  
**3584 CM Utrecht**

**E-mail: J.Fink@uu.nl**

---

**Dit onderzoek is uitgevoerd in het kader van het door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit gesubsidieerde project “ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren van en/of behandelen van dierziekten” in opdracht van RIKILT, Wageningen UR.  
Projectleider: Dr. M. Groot.**



## INHOUDSOPGAVE

<b>A. SAMENVATTING</b> .....	<b>4</b>
<b>B. SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>Part 1:</b> .....	<b>9</b>
<b>Cytochrome P450 (CYP450) as potential biomarker in the assessment of natural botanicals used as feed additives in the diet for pigs</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. Rationale:</b> .....	9
<b>1.2. Materials and Methods</b> .....	10
1.2.1. Sample collection .....	10
1.2.2. Preparation of microsomal fractions .....	10
1.2.3. Incubation of microsomal fractions and spectrophotometric analysis of CYP450 content ..	10
<b>1.3. Results</b> .....	10
<b>1.4. Discussion and conclusions</b> .....	12
<b>Part 2.</b> .....	<b>13</b>
<b>Hemoxigenase 1 (HMOX-1) and xanthine oxido-reductase (XOR) as potential biomarkers in the assessment of natural botanicals used as feed additives in the diet for pigs</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1. Introduction</b> .....	13
<b>2.2. Materials and Methods</b> .....	13
2.2.1. RNA isolation.....	13
2.2.2. Reverse transcriptase reaction.....	14
2.2.3. Primer development .....	14
2.2.4. Real-time PCR analysis.....	14
<b>2.3. Results</b> .....	15
<b>2.4. Discussion and conclusions</b> .....	18

## A. SAMENVATTING

In het vervolg van de varkensproeven zoals beschreven in bijlage 2, werden op het tijdstip van slacht van alle dieren levermonsters verzameld voor onderzoek op biomarkers. De term biomarker verwijst hier naar enzymen en genen, die in weefsel fysiologisch aanwezig zijn en verminderd of verhoogd tot expressie komen tengevolge van bepaalde prikkels. Veranderingen in gehalten van deze biomarkers zijn dus een indicatie voor blootstelling aan schadelijke stoffen, of juist een afname van deze blootstelling. De hypothese, die ten grondslag ligt aan het gebruik van kruidenpreparaten bij varkens is, dat deze tot een algemene verbetering van de darmgezondheid en tot een verhoging van de weerstand van dieren tegen infectieziekten leiden en zodoende bijdragen aan een verbeterde gezondheid en welzijn. In een wetenschappelijke benadering zouden deze effecten echter door objectieve meetparameters gemeten en gekwantificeerd moeten worden. Dit is de doelstelling van het onderzoek naar de zogenaamde biomarkers.

De lever is een orgaan dat een poortwachterfunctie heeft en het lichaam moet beschermen tegen pathogene micro-organismen en giftige stoffen die de darmbarrière konden passeren. De levercellen reageren op de blootstelling aan pathogenen en schadelijke stoffen met adaptatieprocessen die meetbaar zijn. Daarom werden voor dit onderzoek monsters van leverweefsel onderzocht, waarbij in een eerste aanzet 3 verschillende parameters gemeten werden:

- (1) **Het cytochroom P450 systeem:** dit is een enzymstelsel dat in de lever aanwezig is om schadelijke stoffen om te zetten (biotransformeren) in onschadelijke, beter wateroplosbare metabolieten, die dan ook gemakkelijker uitgescheiden kunnen worden. Het enzymstelsel wordt gestimuleerd indien er veel schadelijke stoffen aanwezig zijn, zijn activiteit neemt af als er weinig schadelijke stoffen aanwezig zijn. Dit kan doordat er minder schadelijke stoffen met het voer worden opgenomen of omdat er minder in de darmen ontstaan. Hieruit volgt de werkhypothese dat fytofarmaca of gezondheidsbevorderende kruiden het gehalte aan cytochroom P450 in de lever doen dalen.

De meetresultaten van de levermonsters van slachtvarkens laten zien dat na de behandeling van de dieren met de drie producten, het totaal gehalte aan cytochroom P450 in de lever inderdaad afneemt. De statistische bewerking van de resultaten laat echter geen significant verschil zien, mede door het feit dat de resultaten van de individuele dieren een vrij grote spreiding laten zien. Dit betekent dat deze test, die voor proefdieren is ontwikkeld, duidelijke beperkingen in praktijkonderzoeken heeft.

- (2) **Expressie van genen die een rol spelen bij oxidatieve stress:** oxidatieve stress op cellulair niveau is eveneens een indicatie voor de blootstelling van een orgaan aan schadelijke stoffen of ontstekingsprocessen veroorzaakt door pathogenen in de darm. De term oxidatieve stress verwijst naar complexe biochemische veranderingen in een cel, die erop gericht zijn de gevolgen van de reactieven zuurstofmetabolieten te beperken. Om dit te bereiken worden een aantal enzymen, die deze reactieven zuurstofmetabolieten onschadelijk kunnen maken in toenemende mate tot expressie gebracht. Hieruit volgt de werkhypothese dat bij dieren, die met fytofarmaca of gezondheidsbevorderende kruiden behandeld worden, de expressie van deze enzymen (markers van oxidatieve stress) laag blijft, omdat er minder stressfactoren aanwezig zijn.

In een eerste aanzet werd gekozen voor het meten van de expressie van 2 enzymen, te weten het haem oxygenase (HMOX-1) en xanthine oxidoreductase (XOR). Van beide enzymen is bekend dat zij in gevallen van oxidatieve stress meer tot expressie komen. Dientengevolge werd uit het leverweefsel mRNA geïsoleerd, en de expressie van de enzymen met een kwantitatieve PCR reactie bepaald. Voor dit onderzoek was het nodig om specifieke primers voor de PCR reactie in varkensweefsels te ontwikkelen.

De resultaten laten een significante afname zien (in vergelijking met de niet-behandelde controledieren) van de mRNA expressie van HMOX-1 in de levers van die dieren die gevoerd zijn met de drie verschillende additieven. De mRNA expressie van XOR daalde significant in één groep varkens, namelijk in de groep die voer kregen met Digestamine® als toevoeging. Ook bij de twee andere groepen varkens, die de producten Biomin P.E.P. 1000® en Ropidar® toegediend kregen werd een lagere expressie van XOR in de levers gemeten dan in de levers van niet behandelde controledieren. Dit verschil was niet significant.

## **Conclusies en aanbevelingen**

De gepresenteerde resultaten laten zien dat de toevoeging van de drie geselecteerde kruidenmiddelen meetbare (positieve) veranderingen in het dier teweeg brengen. De meting van cytochroom P450 blijkt onder praktijkomstandigheden minder geschikt te zijn als indicator (marker) van een effect, omdat de interindividuele spreiding bij varkens veel hoger is dan bij proefdieren. De kwantitatieve analyse van de expressie van enzymen, die betrokken zijn bij de verwerking van oxidatieve stress bleek echter betrouwbare resultaten te geven en ook verschillen tussen producten inzichtelijk te maken.

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat door dit onderzoek op moleculair niveau het mogelijk wordt om objectief de positieve (of negatieve) effecten van kruidenproducten in praktijkproeven aan te tonen. Hierbij kan worden opgemerkt, dat (na ontwikkeling van de methoden) voor het PCR onderzoek slechts minimale hoeveelheden van weefsel nodig zijn, waardoor het mogelijk wordt ook bioptmateriaal (dunne-naald biopten) van levende dieren te onderzoeken, zodat dit onderzoek ook in de groeifase van de dieren kan worden uitgevoerd.

Het wordt aanbevolen het aantal biomarkers uit te breiden en hierbij ook indicatoren voor ontstekingsprocessen en het immuunsysteem te betrekken. De voorbereidingen voor dit onderzoek (gen-identificatie, ontwikkelen van primers voor varkens) zijn bij de VFFT reeds begonnen.

## B. SUMMARY

In continuation of the field trials with pigs as described in **Report 2**, liver samples of all animals were collected at the time of slaughter for research on biomarkers.

The term biomarker refers to enzymes, substrates, or genes, which are present or are expressed in reaction to specific toxic or biogenic stimuli. Changes in the concentration or expression of these makers reflect the exposure to undesirable, harmful substances, or in turn the absence or decrease of exposure. The general assumption that underpins the use of herbal preparations in pig husbandry is that they lead to a general improvement in gut health and an increase in the resistance against infectious agents and hence to an improved animal health and welfare. In a scientific approach, however, these effects need to be quantified by objective parameters. The goal of the present investigations was to identify and measure such biomarkers.

The liver is an organ that has a gatekeeper function and protects the body against pathogenic micro-organisms and toxic substances that were able to pass the gut barrier. The liver cells respond to exposure to pathogens and harmful substances with adaptive mechanisms and these processes are measurable. As a first initiative in the biomarker research project, liver samples from pigs, treated with 3 different herbal products were examined, each for 3 different makers.

**(1) Cytochrome P450:** this is an enzyme system that is present in the liver (as well as many other organs) to transform harmful substances into less toxic, water soluble metabolites, which can be easily excreted. The enzyme system is induced by many harmful substances that are present in feeds, and is less active if the overall burden of toxic compound is low. The current working hypothesis is based on this assumption, postulating that herbal products may decrease the content of CYP450 in the liver. The results of the CYP450 measurements in liver samples of of pigs treated during their entire fattening period with the three selected products, showed that the total level of cytochrome P450 in the liver is actually decreasing. The statistical processing of the results, however, showed that the differences are not significant. The latter is partly due to considerable inter-individual variation between animals. This implies that this test, which was developed for laboratory animals, faces clear limitations when applied to conventional farm animals.

**(2) Expression of genes associated with oxidative stress:** Oxidative stress at the cellular level is also an indication of the exposure of a body to harmful substances or inflammatory reactions following the exposure to pathogens in or originating from the intestine. The term oxidative stress refers to a cascade of complex biochemical changes in a cell, aiming at limiting the adverse effects of reactive oxygen species (radicals). To achieve this, a number of enzymes that can process radicals are upregulated as an adaptive response to these diverse challenges. From these findings the following working hypothesis was derived: in animals, which are treated with herbal products, the expression of markers of oxidative stress and inflammation remains low, due to the fact the liver is less exposed to toxic and/or microbial pro-oxidative and pro-inflammatory factors.

As a first step the level of expression of two enzymes, namely the haem oxygenase (HMOX-1) and xanthine oxidoreductase (XOR) were measured. For both enzymes it is known that they are sensitive indicators of oxidative stress. Therefore, mRNA was isolated from the liver, and the expression of the

enzymes was measured through a quantitative PCR reaction. For this study there was a need to develop specific primers for the PCR reactions in pig tissues.

The results show a significant decrease (in comparison with the untreated control animals) of the mRNA expression of HMOX-1 in the livers of the animals fed with the three different additives with slight differences between the products tested. The mRNA expression of XOR decreased significantly only in one group of pigs, which had been given product 3 as a supplement. Also in the animals treated with the two other herbal products a trend towards a lower expression of XOR was observed, compared to the untreated control animals. These differences were not significant. Taken together, these results show that the oxidative stress at the cellular level in the treated animals was significantly lower than in the untreated control animals.

### **Conclusions and recommendations**

The results presented show that the use of selected herbal products as feed additives results in measurable (positive) changes in the animal. The analysis of the total cytochrome P450 content showed a positive trend in all feeding trials, but the individual results showed a broad variation and hence this marker seems to be less suitable for experiments under farm conditions. The quantitative analysis of the expression of genes encoding for enzymes involved cellular oxidative stress, however, appeared to give reliable results and also showed some differences between products. Hence it could be concluded that HMOX-1 and XOR expression are suitable candidates for biomarkers that can be used to monitor potential positive effects of herbal preparations used as feed additives. It is worthwhile to mention that (after development of methods) for PCR-based measurement only minimal amounts of tissue are needed, making it possible also to investigate biopsy materials (thin needle biopsies) of living animals.

It is recommended to expand the number of biomarkers, and include markers of inflammatory reactions and the innate and adaptive immune system, in the evaluation of natural (herbal) products intended for use as feed additives in animal husbandry. Basic experiments addressing these aspects are already in progress at our Department.

## FytoV – Biomarkers in the assessment of the effects of natural herbal product

### Introduction

Botanicals are applied as feed additives in pig husbandry with the aim to improve gut health and the overall resistance of the animal against infectious diseases and other stress factors, such as suboptimal feed composition, social (ranking and crowding) and climate variations.

In the frame of the FYTO-V project, three commercially available products were selected for feeding trials in fattening pigs<sup>1</sup>. *In vitro* investigations with these compounds (see also Task 2B<sup>2</sup>) indicated that the positive effects as claimed by the sponsoring companies, might be attributable to a slight antibiotic activity and to an anti-oxidant effect. The results of the *in vitro* test remained difficult to interpret, as the internal dose *in vivo* as well as the transport and biotransformation processes remain unknown for most herbal products containing mixtures of chemically diverse substances.

Based on these considerations two hypotheses were tested:

- (1) the possibility to use the hepatic CYP450 as biomarker of an effect, or
- (2) to identify and measure the expression of genes associated with an adaptive response to oxidative stress.

These parameters were measured at the end of the feeding trial with three commercial products.

Field trial 1: Biomin P.E.P 1000®

Field trial 2: Ropadiar®

Field trial 3: Digestamine®

The following sub-chapters present the rationale of the selection of the biomarker, the materials and methods used, as well as sections presenting the results and discussion for both assays.

---

<sup>1</sup> The results of the feeding trials are presented in the reports of Working Package 2B by IEZ

<sup>2</sup> See report Phyto-GeniX (Working Package 2A) on the “Kwaliteitscontrole en *in vitro* biologische activiteit).

## Part 1:

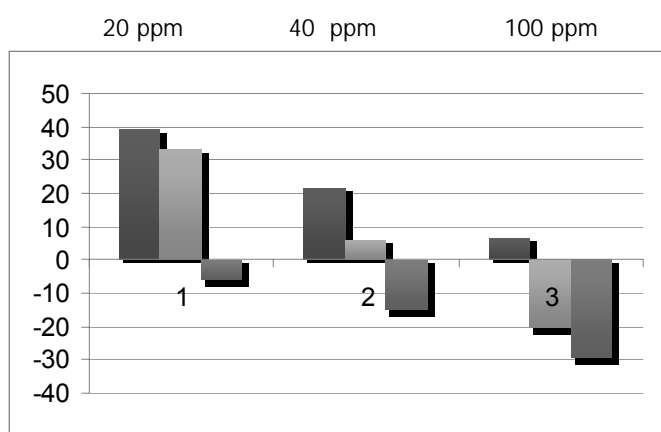
### Cytochrome P450 (CYP450) as potential biomarker in the assessment of natural botanicals used as feed additives in the diet for pigs.

#### 1.1. Rationale

The cytochrome P450 enzyme family comprise a group of heme-containing enzymes that facilitate hydroxylation and oxidation reactions of many endogenous and exogenous compounds. It is located at the smooth endoplasmic reticulum of many cell types, and a particular important localization is the liver, where this enzyme system is part of the pre-systemic defence system against pathogens and toxins. Naïve (new borne) animals have a very low expression, and the enzyme system ‘matures’ as a consequence of the exposure of the organisms – in particular the liver - to diverse xenobiotics, including many plant constituents and bacterial toxins.

Previous investigations, dating back to the 1980s when the so called antimicrobial growth promoters were developed, indicated that these compounds were able to reduce the hepatic content of CYP450. Although the exact mechanisms were never elucidated, an inverse linear correlation between the stabilisation of the microbial gastro-intestinal flora, and the CYP450 content was observed in many experiments. This could be attributable to an increased liver protein synthesis (resulting in relative decreasing CYP450 values) or indeed to a reduction in the amount of bacterial and plant toxins that could pass the intestinal barrier.

A typical example of these effects, as demonstrated for Zinc-Bacitracin, an antibiotic used for decennia as feed additive, as it remains unchanged and unabsorbed in the gastro-intestinal tract, is given in figure 1.



**Figure 1:** Relative CYP450 expression in the livers of mice exposed to increasing concentrations of the non-absorbable antibiotic Zinc-Bacitracin (Zn-BA). Data present mean results of 10 individual animals. The 1<sup>st</sup> column per set reflects the findings after 1 week (expressed as percentage of non-treated animals set to 100%), the 2<sup>nd</sup> column the data after 2 weeks, and the 3<sup>rd</sup> column de results after 3 weeks. Data set 1 corresponds to an in-feed concentration of 20 ppm Zn-BA, i.e. 20 mg/kg feed), the data set 2 and 3 to Zn-BA concentrations of 40 and 100 ppm, respectively (Data obtained from Stein, 1983, with permission of Apothekener’s SA, Oslo).

## **1.2. Materials and Methods**

### **1.2.1. Sample collection**

Samples of the liver were collected at the slaughterhouse from all animals that had participated in the feeding trials (see Working Package 2B). In brief, pieces of liver of approximately 10 g were obtained as soon as possible on a slaughter line from the carcass, put in beakers filled with ice-cold phosphate buffered saline and placed on ice. After rinsing and drying, the liver samples were fast frozen in liquid nitrogen within 60 minutes and transported to the laboratory on dry ice, where the samples were stored at -80°C until further processing.

### **1.2.2. Preparation of microsomal fractions**

Liver samples of approximately 10 g were homogenized in ice-cold buffer containing KCl (1.15% and EDTA (0.1 mM) and centrifuged at 10.000g for 25 minutes at 4°C. The supernatant was subsequently centrifuged at 100.000g for 75 minutes at 4°C. The resulting pellet was homogenized in the same buffer and centrifuged at 100.000g for 75 minutes at 4°C. The obtained pellet containing the microsomal fraction was subsequently homogenized in phosphate buffer (0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, glycerol 20%, pH7.4) and stored at -80°C until analysis. The protein content was quantified according to the method described by Lowry.

### **1.2.3. Incubation of microsomal fractions and spectrophotometric analysis of CYP450 content**

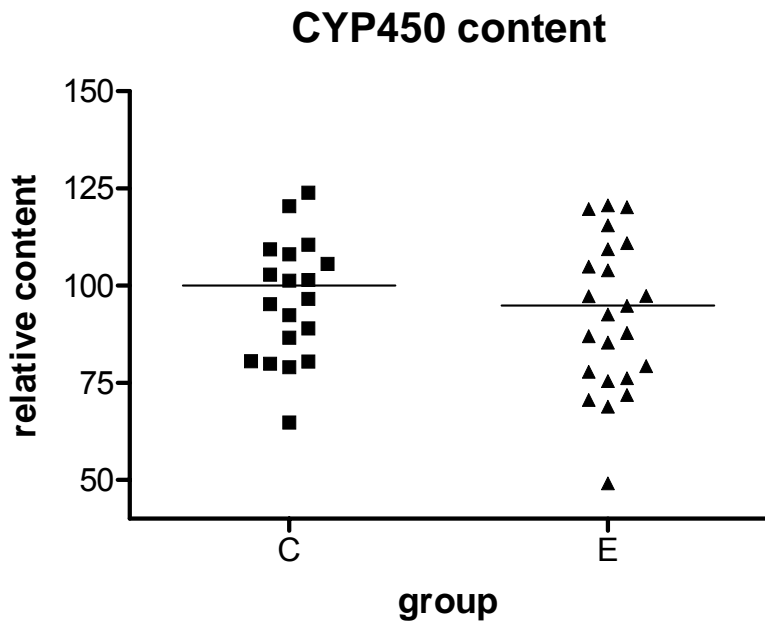
Total cytochrome P450 was determined according to the method of Schoene et al. (1972) (DT-difference spectrum). In short, the microsomal fractions were diluted 5 times in phosphate buffer (0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, glycerol 20%, pH7.4), gassed with CO for 30 seconds and the absorbance was measured from 400-490-nm and set as baseline. Sodium-dithionite solution was added to the “sample” and thoroughly mixed, after ten minutes the absorbance spectrum was recorded. The expression of the total cytochrome P-450 content was based on the difference in absorbance between 450 nm and 490 nm and converted to a concentration using a millimolar extinction coefficient of 104 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> and related to the protein content of the sample (mMol/mg protein).

The content of cytochrome P450 in the liver samples from the experimental animals was normalized to the mean content of the samples from the animals that were fed with the control feed.

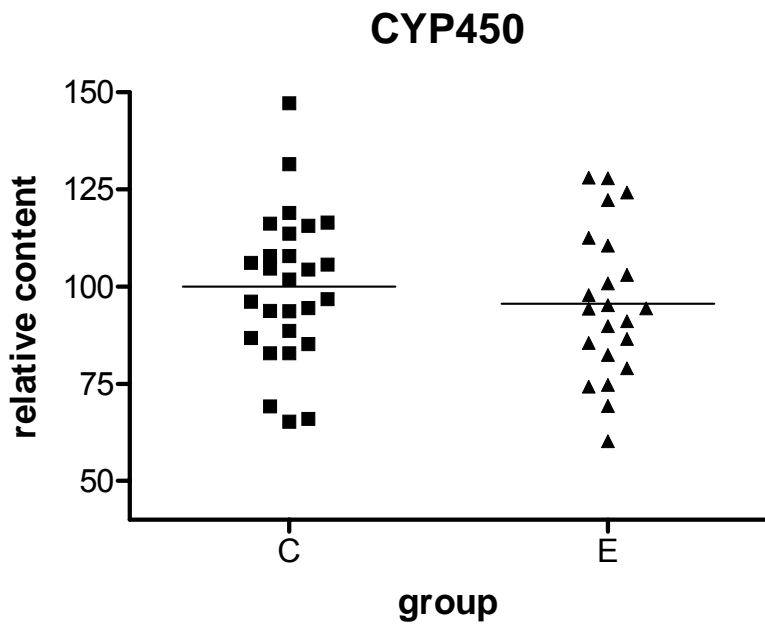
## **1.3. Results**

The relative content of CYP450 in the liver samples for each group was distributed according to a Gaussian distribution. The content of CYP450 was lower in the liver of the animals that had received feed added with the botanicals, but this was not statistically significant. The relative contents of Cytochrome P450 in pigs fed Biomin P.E.P. 1000, Ropadiar and Digestamine were 94.9, 95,6 and 94,2 % respectively (fig. 1, 2 and 3).

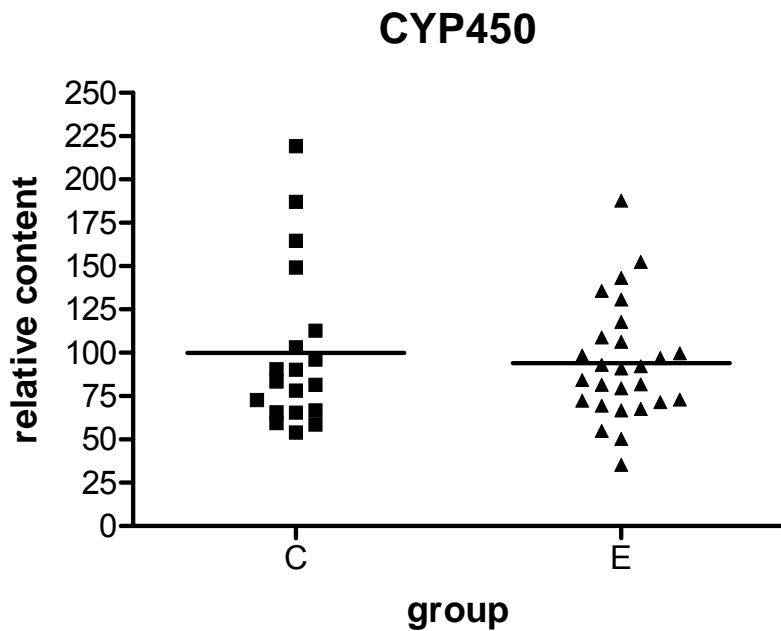




**Figure 2:** Relative content of CYP450 in liver samples of pigs fed with feed containing **Biomin P.E.P 1000®** and in liver samples of pigs fed control feed (C).



**Fig. 3:** Relative content of CYP450 in liver samples of pigs fed with feed containing **Ropadiar®** and in liver samples of pigs fed control feed (C).



**Fig. 4.** The relative content of CYP450 in liver samples of pigs fed with feed containing **Digestamine®** and in liver samples of pigs fed control feed (C).

#### 1.4. Discussion and conclusions

The presented results show a slight, but not significant change in the total amount of CYP450 in the treated animals as compared to the non-treated control groups.

An evaluation of the results from individual animals shows rather large inter-individual variations, despite the fact that animals that were reported to be clinically diseased and hence treated with antibiotics, were not included in the evaluation. These results are in contrast to previous experiments with antimicrobial feed additives that were conducted in laboratory animal species (mice) that were kept under fully controlled experimental conditions.

Given the large variability of the individual data, it is concluded that this assay is less suitable for experiments that are conducted with pigs under farm conditions.

## Part 2.

### **Hemoxygenase 1 (HMOX-1) and xanthine oxido-reductase (XOR) as potential biomarkers in the assessment of natural botanicals used as feed additives in the diet for pigs**

#### **2.1. Introduction**

Stabilising the gut microbial environment and the intestinal (permeability and immunological) barrier is assumed to decrease the 'toxic burden' of the liver and subsequently reduce the production of reactive oxygen species (ROS) and the intensity of cellular oxidative stress. The normal cell has a complex system of defence mechanism that can process ROS (and also reactive nitrogen species). Prominent antioxidant systems are superoxide dismutase or catalase and glutathione-*S*-transferase (GST). Sensitive markers of oxidative stress are hemoxygenases, in particular the inducible form hemoxygenase 1 (HMOX-1) and xanthine oxidoreductase. As an adaptive response to stress situations, the expression of these enzymes is increased. In turn, a low expression of the enzymes would be an indicator of a low (oxidative) stress level. Hence the expression was measured in the liver sample by means of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR). As a prerequisite for a PCR assays, specific primers need to be designed for porcine liver samples. Details of the protocol are outlined below.

#### **2.2. Materials and Methods**

##### **2.2.1. RNA isolation**

Liver samples of 30-60 mg taken from the liver sample of individual pigs were placed in 1000 µl Trizol Reagent. After mechanic homogenization on ice (ultra-turrax, IKA, Staufen Germany), the samples were centrifuged at 10.000g for 2 minutes and the supernatant was transferred to a new tube and heated for 5 minutes at 30°C. Chloroform (200 µl) was added and mixed by repeated inversion of the tube. After 3 minutes at 30°C and subsequent centrifugation (15 minutes at 12000 g at 4°C), the colourless upper aqueous phase containing RNA was transferred to a new vial and 500 µl isopropanol were added and the sample mixed. After centrifugation (10.000 x g for 10 minutes at 4°C), the supernatant was removed and the resulting pellet was washed twice in 75% (v/v) ethanol by centrifugation at 10.000 g for 10 minutes at 4°C. The resulting pellet was dissolved in water and stored at minus 80°C.

The RNA samples were purified on silica columns (Promega). Ethanol to a final concentration of 30% (v/v) and NaCl to a final concentration of 1 N were added to the RNA solution and the sample layered on the silica column. The RNA bound to the column was subsequently treated with DNase and washed according to the manufacture's recommendations and finally eluted in 100 µl nuclease free water.

The concentration and purity of the samples were assessed spectrophotometrically at wavelengths of 230, 260 and 280 nm for absorbance. Samples with ratios higher than 1.8 for A260/A230 and higher than 2.0 for A260/280 were used for PCR analysis.

### 2.2.2. Reverse transcriptase reaction

The RNA samples were reverse transcribed into cDNA by using iScript from Biorad containing both random hexamer and oligo dT primers and reverse modified MMLV-derived reverse transcriptase H<sup>+</sup>, according to the manufacture's recommendations.

### 2.2.3. Primer development

Primers specific for the detection of porcine Heme Oxygenase-1 (HMOX-1, NCBI accession number NM\_001004027 ) were designed. Primers specific for the detection of Xanthine dehydrogenase (XDH or XOR) in the porcine liver samples were designed by the use of EST (Expressed Sequence Tags) sequences highly homologues to human XDH (NCBI accession number NM\_000379). The primers were assessed for their specificity by blast analysis against porcine and human cDNA sequences (NCBI BLAST program). Efficiency of replication was evaluated by real-time PCR analysis of a dilution series of porcine liver cDNA and was 100 +/- 5% for both primers at the selected annealing temperatures (table 1). Melting curve analysis of the formed products demonstrated one T<sub>m</sub> for each set of primers indicating that only one product was formed.

### 2.2.4. Real-time PCR analysis

The real-time PCR analyses were performed in a MyIQ single colour detection system from Biorad using Sybrgreen supermix including sybr green as an intercalating DNA detection agent and fluorescein as an internal well factor. For each sample 1 ul of the reverse transcribed RNA was used in a PCR reaction at a final volume of 25 ul containing the supermix and gene-specific primers (table. 1).

gene	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'	Ta (°C)
HMOX-1	AGACCGCCTTCCTGCTCA	GGGTCTCTGGTCCTTAGTGTC	64
XOR	GTTTTTCGGAAGCAGATAATGTTGT	GGTGCAGTGAGTCTCCAGGTAG	60
GAPDH	GGCAAATTCACGGCACAGTCA	CTGGCTCCTGGAAGATGGTGAT	65
HPRT	ATCATTATGCCGAGGATTTGGA	CCTCCCATCTCTTTCATCACATCT	63
ACTB	GCAAATGCTTCTAGGCGGACTGT	CCAAATAAAGCCATGCCAATCTCA	64

**Table 1:** Primers used for the qPCR analysis of the target genes HMOX-1 and XOR, as well as the primers for the house-keeping genes (control genes) GAPDH, HPRT and ACTB.

### 2.2.5. Data analysis

The expression of HMOX-1 and XOR in the liver samples was normalized to the expression of internal control genes Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta actin (ACTB) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

### 2.3. Results

The expression of both HMOX-1 and XOR and the internal control genes in the individual liver samples for each group were distributed according to a Gaussian distribution. The results are presented in figures 5 – 7.

In the group of animal that received the product **Biomin P.E.P 1000** in their diet, the expression of HMOX-1 in the liver was significantly lower ( $P=0.0246$ , two-tailed unpaired t-test) of the animals that had received feed supplemented with Biomin PEP 1000 than those that were fed with the control feed (fig. 5A). No differences were measured in the expression of XOR between both groups (fig. 5B).

Figure 5A

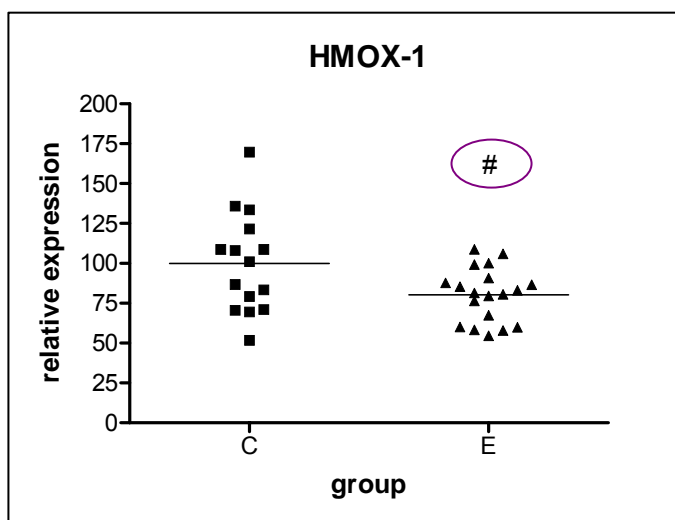
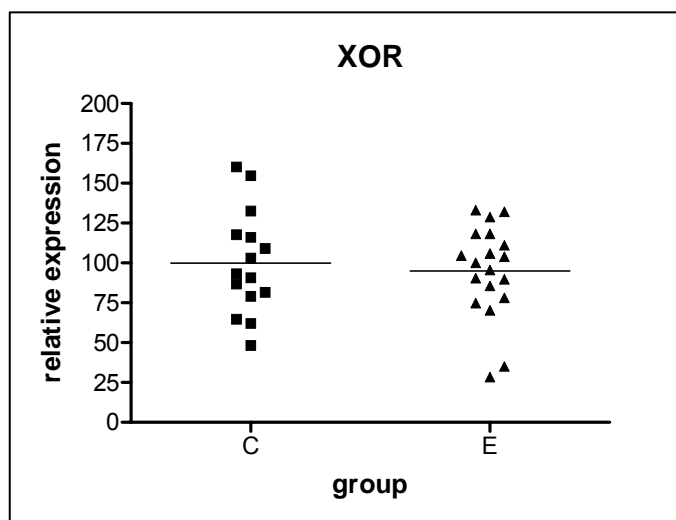


Figure 5B



**Fig. 5:** Relative expression of HMOX-1 and XOR in liver samples of pigs fed a diet containing **Biomin P.E.P. 1000** (E) and in liver samples of pigs fed control feed (C). # indicates a significant difference with  $P < 0.05$ .

The expression of HMOX-1 was lower ( $P=0.009$ , two-tailed unpaired t-test) in the liver of the animals that had received feed supplemented with **Ropadiar** than those that were fed with the control feed (fig. 6 A). No differences were measured in the expression of XOR between both groups (fig. 6B).

Figure 6A

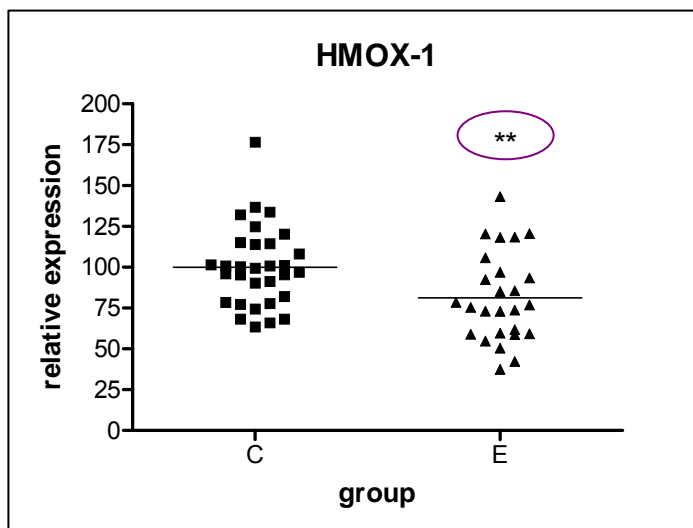
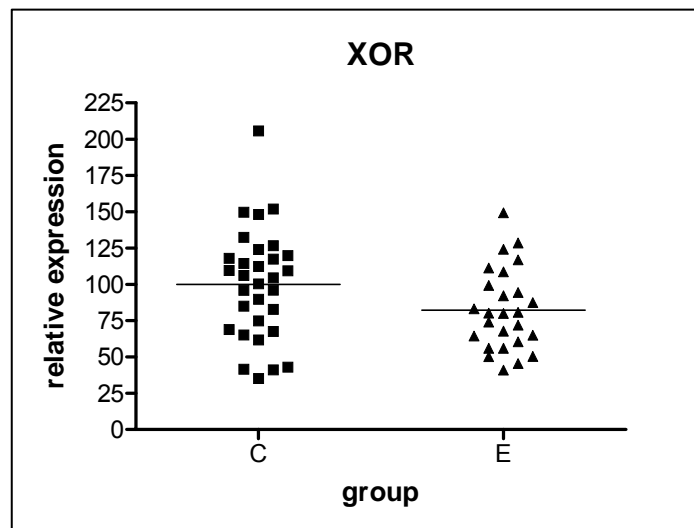


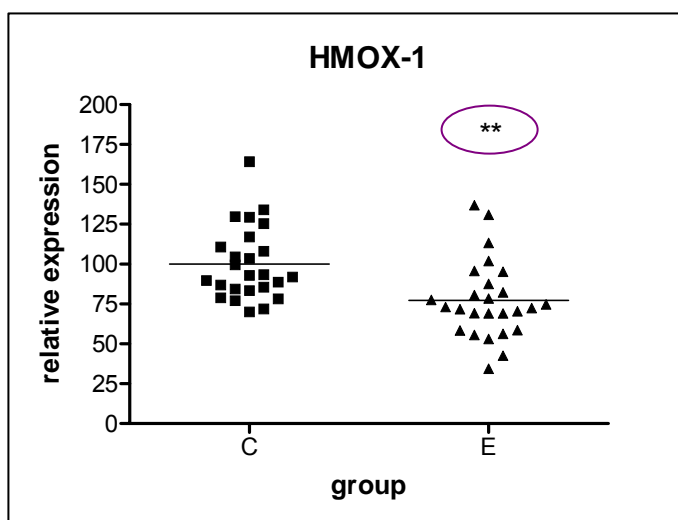
Figure 6B



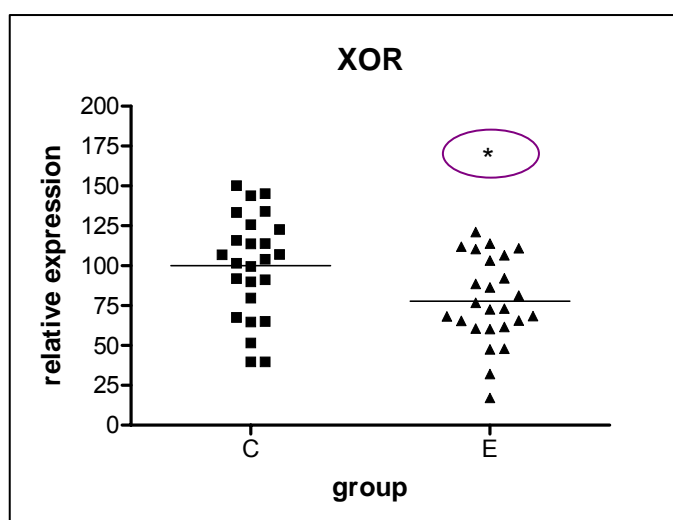
**Fig. 6.** Relative expression of HMOX-1 in liver samples of pigs fed with feed supplemented with **Ropadiar** (E) and in liver samples of pigs fed control feed (C). \*\* indicates a significant difference with  $P<0.01$ .

The expression of HMOX-1 was lower ( $P < 0.01$ , two-tailed unpaired t-test) in the liver of the animals that had received feed supplemented with **Digestamine** than those that were fed with the control feed (fig. 7A). The expression of XOR was lower as well ( $P < 0.05$ , two-tailed unpaired t-test) in the liver of animals that had received feed supplemented with Digestamine as compared to the control animals (fig. 7B).

**Figure 7A**



**Figure 7B**



**Figure 7.** Relative expression of HMOX-1 (figure 7A) and XOR (figure 7B) in liver samples of pigs fed with feed supplemented with **Digestamine** (E) and in liver samples of pigs fed control feed (C).\*\* indicates a significant difference with  $P < 0.01$ ; \* indicated a significant difference with  $P < 0.05$ .

The following Table (Table 2) presents a summary of all results indicating means and SEM (standard error of mean).

**Table 2.** Mean relative expression of HMOX-1 and XOR in liver specimen of pigs given diets with the indicated product during the entire fattening period.

		HMOX-1			XOR		
No	Feed additive	Mean rel. expression	SEM	significance	Mean rel. expression	SEM	significance
1	control	100	8.1	p= 0.025	100	8.4	none
	Biomin P.E.P.1000	80.2	3.9		95	6.6	
2	control	100	4.4	p=0.009	100	6.8	none (p=0.053)
	Ropadiar	81.3	5.3		82.3	5.5	
3	Control	100	4.6	p=0.001	100	6.4	p=0.01
	Digestamine	77.3	4.8		77.7	5.4	

## 2.4. Discussion and conclusions

The aim of these investigations was to identify and measure parameters that might be of use as biomarkers to monitor and quantify biochemical changes associated with the use of natural (herbal) products applied as feed additives. This question is based on the fact that in a healthy animals natural feed additives have only a marginal effect (non-significant increase in weight gain and improvement of feed conversion). However, it is assumed that their application results in a improvement of health and immune competence of the animal, enabling it to cope more easily with common stress situations such as changes in the diet, suboptimal feed composition, social and environmental stress, as well as exposure to pathogens.

Previous feeding trials with the sponsors of the products had already indicated positive effects in feeding trials, and these findings were supported by the *in vitro* experiments presented in Part 1 of this projects.

The results of the present experiments demonstrated that the CYP450 enzyme system, which is significantly reduced following the application of antimicrobial feed additives to laboratory animals, did show only a moderate and non-significant response. This might be attributable to the different mechanism of action, as natural herbal products have only a marginal antibiotic effect. In addition, however, it has to be considered that the inter-individual variation in the CYP450 content in farm animals is much larger than in the laboratory animals kept under entirely controlled environmental conditions. Finally, it needs to be mentioned that CYP450 measurements require at least 2 g of liver tissue, which becomes only available from animals at the time of slaughter. It is therefore concluded that CYP450 is not an optimal biomarker for investigations under field conditions.

The results related to the expression of HMOX-1 and XOR are promising. In particular HMOX-1, the inducible form of the enzyme heme oxygenase that is linked to the adaptation to oxidative stress gave interesting results in the current experiments. A major advantage is the good repeatability of the measurements, as well as the very small amounts of tissue needed to apply qPCR or micro-array methods. Hence, even *in vivo* monitoring of gene expression, using fine needle biopsies is an option in the development and testing of new and existing herbal products.

The initial assays are laborious, as they involve the design of quality control of specific primers for the analysis of porcine tissues. Once a primer bank has been established, these can be used in all forthcoming experiments (if the sequence is known primers are produced commercially by various companies). A remaining challenge is the establishment of a set of genes that are reliable indicators of the biological effects of herbal products. The two selected genes, encoding HMOX-1 and XOR are promising candidates. Further experiments are in progress to evaluate additional parameters, such as the expression of pro- and anti- inflammatory cytokines, which are also candidates to measure improved health and reduction of sub-clinical inflammatory reactions, as well as a broader array of genes related to oxidative stress. In conclusion, it can be recommended to continue the search for biomarkers using gene-expression experiments with the aim to present objective markers of potential beneficial effects of natural (herbal) products to be used as feed additives in animal husbandry.