Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką

lek. wet. Karolina Tatarczak

Wpływ seleninotriglicerydów na status zdrowotny i ekspresję wybranych genów kodujących enzymy uczestniczące w procesach antyoksydacyjnych u małych przeżuwaczy.

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Chorób Wewnętrznych
z Kliniką

Promotor:
Prof. dr hab. Przemysław Sobiech
Promotor pomocniczy:
Dr Dawid Tobolski

OLSZTYN 2023

Podziękowania

Chciałabym serdecznie podziękować mojemu promotorowi prof. dr hab. Przemysławowi Sobiechowi oraz promotorowi pomocniczemu dr Dawidowi Tobolskiemu, za ich pracę włożoną w obecny kształt niniejszej rozprawy doktorskiej, za szczerą ocenę i wsparcie na jakie mogłam liczyć na każdym etapie jej tworzenia.

W sposób szczególny pragnę podziękować moim Rodzicom, a w szczególności mojej Mamie, za wsparcie jakie otrzymałam od nich w trakcie całej ścieżki edukacji oraz niezachwianą wiarę we mnie . Osobne, rownie ważne podziękowania składam na ręce mojego męża Pawła, który niejednokrotnie odciążał mnie w moich obowiązkach domowych oraz rodzicielskich.

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów	5
1. Streszczenie	8
2. Summary	11
3. Wstęp	14
4. Cel i założenia pracy	28
5. Materiały i metody	29
6. Wyniki	40
7. Dyskusja	77
8. Wnioski	86
9. Piśmiennictwo	87

Wykaz najważniejszych skrótów

- ogólna liczba

5'IDI - 5'-dejodynaza jodotyroninowa typu I

Alb -albuminy

ALP - fosfataza alkaliczna

AST - aminotransferaza asparaginianowa

BASO - bazofile

CAT (ang. Catalase) – katalaza

cDNA (od ang. complementary DNA) - komplementarny DNA

Crea - kreatynina

DNA (ang. deoxyribonucleic acid) - kwas deoksyrybonukleinowy

dATP - deoksyadenozynotrifosforan

dCTP- deoksycytozynotrifosforan

dGTP- deoksyguanozynotrifosforan

dTTP - deoksytyminotrifosforan

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

EOS - eozynofile

GGT- gamma-glutamylotransferaza

GLUC – glukoza

GPX – peroksydaza glutationowa

H_2O-woda

H_2O_2 – nadtlenek wodoru

H_2Odd – woda dwukrotnie destylowana

HBFP - metoda barwienia z fuksyną i kwasem pikrynowym

HCT (ang. Hematocrit) - hemotokryt

HDW (ang. Hemoglobin Distribution Width) - odchylenie standardowe dla stężenia hemoglobiny w krwinkach czerwonych, inaczej anizochromia erytrocytów

HE – metoda barwienia z hemotoksyliną – eozyną

HGB – stężenie hemoglobiny we krwi

IFN-γ – interferon gamma

komórki LAK (ang. lymphokine-activated killer cells) - niespecyficzne komórki cytotoksyczne, które są wytwarzane w obecności interleukiny-2 i przy braku antygenu

komórki NK (ang. Natural Killer) – tzw. komórki „urodzeni" zabójcy,

κB- jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

LDH -dehydrogenaza mleczanowa

LUC (ang. large unstained cells,) - liczba dużych preoksydazoujemnych komórek krwi

LYMPH - limfocyty

MCH (ang. Mean Corpuscular Hemoglobin) – średnia masa hemoglobiny w krwince

MCHC (ang. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) – średnie stężenie hemoglobiny w krwince

MCSeP – selenoproteina kapsułki mitochondrialnej

MCV (ang. Mean Corpuscular Volume) – średnia objętość krwinki

MHD (ang. mulberry heart disease) – choroba morwowego serca

MONO - monocyty

MPV (ang. Mean Platelet Volume) – średnia objętość płytki krwi

mRNA (ang. messenger RNA) - matrycowy kwas rybonukleinowy

NADPH (ang. reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego 3

NEUT -neutrofile

O_2-tlen

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

PDM – pokarmowa dystrofia mięśni

PHGPX (ang. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase)- peroksydaza glutationowa wodoronadtlenku fosfolipidów

PLT (ang. Platelets) – płytki krwi (trombocyty)

PMN – leukocyty polimorfojądrowe

qPCR (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, qPCR) - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

RBC - krwinki czerwone (erytrocyty)

RDW (ang. Red-cell Distribution Width) – wskaźnik zmienności objętości krwinek czerwonych.

RNA – kwas wybonukleinowy

ROS – reaktywna forma tlenu

RT- PCR - (reverse-transcription polymeraze chain reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji

rt3- odwrócona 3,5',3'- trijodotyronina

Se- selen

Se-Cys - selenocyteina

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

SPS-2 – syntaza selenofosfaranowa

T3 - 3,5,3’-trijodotyronina

T4 – tyroksyna

TP -ang. total protein, białko ogólne

Urea- mocznik

WBC - krwinki białe (leukocyty)

1.Streszczenie

Wpływ seleninotriglicerydów na status zdrowotny i ekspresję wybranych genów kodujących enzymy uczestniczące w procesach antyoksydacyjnych u małych przeżuwaczy.

Słowa kluczowe: seleninotriglicerydy, jagnięta, koźlęta, SOD, GPX, ekspresja genów

Niedobór selenu stanowi wciąż aktualny problem zarówno w hodowlach owiec jak i kóz. Przyczynia się do powstawania zaburzeń układu immunologicznego, rozrodczego jaki i chorób, m.in. pokarmowej dystrofii mięśni. Dotyka ona głównie młodych zwierząt, w wieku 2-6 tygodni życia. Profilaktyka niedoboru tego pierwiastka obecnie opiera się na jego suplementacji preparatami iniekcyjnymi lub doustnymi, zawierającymi w składzie selen w postaci nieorganicznej lub organicznej. Formą organiczną selenu, która może być podawana zwierzętom w postaci doustnej są seleninotriglicerydy. Charakteryzują się one niską toksycznością, wysokim stopniem biodostępności oraz wchłaniania z przewodu pokarmowego.

Badania przeprowadzono na 12 jagniętach rasy kamienieckiej i 12 koźlętach rasy alpejskiej w wieku 10 dni. Zwierzęta podzielono na 2 grupy: kontrolną i doświadczalną. Grupa doświadczalna przez pierwsze 7 dni eksperymentu, była suplementowana doustnie roztworem seleninotriglicerydów w dawce 0,5 mg substancji czynnej na kg masy ciała badanego zwierzęcia. Następnie od wszystkich zwierząt pobrana została krew w 0 (przed podaniem roztworu seleninotriglicerydów grupie doświadczalnej), 1, 7, 14, 21 i 30 dniu doświadczenia. W 30 dniu doświadczenia jagnięta i koźlęta obu grup zostały poddane eutanazji w celu pobrania od nich próbek mięśni najdłuższego grzbietu, dwugłowego uda, mięśnia sercowego i wątroby.

W zakresie parametrów hematologicznych oznaczano poziom hemoglobiny, liczbę hematokrytową, liczbę krwinek czerwonych i białych oraz obliczono wskaźniki czerwonokrwinkowe (MCV, MCH i MCHC). Oznaczono także stężenie glukozy (GLUC), albumin (Alb), białka całkowitego (TP), kreatyniny (Crea), mocznika (Urea), aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy. U wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i doświadczalnej oznaczono w surowicy stężenie selenu (Se). Ponadto zbadana została aktywność enzymatyczna peroksydazy glutationowej (GPX) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Pobrane próby tkanek mięśnia najdłuższego grzbietu (*m.longisimus dorsi*), mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) i mięśnia sercowego poddano analizie histopatologicznej

w barwieniu HE (metoda barwienia z hemotoksyliną – eozyną) oraz HBFP (metoda barwienia z fuksyną i kwasem pikrynowym). Pozyskane próbki mięśni dwugłowego uda, mięśnia sercowego jagniąt i koźląt oraz mięśnia najdłuższego grzbietu jagniąt poddano analizie genetycznej i oznaczono ekspresję mRNA wybranych genów kodujących enzymy, biorące udział w procesach antyoksydacyjnych u koźląt i jagniąt, tj. *GPX1, SOD1*.

W zakresie badań hematologicznych nie zauważono istotnych różnic w przypadku większości parametrów u koźląt i jagniąt suplementowanych seleninotriglicerydami, a grupą niesuplementowaną. Jedynymi wskaźnikami, które były istotnie wyższe ($p<0,05$) u grup doświadczalnych w porównaniu z kontrolnymi były: MCHC w 21 dniu doświadczenia u jagniąt i #LYMPH, MCV, MCH, HDW w 1. dniu u koźląt. Parametry biochemiczne badane w surowicy krwi zwierząt grup doświadczalnych i kontrolnych wykazały istotne różnice w zakresie aktywności AST u owcy kamienieckiej w 1. dniu doświadczenia, która była niższa w grupie doświadczalnej oraz GGT u koźląt, która była znacząco wyższa ($p<0,05$) w grupie kontrolnej w 7, 21 i 30 dniu. W 30 dniu doświadczenia wykazano również istotnie ($p<0,05$) wyższy wynik AST u koźląt.

Wyniki badań stężenia selenu w surowicy krwi u jagniąt i koźląt wykazały, że suplementacja roztworem seleninotriglicerydów powoduje istotny ($p<0,05$) wzrost stężenia selenu w 1, 7, 14, 21 i 30 dniu doświadczenia. Podobnie u koźląt suplementowanych seleninotriglicerydami zaobserwowano znacząco wyższe stężenie selenu w surowicy grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą badaną ($p<0,05$) w 1, 7, 14, 21 i 30 dniu doświadczenia. Najwyższe stężenie selenu w grupie doświadczalnej zanotowano w 7 dniu doświadczenia zarówno w przypadku jagniąt, jak i koźląt.

Ponadto u koźląt zaobserwowano istotnie wyższą ($p<0,05$) aktywność GPX w 1, 7, 14, 21 i 30 dniu doświadczenia. Podobnie aktywność SOD była istotnie wyższa ($p<0,05$) w przypadku koźląt suplementowanych seleninotriglicerydami. Podobnie u jagniąt wykazano istotnie wyższą aktywność GPX i SOD po suplementacji seleninotriglicerydami. Badania poziomu selenu w surowicy koźląt i jagniąt wykazały istotnie wyższą ($p<0,05$) koncentrację tego pierwiastka w przypadku grup doświadczalnych.

Badaniem histopatologicznym, w barwieniu HE, tkanki mięśniowej mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi*) oraz mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*), w przypadku 4 z 6 koźląt grupy kontrolnej oraz 4 z 6 jagniąt grupy kontrolnej, wykazano

odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania. Nie zaobserwowano takich zmian w mięśniu sercowym, a także w żadnej z prób pobranych od zwierząt należących do grup doświadczalnych. Barwieniem HBFP u tych samych 4 koźląt i 4 jagniąt należących do grupy kontrolnej, stwierdzono zmiany charakteryzujące się rozległą martwicą całych włókien mięśniowych z rozpadem sarkoplazmy i zanikiem poprzecznego prążkowania oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych. Nie zaobserwowano takich zmian w grupach doświadczalnych ani w mięśniu sercowym. W 1 z 6 badanych jagniąt grupy kontrolnej oprócz odcinkowego szkliwienia z zanikiem poprzecznego prążkowania, w pojedynczych włóknach mięśniowych zaobserwowano także odcinkową martwicę włókien z rozpadem grudkowym sarkoplazmy i naciekiem makrofagów, limfocytów, pojedynczych eozynofilii, w próbkach mięśnia najdłuższego grzbietu jak i mięśnia dwugłowego uda.

Analiza ekspresji genu *GPX1* i *SOD1* nie wykazała istotnych różnic statystycznych między grupami. Po suplementacji seleninotriglicerydami zauważono nieznaczny wzrost ekspresji genu *GPX1* w przypadku mięśnia dwugłowego uda (*m.biceps femoris*) i wątroby u koźląt oraz podobny wzrost ekspresji genu *SOD1* w przypadku badanych fragmentów wątroby u koźląt, a także m. najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi)*, wątroby i mięśnia sercowego u jagniąt. W przypadku m. najdłuższego grzbietu, m. sercowego i wątroby u jagniąt, a także mięśnia sercowego u koźląt obserwowano nieznaczny spadek aktywności ekspresji genu *GPX1*. Podobnie spadek ekspresji genu *SOD1* zaobserwowano w przypadku mięśnia dwugłowego uda jagniąt i m. dwugłowego uda oraz serca u koźląt. W przypadku m. dwugłowego uda u jagniąt poziom ekspresji *GPX1* pozostawał na poziomie porównywalnym do grupy kontrolnej.

2. Summary

The effect of selenitetriglycerides on the health status and expression of selected genes encoding enzymes involved in antioxidant processes in small ruminants.

Key words: selenitetriglycerides, lambs, kids, SOD, GPX, gene expression

Selenium deficiency remains a current issue in both sheep and goat farming. It contributes to the occurrence of immune system, reproductive system disorders, and diseases such as nutritional muscular dystrophy. This mainly affects young animals, aged 2-6 weeks old. The prevention of selenium deficiency is currently based on its supplementation with injectable or oral preparations, containing selenium in inorganic or organic form. Selenitetriglyceride are an organic form of selenium that can be administered to animals orally. They are characterized by low toxicity, high bioavailability, and absorption from the digestive tract.

The research was carried out on 12 lambs of the Kamieniecka sheep and 12 kids of the Alpine goat, aged 10 days. The animals were divided into 2 groups: control and experimental. For the first 7 days of the experiment, the experimental group was orally supplemented with a solution of selenitetriglycerides, at a dose of 0.5 mg selenitertriglicerydes, per kg of body weight. Then, blood was collected from all animals on the 0th (before administration of the selenitetriglyceride solution for the experimental group), 1st, 7th, 14th, 21st and 30th day of the experiment. On the day 30. of the experiment, lambs and kids from both groups were euthanized, then the samples of the longisimus dorsi muscle, biceps femoris muscle, myocardium and liver was taken from them.

The following hematological parameters were determined in whole blood: hemoglobin level, hematocrit number, red and white blood cell counts, and red cell indices (MCV, MCH and MCHC). Glucose (GLUC), albumin (Alb), total protein (TP),), creatinine (Crea), urea (Urea), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH) were also determined in the serum. Serum selenium (Se) concentrations were determined in all animals of the control and experimental groups. In addition, the activity of the glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) in whole blood of all animals, were determined . Tissue samples of the longissimus dorsi muscle (*m.longisimus dorsi*), biceps femoris muscle (*m. biceps femoris*) and myocardium were stained with hematoxylin-eosin (HE) and with hematoxylin-

basic fuchsin picric acid (HBFP). In the tissue samples of biceps femoris muscle, myocardium and liver in kids and lambs, and longissimus dorsi muscle in lambs the analysis of mRNA expression of selected genes encoding enzymes involved in antioxidant processes, i.e. *GPX1*, *SOD1*, was determined.

No significant differences were observed for most hematological parameters between control and experimental group of kids and lambs Parameters that were significantly higher ($p<0.05$) in the experimental group of lambs was MCHC on the day 21 and #LYMPH, MCV, MCH, HDW on the day 1 in kids. Biochemical parameters tested in the blood serum of the animals of the experimental and control groups showed significant differences ($p<0.05$) in AST activity in lambs on the day 1 of the experiment, which was lower in the experimental group, and GGT in kids, which was significantly higher ($p<0.05$) in the control group on the days 7, 21 and 30. The 30th day of the experiment also showed a significantly ($p<0.05$) higher AST activity in the kids of the experimental group.

The results of serum selenium concentration in lambs and kids showed that supplementation with selenintetriglyceride causes a significant ($p<0.05$) increase in selenium concentration on the 1st, 7th, 14th, 21st and 30th days of the experiment. The highest selenium concentration in the experimental group was recorded on day 7 of the experiment for both lambs and kids.

In addition, significantly higher ($p<0.05$) GPX activity was observed in kids on the 1st, 7th, 14th, 21st and 30th days of the experiment. Similarly, SOD activity was significantly higher ($p<0.05$) in selenitetriglyceride-supplemented kids. Moreover, GPX and SOD activities was significantly higher in group supplemented lambs. Serum selenium concentration in kids and lambs was significantly higher ($p<0.05$) for both experimental groups after selenitetriglicerydes supplementation.

Histopathological examinations of muscle samples stained in HE, in the case of 4 out of 6 kids and 4 out of 6 lambs of the control group, showed segmental sarcoplasmic dystrophy with striatal atrophy. No such changes were observed in the myocardium and in any of the samples taken from animals of the experimental groups. HBFP staining showed in the same 4 kids and 4 lambs belonging to the control group, lesions characterized by extensive necrosis of entire muscle fibers with disintegration of sarcoplasm and striatal atrophy, as well as the

presence of stimulated myogenic cells and phagocytic cells. No such changes were observed in the experimental groups or in the myocardium both groups.

In addition to the aforementioned changes, the following changes were observed in the tissue of longisimus dorsi muscle and biceps femoris muscle collected from 1 of the 6 studied lambs of the control group: muscle fibers necrosis with sarcoplasma dystrophy and the infiltration of macrophages, lymphocytes, single eosinophils in single muscle fibers. Analysis of *GPX1* and *SOD1* gene expression showed no significant differences between the groups.

After supplementation with selenitetriglycerides, an increase in the expression of the *GPX1* gene in the biceps femoris muscle, liver in kids was observed. Moreover, an increase in the expression of the *SOD1* gene in the analyzed fragments of the liver in kids, as well as in the longissimus dorsi muscle *(m. longisimus dorsi),*, liver and myocardium in lambs was noticed. In the case of the longisimus dorsi muscle, myocardium e and liver in lambs, as well as the heart muscle in kids, a decrease in the expression of the *GPX1* gene was observed. Similarly, the *SOD1* gene expression was decreased the biceps femoris muscle (*m. biceps femoris)* of lambs and the biceps femoris muscle muscle and the heart in kids. In the case of the biceps femoris muscle in lambs, the expression level of *GPX1* remained at a level comparable to the control group.

3. Wstęp

3.1 Rola selenu w organizmie

Selen jest pierwiastkiem śladowym, który spełnia szereg funkcji w organizmach żywych, m.in. jest składnikiem wielu enzymów kontrolujących szlaki metaboliczne, bierze również udział w metabolizmie hormonów tarczycy, kontroluje funkcje rozrodcze i działa neuroprotekcyjnie (Barceloux, 1999, Maiorino i in., 1999, Gorini i in., 2021). Pierwiastek ten działaa także antyproliferacyjne i przeciwzapalne oraz stymuluje układ odpornościowy. W spełnianiu swoich funkcji współdziała z witaminą E i aminokwasami zawierające siarkę. Niedobór selenu może prowadzić do obniżenia statusu zdrowotnego u zwierząt gospodarskich i strat ekonomicznych w gospodarstwach (Mehdi i Dufrasne, 2016).

Se został odkryty przez Berzeliusa w 1818 roku jako efekt uboczny produkcji kwasu siarkowego. Jego zawartość w glebie szacowana jest na około 0.05–0.5 mg Se kg^{-1} (Lemly, 2004), ale różni się w zależności od szerokości geograficznej. W niektórych państwach stężenie selenu w glebie może ulegać znacznym zmianom na niewielkich odległościach. Taką charakterystykę rozkładu stężeń selenu w glebie zaobserwowano np. w Chinach i Brazylii, gdzie może być bardzo niskie (<0,1 mg/kg) lub wysokie (>0,5 mg/kg) na terenach odległych zaledwie o 20 km od siebie (Dhillon i Dhillon, 2003). W USA, Irlandii czy Indiach zawartość selenu w glebie może być bardzo wysoka i sięgać nawet do 100 mg/kg (Dhillon i Dhillon, 2003), co może stanowić zagrożenie występowaniem selenozy na tych terenach. Polska jest krajem dość ubogim w selen, a obszary narażone na jego niedobór w glebie to m.in. Lubelszczyzna, południowa część kraju, a także Pomorze oraz Warmia i Mazury (Bednarek i Bik, 1994b).

3.1.1 Wybrane selenoproteiny i ich znaczenie

Do niedawna selen był uważany za pierwiastek toksyczny. Dziś wiemy już, że jest elementem wielu szlaków metabolicznych u zwierząt, jako składnik tzw. selenoprotein (Burk i Hill, 2015). Selenoproteiny to grupa białek, które zawierają selen w postaci selenocysteiny, będącej analogiem cysteiny, zawierającej atom selenu zamiast atomu siarki. Do tej pory scharakteryzowano ponad 30 selenoprotein z czego u człowieka zidentyfikowano do tej pory około 25 (Roman i in., 2014). Białka te są silnymi przeciwutleniaczami, chronią komórki przed

uszkodzeniami spowodowanymi przez wolne rodniki, które mogą prowadzić do chorób nowotworowych i miażdżycy u ludzi.

Jedną z najlepiej poznanych selenoprotein jest peroksydaza glutationowa (GPX). Rolę Se jako składnika GPX1 odkryli Rotruck i in., (1973). Dziś wiemy, że w organizmach kręgowców w miejscu katalitycznym enzym zawiera selenocysteinę, podczas gdy u bezkręgowców i roślin enzym ten pozbawiony jest selenu (Ursini i in., 1995). Obecnie wyróżnia się kilka form peroksydazy glutationowej.

GPX1 zaangażowana jest w procesy detoksyfikacji nadtlenku wodoru. Wraz z GPX4 tłumi kaskady fosforylacji, głównie poprzez zapobieganie inaktywacji fosfataz przez H_2O_2 lub wodoronadtlenki lipidów. Największe ilości tego izoenzymu występują w erytrocytach, komórkach nerek i wątroby. GPX2 (peroksydaza cytozolowa) pełni rolę ochronną dla nadtlenków lipidowych w komórkach przewodu pokarmowego. Hamuje także procesy nowotworowe w komórkach jelit. GPX3 jest obecna głównie w osoczu, w mniejszym stopniu ulega ekspresji także w nerkach, płucach, sercu, sutku, wątrobie (wyłącznie u człowieka) i łożysku. Redukuje nadtlenki wodorowe pochodzące z lipidów złożonych, np. fosfatydylocholiny, choć ze znacznie mniejszą efektywnością w porównaniu z GPX4. Niedobór GPX3 ułatwia agregację płytek krwi, prawdopodobnie poprzez hamowanie biosyntezy tromboksanu. Jest również uważana za supresor nowotworów. GPX4, nazywana fosfolipidową wodoronadtlenkowa peroksydazą glutationową (ang. *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase* – PHGPX, inaczej GPX4) ulega ekspresji w trzech różnych formach. Udowodniono, że forma cytozolowa hamuje aktywację czynnika jądrowego κB wywołaną interleukiną-1 oraz biosyntezę leukotrienów. Ponadto jest kluczowym regulatorem ferroptazy, ponieważ redukuje grupy hydroperoksylowe złożonych lipidów i wycisza lipooksygenazy. Poprzez alternatywne wykorzystanie substratów, forma jądrowa przyczynia się do zagęszczania chromatyny. Mitochondrialna GPx4 tworzy mitochondrialną osłonkę plemników, a tym samym gwarantuje męską płodność. W odróżnieniu od pozostałych peroksydaz glutationowych, które mają postać tetrameryczną, GPX4 jest monomerem. Niewielkie rozmiary oraz właściwości hydrofobowe cząsteczek GPX4 sprawiają, że sprawdzają się one jako reduktory utlenowanych fosfolipidów i cholesterolu błon komórkowych. (Brigelius-Flohé i Flohé, 2020, Gawłowska i Rabe-Jabłońska, 2008).

Ważną grupą selenoenzymów są dejodynazy jodotyroninowe, które regulują przemianę tyroksyny (T4) w 3,5,3'-trijodotyroninę (T3), metabolicznie aktywny hormon tarczycy lub w

odwróconą 3,5',3'-trijodotyroninę (rt3), nieaktywny hormon. Dejodynaza 5'-jodotyroniny typu 1 jest obecna w wątrobie i nerkach, które podobnie jak tarczyca produkują hormon T3. Jego obecność stwierdzono również w mózgu i przysadce mózgowej u przeżuwaczy. Dejodynaza 5'-jodotyroniny typu 2 jest obecna w mózgu i przysadce mózgowej wszystkich gatunków zwierząt i katalizuje przemianę T4 do T3 w tkankach, które nie są w stanie wychwycić krążącego T3. Dejodynaza 5'-jodotyroniny typ 3 przekształca T4 w rt3, a T3 w dijodotyroninę w mózgu, skórze i łożysku i jest odpowiedzialna za inaktywacje hormonów tarczycy. Niedobór selenu może utrudniać powyższy proces konwersji, co sugeruje, że niski poziom tego pierwiastka może wpływać na funkcje tarczycy (Winther i in., 2020, Köhrle, 2015).

Reduktaza tioredoksyny jest selenoproteiną, która jest obecna u wszystkich ssaków. W obecności elektronów pobranych z NADPH, katalizuje ona redukcję utlenionej tioredoksyny i przenosi zdolność redoks tioredoksyny do białek komórkowych (Lu i Holmgren, 2009). Tioredoksyny mogą przekazywać elektrony do enzymów redoks, w tym do reduktazy rybonukleotydowej i peroksydazy tioredoksyny. Reduktaza tioredoksyny prawdopodobnie również uczestniczy w transkrypcji i wiązaniu DNA. Tioredoksyny działają również jako czynniki wzrostu, inhibitory apoptozy i reduktory hydroperoksydazy (Arnér i Holmgren, 2006).

Kolejnym białkiem zawierającym selen jest selenoproteina P, która jest jedną z dwóch zidentyfikowanych selenoprotein osocza. Obecność selenoproteiny P została potwierdzona we krwi, wątrobie, sercu, nerkach i jądrach. Selenoproteina P wiąże proteoglikany heparyny w komórkach i macierzy międzykomórkowej. Ponadto posiada zdolność do do wiązania jonów metali, co pozwala na chronienie komórek śródbłonka przed utleniaczami (Takamura, 2020, Tsutsumi i Saito, 2020).

Selen jest wbudowany także w selenoproteinę W. Po raz pierwszy została ona wyizolowana z tkanki mięśniowej szczura (Whanger, 2000). Jej obecność stwierdzono również w śledzionie, jądrach, sercu i mózgu. Funkcje tej selenoproteiny nie są do końca poznane. Badania sugerują, że selenoproteina W uczestniczy w różnicowaniu i rozwoju mięśni poprzez ochronę mioblastów przed stresem oksydacyjnym (Whanger, 2009).

W plemnikach zidentyfikowano do tej pory dwa rodzaje selenoprotein: selenoproteinę P i selenoproteinę TXNRD3 (Michaelis i in., 2014) - białka te znajdują się w mitochondriach plemników i decydują o integralności witek plemników. Przy niedoborze selenu jego stężenie znacznie spada, ruchliwość plemników jest osłabiona, a spermatogeneza jest upośledzona.

Do grupy białek zawierających selen zalicza się również selenoproteinę K, która pełni rolę przeciwutleniacza w kardiomiocytach (Fredericks i Hoffmann, 2015, Marciel i Hoffmann, 2019), selenoproteiny M i H , które mają działanie neuroprotekcyjne (Zhang i in., 2010), selenoproteinę N, która wspomaga pracę mięśni (Castets i in., 2012, Silwal i in., 2020, Zito i Ferreiro, 2021), selenoproteinę S, której niedobór może prowadzić do raka jelita grubego u ludzi (Ghelichkhani i in., 2022, Yu i Du, 2017) oraz inne białka o mniej poznanych funkcjach, takie jak selenoproteiny T, O i I (Lopez Heras i in., 2011).

Selen wpływa także pośrednio na działanie niektórych enzymów. Przykładem może być tu dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), która przyczynia się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego poprzez skuteczne wygaszanie rodnika ponadtlenkowego i przekształcanie go w mniej toksyczny nadtlenek wodoru, który następnie enzym katalaza (CAT) rozkłada do wody i tlenu, aby zapobiec uszkodzeniu DNA. W przypadku zmniejszonego poziomu selenu i innych przeciwutleniaczy w diecie, aktywność SOD spada, co powoduje zwiększenie poziomu wolnych rodników w organizmach (Hosnedlova i in., 2017). Sugeruje się, że wpływ na to może mieć GPX4, która najprawdopodobniej bierze udział w aktywacji SOD (Liu i in., 2021).

3.1.2 Wpływ selenu na układ odpornościowy

Selen warunkuje prawidłowe działanie układu odpornościowego poprzez regulację humoralnych mechanizmów odpornościowych, a także zwiększanie poziomu immunoglobulin typu M (Avery i Hoffmann, 2018, Huang i in., 2012). Suplementacja zwierząt selenem zwiększa poziom przeciwciał, wzmaga aktywność fagocytarną neutrofili, granulocytów i makrofagów, a po stymulacji miogenami powoduje wzrost limfocytów T (Hoffmann, 2007), (Kamada i in., 2007). Selen jest niezbędny w produkcji czynnika hamującego migrację limfocytów oraz interleukiny 2 (Wintergerst i in., 2007), która przyspiesza proliferację, dojrzewanie i aktywność limfocytów T (Shrimali i in., 2008) . Limfocyty T są szczególnie wrażliwe na niedobór selenu, ponieważ ich błona komórkowa zawiera lipidy, które są łatwiej utleniane niż błona lipidowa limfocytów B (Arthur i in., 2003).

Niedobór selenu obniża liczbę i aktywność cytotoksyczną limfocytów T, co prowadzi do zmniejszenia produkcji limfotoksyn (Carlson i in., 2010), (Hawkes i in., 2001) Badania przeprowadzone na grupie krów (Cao i in., 1992) wykazały, że u tych zwierząt niedobór selenu prowadzi do obniżenia poziomu proliferacji limfocytów (stymulowanej konkawaliną A). U krów, u których odporność była upośledzona z powodu zmniejszenia liczby limfocytów T,

podawanie suplementów selenu miało działanie immunostymulujące. Suplementacja selenem nasila także transformację blastyczną limfocytów śledziony i zapobiega zmniejszeniu proliferacji limfocytów (Hefnawy i Tórtora-Pérez, 2010).

Należy wspomnieć, że peroksydaza glutationowa oraz reduktaza tioredoksyny również wpływają na prawidłowe działanie układu odpornościowego. Grupy tiolowe odpowiedzialne są za utrzymanie na powierzchni błon limfocytów w stanie zredukowanym, co z kolei zwiększa proliferacyjną odpowiedź limfocytów na bodźce miogenne, produkcję immunoglobulin oraz aktywność lizosomalną limfocytów. (Akyol i in., 2007). Niedobór selenu może zaostrzyć proces zapalny w organizmie, co prowadzi do spadku aktywności selenoenzymów, które hamują nadmierną syntezę kwasu arachidowego z kwasu linolowego (Sakr i in., 2007). Przy prawidłowym poziomie selenu w organizmie peroksydaza glutationowa blokuje fosfolipazę A, co skutkuje obniżeniem stężenia kwasu arachidonowego i jego metabolitów potrzebnych do syntezy leukotrienu B4. Synteza prostacyklin z arachidonianu nasila się, co hamuje szlak metaboliczny lipooksygenazy (Johnson i in., 2000).

Wykazano również, że stosowanie selenianu sodu jako immunostymulatora wpływa na ekspresję podjednostek α i β interleukiny 2 na powierzchni aktywowanych limfocytów T i B, komórek NK oraz LAK. Nie wpływa jednak na endogenne stężenia interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 2 (IL-2) czy interferonu γ (IFN-γ). Wiążąc się z receptorami IL-2, IL-1 indukuje sygnał przejścia aktywowanych komórek z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego (József i Filep, 2003). Niedobór selenu hamuje migrację neutrofili oraz zakłóca funkcjonowanie receptorów na powierzchni tych komórek. Mechanizm ten prawdopodobnie polega na utlenianiu tubuliny przez nadmiar H_2O_2, co prowadzi do uszkodzenia mikrotubul neutrofili (Haddad i in., 2002). Neutrofile zwierząt dotkniętych niedoborem selenu wykazują osłabioną zdolność do wytwarzania i uwalniania wolnych rodników wewnątrz komórki (Yang i in., 2004).

3.1.4 Wpływ selenu na układ rozrodczy i procesy nowotworowe

Dotychczas przeprowadzone badania donoszą o związku między selenem a funkcjami rozrodczymi zarówno u samców (Foresta i in., 2002, Marai i in., 2009, Ali Bin Talib i in., 2010, Mohamed i in., 2012, Ahsan i in., 2014, Xiong i in., 2018), jak i samic (Kommisrud i in., 2005, Xiong i in., 2018). Selen ma istotny wpływ na morfologię męskich narządów rozrodczych (Ahsan i in., 2014), wpływa bezpośrednio na proces spermatogenezy u różnych gatunków zwierząt (Surai i Fifinin, 2015) i proces dojrzewania plemników u ssaków (Ahsan i in., 2014).

Według Ahsan i in. (2014) suplementacja Se poprawia jakość nasienia u tryków, zwiększając jego objętość w ejakulacie, wpływa także pozytywnie na ruchliwość i koncentrację oraz zmniejsza odsetek martwych i nieprawidłowo zbudowanych plemników. Ponadto w jądrach zlokalizowano kilka selenoprotein, takich jak syntaza selenofosforanowa (SPS-2) i selenoproteina kapsułki mitochondrialnej (MCSeP) (Davis i in., 2012, Ceko i in., 2015) .

Stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem, który w istotny sposób wpływa na potencjał płodności plemników poprzez peroksydację lipidów (Fairweather-Tait i in., 2010). Dzieje się tak dlatego, że błona plazmatyczna plemników jest niezwykle podatna na peroksydację lipidów ze względu na obecność wysokiego stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Cerolini i in., 2000, Brouwers i Gadella, 2003, Badade i in., 2011), które nadają błonie wysoki poziom płynności i elastyczności niezbędnej do ruchliwości plemników i ich fuzji z oocytami. Peroksydacja lipidów może prowadzić do utraty płynności i integralności błony, a tym samym do zmniejszenia zdolności fuzji plemników z oocytami (Cerolini i in., 2000). Liczba plemników i ich ruchliwość są podstawowymi wskaźnikami zdolności funkcjonalnej wymienionych męskich komórek rozrodczych (Fairweather-Tait i in., 2010).

Niedobór Se u bydła może mieć znaczący wpływ na takie aspekty, jak obniżony wskaźnik płodności, zatrzymanie łożyska i występowanie chorób układu rozrodczego (Mehdi i in., 2016). Badania donoszą także, że dodatek selenu do paszy powoduje zwiększenie wskaźników płodności, co może wiązać się ze zmniejszeniem zamieralności zarodków w ciągu pierwszych trzydziestu dni ciąży (Mehdi i in., 2016).

Badania prowadzone przez Giadinis i in. (2016) na grupie bydła mięsnego, dowiodły, że w ich przypadku niedobór Se był jedyną przyczyną poronień u krów. Ponadto stwierdzone zmiany w sercu płodu i mięśniach szkieletowych świadczyły o występowaniu u nich pokarmowej dystrofii mięśni. Podobne wyniki uzyskali Underwood i Suttle, (2004). Doszli oni do wniosku, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem poronnego działania niedoboru selenu jest, między innymi, niewydolność serca płodu. Innym mechanizmem może być niewystarczające stężenie progesteronu wymagane do utrzymania ciąży w późnym jej okresie. (Kamada i in., 2014). Suplementacja selenu u ciężarnych krów wpływa na unormowanie wydzielania tego hormonu, a także stymuluje jego produkcję po porodzie (Kamada i in., 2014).

Selen wpływa także na rozwój pęcherzyków jajnikowych, poprzez działanie antyoksydacyjne, o czym świadczyć może znaczący wzrost ekspresji genu peroksydazy glutationowej 1 (*GPX1*) w komórkach ziarnistych zdrowych pęcherzyków (Wille, 2006).

Niedobór selenu jest również związany ze zwiększoną częstością występowania mastitis (Meschy, 2010, Giadninis i in. ,2011). Podstawowym mechanizmem obronnym przed mastitis jest aktywność fagocytarna neutrofili (Meschy, 2010). Zauważono, że u krów mlecznych z niedoborem selenu zmniejsza się zdolność fagocytarna krwi i neutrofili (Sordillo, 2013), co prowadzi do zwiększenia odsetek zapaleń wymion u tych zwierząt. Selen wpływa na wrodzoną i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną gruczołu mlekowego poprzez aktywność humoralną i komórkową (Salman i in., 2009). Wpływ selenu na mechanizmy obrony gruczołu mlekowego powoduje: szybszy i bardziej masywny napływ leukocytów polimorfojądrowych (PMN) do wymienia (Erskine i in., 1989) skuteczniejsze zabijanie bakterii (takich jak *S. aureus*) przez PMN (Erskine i in., 1990), wysoką aktywność przeciwbakteryjną serwatki hamującą wzrost, m.in. *S. aureus* (Ali-Vehmas i in., 1997) oraz wysoką ekspresję selenoprotein o właściwościach przeciwutleniających w gruczole mlekowym (Sordillo i in., 2007).

Obecnie uważa się, że selen jest kluczowym pierwiastkiem śladowym o właściwościach przeciwnowotworowych. Badanie przeprowadzone przez Sans Alaejos i in. (2000) wykazało, że pacjenci cierpiący na choroby nowotworowe charakteryzują się niedoborem selenu we krwi. Dodatkowo, na terenach o niskim poziomie selenu w glebie, liczba przypadków nowotworów prostaty jest wyższa w porównaniu do obszarów bogatych w ten pierwiastek (Brinkman i in., 2006). Działanie przeciwnowotworowe selenu opiera się na kilku mechanizmach, w tym na jego silnym działaniu przeciwutleniającym (Spyrou i in., 1995). Selen może również pobudzać lub hamować wzrost guzów, zależnie od dawki, oraz hamować angiogenezę i indukować apoptozę komórek nowotworowych (Wallenberg i in., 2014, Combs i Gray, 1998).

3.2. Najczęstsze choroby związane z niedoborem selenu u zwierząt

W 1957 roku Schwarz i Foltz potwierdzili pozytywną rolę selenu w organizmach zwierząt. Stwierdzili, że suplementacja diety selenem zapobiega martwicy wątroby u szczurów (Schwarz i Foltz, 1957). Zawartość selenu w paszach dla zwierząt jest zależna od poziomu tego pierwiastka śladowego w glebie, na której uprawiane są rośliny przeznaczone do produkcji zielonki oraz dostępności selenu dla roślin. Dostępność selenu natomiast zależy od ilości i rodzaju związków selenu występujących w glebie, gatunków roślin, warunków klimatycznych,

pH gleby oraz obecności antagonistów selenu, takich jak arsen, siarka i ołów. Choroby spowodowane niedoborem selenu często występują na obszarach, gdzie gleby są kwaśne i charakteryzują się niedoborem selenu lub pierwiastek występuje w postaci trudno przyswajalnych związków, np. jako siarczek selenu (Mehdi i in., 2013).

Niedobór selenu może powodować występowanie wielu jednostek chorobowych, m.in. pokarmowej dystrofii mięśni, chorób wątroby, morwowej choroby serca, zaburzeń układu rozrodczego (m.in. zatrzymania łożyska) czy skazy wysiękowej u drobiu.

Niekorzystne skutki niedoboru selenu u zwierząt zostały po raz pierwszy udokumentowane w 1958 roku, kiedy niski poziom selenu i witaminy E został uznany za potencjalną przyczynę pokarmowej dystrofii mięśni (Muth i in., 1958). Choroba ta, zwana inaczej chorobą białych mięśni, atakuje głównie jagnięta, koźlęta, źrebięta, cielęta i drób, od urodzenia do 3 miesiąca życia. Wyróżniamy trzy formy pokarmowej dystrofii mięśni (PDM): nadostrą, w przebiegu której dochodzi do zaburzeń w pracy mięśnia sercowego, arytmii, duszności spoczynkowej oraz niedotlenienia objawiającego się zasinieniem błon śluzowych. U zwierząt dotkniętych tą formą PDM dochodzi do szybkich zgonów, a śmiertelność może sięgać 90% (Aleman, 2008). Kolejną formą jest ostra PDM, która atakuje głównie mięśnie szkieletowe, międzyżebrowe, przeponę oraz mięsień sercowy. Zwierzęta w jej przebiegu przyjmują charakterystyczną postawę: mają zgiętą linię kręgosłupa, szeroko rozstawione kończyny, szyję wyciągniętą do przodu, a ich kończyny są szczudłowato wyprostowane. Dodatkowo występują drżenia mięśni, szczególnie kończyn tylnych. Śmiertelność w przebiegu ostrego PDM może sięgać 60% (Aleman, 2008). Najczęstszą formą choroby białych mięśni jest forma podostra. Objawy mogą być różne i zależą od mięśni, które zostały zaatakowane procesem zwyrodnieniowym. Najczęściej są to mięśnie kończyn, tułowia, szyi, języka, gardła, przełyku. Zwierzęta mają trudności z poruszaniem się, a odruchy ssania i połykania są utrudnione na skutek zmian w mięśniówce języka. Obserwuje się także zwiększoną liczbę infekcji w układzie oddechowym i pokarmowym (Aleman, 2008).

U jagniąt i koźląt zachorowania na PDM występują zimą lub wczesną wiosną. Głównie dotyczą one zwierząt w wieku od kilku dni do kilku miesięcy, będących w bardzo dobrej kondycji (Błażejak-Grabowska i in., 2012). W obrazie histopatologicznym tkanek dotkniętych PDM zauważa się zwyrodnienie szkliste komórek mięśni szkieletowych w różnych częściach ciała, w tym w mięśniach przepony, mięśniu sercowym oraz mięśniach języka (Beytut i Karatas, 2002).

Choroba morwowa serca (MHD) została po raz pierwszy opisana w 1967 r. (Seffner i in., 1967) i nadal jest powszechnym problemem u świń (Helke i in., 2020). Choroba dotyka zazwyczaj zwierząt młodych zaraz po odstawieniu. Charakterystycznymi objawami sekcyjnymi tej jednostki chorobowej są mikroskopowe wynaczynienia w ścianie mięśnia sercowego i ciężka martwica włókien mięśnia sercowego (Sharp i in., 1972). Serce zwierząt chorych na MHD przypomina owoc morwy, ponadto można zauważyć gromadzenie się płynu w worku osierdziowym (Oropeza-Moe i in., 2019, Beckendorf i Linke, 2015). Na skutek zmian w mięśniu sercowym dochodzi do szybkich zejść śmiertelnych chorych zwierząt. Uważa się, że MHD jest związane z niedoborem witaminy E i/lub selenu (Nielsen i in., 1989). częstotliwość występowania MHD obserwowano u świń karmionych dietą o niskim poziomie selenu zawierającą drożdże torula (Sharp i in., 1972), a MHD zostało eksperymentalnie odtworzone poprzez zastosowanie paszy ze zbyt niską zawartością selenu i witaminy E (Van Vleet, 1982).

Niskiemu poziomowi selenu przypisuje się również problemy z porodem, wynikające ze zmniejszonego napięcia warstwy mięśniowej macicy. Niedobór tego pierwiastka może również prowadzić do paraplegii i ropnych stanów zapalnych macicy po porodzie. Selen i witamina E ułatwiają migrację neutrofili do gruczołu mlekowego i wzmacniają ich działanie bakteriobójcze, tym samym skracając i łagodząc objawy kliniczne (Hosnedlova i in., 2017).

Reasumując należy stwierdzić, że niedobór selenu przyczynia się do patologicznych zmian u zwierząt gospodarskich, co prowadzi do ogromnych strat ekonomicznych. Przeżuwacze, szczególnie jagnięta i koźlęta, wydają się być szczególnie podatne na niedobory tego pierwiastka (Wolffram, 1992, Karwacka i in., 2014).

3.3. Selenoza

Wysokie stężenie selenu w organizmie może powodować tzw. selenozę, czyli toksyczne zatrucie selenem. Pierwsze doniesienie o tej chorobie pochodzi z zapisów Marco Polo z 1295 roku. Zauważył on objawy przypominające ostrą formę selenozy u mieszkańców wschodniej prowincji Chin. Dopiero w latach 50. XX wieku powiązano je ze zbyt wysokim poziomem selenu w diecie chorych ludzi (Dodig i Cepelak, 2004). Kolejne doniesienie. Tym razem z 1933 roku zawiera informacje o toksycznym działaniu selenu, a także o wpływie roślin z grupy *Astragalus, Xylorriza,* oraz *Phomopsis,* na zwierzęta domowe. Rośliny te charakteryzują się gromadzeniem selenu (Oldfield, 1987), a ich nadmierne spożycie może powodować ostre

postaci selenozy. Istnieje wiele innych badań opisujących ostre zatrucia selenem. U koni karmionych paszą zawierającą selen w stężeniu 5-26 mg/kg masy ciała, występowała utrata apetytu, wzdęcia oraz wypadanie sierści (Witte i in., 1993). U zwierząt laboratoryjnych zbyt wysoka dawka pokarmowa selenu (5 mg/kg masy ciała) powodowała niższy przyrost, choroby wątroby, splenomegalię czy anemię (Raisbeck, 2000).

W zależności od dawki, rodzaju związku i czasu trwania ekspozycji, wyróżniamy formę ostrą i przewlekłą zatrucia selenem (Raisbeck, 2000). Ostre selenozy występują niezwykle rzadko, najczęściej są spowodowane zastosowaniem zbyt dużej dawki suplementów selenowych lub skarmianiem zwierząt roślinami uprawianymi na glebach bogatych w selen (Davis i Hall, 2017). Ostra forma selenozy u zwierząt najczęściej przybiera formę tzw. ślepej kołowacizny. Najczęstszymi objawami, związanymi z upośledzonym działaniem ośrodkowego układu nerwowego, są otępienie, niepewny chód, zgrzytanie zębami, ślinotok, kolki i utrata wzroku. Ostatni etap przebiegu choroby objawia się dusznością i porażeniem kończyn, a śmierć wynika z niewydolności oddechowej (Koller i Exon, 1986).

Zwierzęta domowe, które są karmione paszą z wysoką zawartością selenu, często cierpią na przewlekłą postać zatrucia selenem, zwaną chorobą alkaliczną. Gatunkami szczególnie wrażliwymi na tę formę choroby są bydło, konie, świnie i drób. W trakcie jej przebiegu mogą pojawić się zmiany skórne, łysienie oraz zniekształcenie racic (O'Toole i Raisbeck, 1995).

3.4. Metabolizm selenu u przeżuwaczy

Wchłanianie selenu u przeżuwaczy odbywa się przez ścianę żwacza lub w jelicie cienkim. Głównym miejscem wchłaniania Se, zarówno u przeżuwaczy, jak i u zwierząt monogastrycznych, jest dwunastnica. Należy jednak podkreślić, że mechanizm wchłaniania selenu jest nieco inny w żwaczu niż w jelitach. Ogólnie rzecz biorąc, żwacz otrzymuje Se w postaci seleninu i selenianu. Większość selenianu jest redukowana do seleninu w żwaczu przed wchłonięciem, a część selenianu przechodzi ze żwacza do jelita cienkiego i jest wchłaniana jako selenian. Następnie 30–40% seleninu jest przekształcane w nierozpuszczalne formy Se o małej masie cząsteczkowej (Mehdi i Dufrasne, 2016), a 10–15% seleninu jest wykorzystywane do syntezy selenoaminokwasów (głównie selenocysteiny). Około 40–60% seleninu opuszcza żwacz i wędruje bezpośrednio do jelita cienkiego, gdzie jest wchłaniany prawdopodobnie na drodze dyfuzji biernej (Serra i in., 1994). Badania sugerują, że rzeczywista absorpcja Se w

przypadku form nieorganicznych wynosi średnio około 50% u krów mlecznych, kóz i owiec (Koenig i in., 1997, Ivancic i Weiss, 2001). Ogólnie stopień wchłaniania seleninu jest dość niski u przeżuwaczy (tylko 29%) w porównaniu ze zwierzętami monogastrycznymi i drobiem (około 80–90%). Liczne czynniki dietetyczne wpływają na wchłanianie Se u przeżuwaczy ze względu na antagonistyczne działanie innych składników odżywczych. Diety bogate w węglowodany lub niektóre sole, takie jak azotany, siarczany, wapń, arsen, witaminę C, rtęć czy cyjanowodór (koniczyna, nasiona lnu) negatywnie wpływają na strawność Se u przeżuwaczy (Kessler, 1993). Z drugiej strony duża zawartość witaminy E, witaminy A czy białka w diecie zwiększają wchłanianie selenu. Kilka badań *in vitro* sugeruje, że drożdże wzbogacone w Se zawierają 90% Se w postaci selenometioniny. Podaje się, że strawność Se z drożdży wzbogaconych w Se wynosi około 66%, więc biorąc pod uwagę strawność selenometioniny na poziomie 80% (jako średnia strawność białka mikrobiologicznego żwacza), jest ona o około 30% wyższa niż rzeczywista strawność Se z selenitu. Wiele badań wykazało, że absorpcja i biodostępność organicznego Se są znacznie wyższe niż nieorganicznego Se u przeżuwaczy (Weiss i Hogan, 2005, Qin i in., 2007).

Jak wspomniano powyżej, dostępność selenometioniny (selen organiczny) jest większa niż selenu nieorganicznego. Ponadto selenometionina jest szybko włączana do białek. Nieorganiczny selen jest wykorzystywany prawie wyłącznie do produkcji selenoenzymów, podczas gdy organiczny Se może być używany do produkcji zarówno selenoenzymów, jak i wszystkich białek zawierających metioninę. Jedynym problemem związanym z organicznymi formami Se są ich wyższe koszty produkcji w porównaniu do form nieorganicznych.

Metabolizm selenu różni się także w zależności od formy podaży selenu (forma organiczna czy nieorganiczna). Organiczna forma selenu musi najpierw zostać przekształcona w nieorganiczny selenek (selenek wodoru) przed procesem włączenia selenu do specyficznej selenocysteiny, a następnie wykorzystaniu jej do syntezy selenoprotein (Daniels, 1996). Selenian jest redukowany do seleninu, a selenin jest redukowany poprzez tworzenie selenodiglutationu do selenku (Foster i Sumar, 1997, Schrauzer, 2000). Ponadto selenometionina jest włączana do wszystkich białek bezpośrednio jako substytut metioniny (niespecyficznie), podczas gdy nieorganiczny Se jest włączany tylko do określonego aminokwasu (cysteiny) w selenoproteinach (Burk, 1991). Selen wprowadzony do organizmu w postaci soli nieorganicznych jest zwykle wykorzystywany bezpośrednio do syntezy białek (Levander i in., 1983). Natomiast Se w formach organicznych, takich jak selenometionina i

selenocysteina, jest skutecznie magazynowany w różnych tkankach, zapobiegając w ten sposób niedoborom Se i zwiększając aktywność GPX poprzez pośredniczenie w statusie redoks i stresie oksydacyjnym (Dalto i in., 2015).

Należy także podkreślić różnice w dystrybucji selenu w różnych szlakach metabolicznych. W pierwszej kolejności pierwiastek ten jest włączany do specyficznych białek pełniących funkcje życiowe, takich jak selenoproteina P i 5'-dejodynaza tyroniny. Dopiero później są włączane w łańcuchy niespecyficznych białek (Minich, 2022). Również dystrybucja selenu w tkankach różni się między narządami, z mózgiem, gruczołami dokrewnymi i narządami rozrodczymi jako priorytetowymi strukturami w przypadku niedoboru selenu, przed wątrobą, sercem, mięśniami szkieletowymi i erytrocytami.

3.5. Ekspresja wybranych genów związanych z selenem

Selen w enzymach białkowych obecny w postaci selenocysteiny, kontroluje ekspresję genów m.in. cytozolowej peroksydazy glutationowej, (GPX), peroksydazy glutationowej wodoronadtlenku fosfolipidów (PHGPX) i 5'-dejodynazy jodotyroninowej typu I (5'IDI) (Sunde, 1994). Dodatek selenu do diety prowadzi do modyfikacji aktywności i stężenia selenoprotein, a w warunkach ograniczonej podaży wpływa na aktywność GPX, PHGPX i 5'IDI w wątrobie (Arthur i in., 1992, Sunde, 1994). Zdolność tkanek do kontrolowania syntezy poszczególnych selenoprotein jest niezbędna, aby wydajnie wykorzystywać ograniczone ilości tego pierwiastka, zwłaszcza że rola metaboliczna i względne znaczenie tych trzech enzymów różnią się w zależności od rodzaju tkanki. (Bermano i in., 1995).

Se jest włączany do selenoprotein poprzez rozpoznanie kodonu stop UGA jako kodonu dla selenocysteiny, a to wymaga specyficznych struktur pętli macierzystej (Chambers i in., 1986) . Zmniejszona dostępność Se prowadzi do zakończenia translacji, ale nie jest jasne, w jaki sposób wpływa to na ekspresję różnych selenoenzymów oraz czy istnieją inne mechanizmy kontrolne transkrypcji i translacji.

Dotychczas przeprowadzone badania donosiły, że niedobór selenu w diecie szczurów powoduje silny spadek aktywności *GPX1* oraz poziomu mRNA tego genu w wątrobie i innych narządach (Evenson i in., 2004). W wątrobie szczurów, podobny wpływ niskiej podaży selenu, obserwowano również dla innych selenobiałek, m.in. GPX4 i IDI (Bermano i in., 1995), chociaż był on mniej znaczący. Również, w przypadku dwóch izoenzymów reduktazy tioredoksyny, obserwowano spadek ich aktywności, przy czym TrxR1 był bardziej czuły na

obniżenie poziomu selenu niż TrxR2 (Crosley i in., 2007). W komórkach okrężnicy w hodowli *in vitro*, niedobór selenu powodował istotne obniżenie ekspresji genu *GPX1*, ale nie *GPX2* (Müller i in., 2003).

Duża część przeprowadzonych doświadczeń pokazuje, że niski poziom selenu w medium hodowlanym, w badaniach *in vitro*, lub w diecie zwierząt i ludzi, wpływa na zmiany w aktywności ekspresji genów kodujących selenobiałka. Przykładowo, niedobór selenu w diecie szczurów powoduje silny spadek aktywności *GPX1* oraz poziomu mRNA tego genu w wątrobie i innych narządach (Evenson i in., 2004). W wątrobie szczurów, podobny wpływ niskiej podaży selenu, obserwowano również dla innych selenobiałek, m.in. *GPX4* i *IDI* (Bermano i in., 1995.

3.6. Formy suplementacji selenu u zwierząt

W diecie zwierząt selen występuje w formie organicznej i nieorganicznej. Suplementem najczęściej używanym w diecie zwierząt są sole nieorganiczne selenu tego pierwiastka ($NaSO_4$ i $NaSeO_3$), głównie w formie premixów lub innych form doustnych np. bolusów. W zależności od rodzaju związku jaki wykorzystywany jest do suplementacji obserwujemy różny stopień absorpcji tego pierwiastka. Selenian sodu wykazuje szybsze tempo wchłaniania po podaniu podskórnym w porównaniu do selenianu baru (Arshad i in., 2021). Należy wspomnieć, że nieorganiczne źródła Se wykazują słabą biodostępność i antagonizm z innymi związkami mineralnymi, co wiąże się z niską skutecznością tych związków. Dlatego coraz częściej zwraca się uwagę na organiczne źródła Se, tj. drożdże wzbogacone w Se, np. *Saccharomyces cerevisiae*, który zawierają selenoaminokwasy, takie jak hydroksyselenometionina, selenometionina i selenocysteina (Se-Cys) (Schrauzer, 2003, Stewart i in., 2012, Sun i in., 2017), badane w niniejszej pracy doktorskiej seleninotriglicerydy czy nanoselen (Hassan i in., 2020).

3.7. Seleninotriglicerydy

Seleninotriglicerydy to nowa forma organicznego selenu, w której selen jest na IV stopniu utlenienia. Związki te zawierają selen i triglicerydy, które powstają w wyniku chemicznej modyfikacji oleju słonecznikowego kwasem selenowym. Są one lipofilowe przez co łatwo ulegają dystrybucji w organizmie. Badania wykazały, że podaż doustna 2% i 5 % roztworu seleninotriglicerydów prowadzi do istotnych zmian koncentracji selenu w tkankach szczura (Jastrzebski i in., 1997). Co ważne, seleninotriglicerydy charakteryzują się stosunkowo

niską toksycznością. Dawka śmiertelna selenu suplementowanego w formie nieorganicznej selenianu sodu jest dosyć niska i waha się od 1 do 5 mg/kg m.c. (Koller i Exon, 1986). Badania na szczurach wykazały, że średnia dawka śmiertelna selenu w postaci 2% seleninotriglicerydów wynosi 100 mg/kg m.c. i 68 mg/kg w postaci 5% roztworu (Jastrzebski i in., 1997).

Ponadto, w tej samej pracy (Jastrzebski i in., 1997) wykazano, że seleninotriglicerydy wchłaniają się zarówno po podaniu doustnym, podskórnym jak i dootrzewnowym. Selen dostarczony do przewodu pokarmowego w postaci seleninotriglicerydów, wiąże się z erytrocytami oraz albuminami i globulinami surowicy i transportowany jest do tkanek. Jest całkowicie eliminowany z organizmu po 24 h od podania, unikając kumulacji i działania toksycznego (Jastrzebski i in., 1997). Ze względu na obecność wielu form chemicznych związków selenowych, efekt suplementacji selenitotriglicerydami może różnić się między gatunkami. Dotychczas przeprowadzone badania dotyczyły myszy, szczurów, bydła dorosłego, cieląt i wielbłądów (Sochacka i in., 2018, Jastrzebski i in., 1995, Jastrzebski i in., 1997, Żarczyńska i in., 2021, Żarczyńska i in., 2018, Żarczyńska i in., 2020). Badania przeprowadzone przez Sochacką i in. (2014) wykazały, że suplementacja seleninotriglicerydami u zdrowych myszy powoduje istotny wzrost poziomu selenu w surowicy, a także wzrost aktywności peroksydazy glutationowej i selenoproteiny P. Podobnie badania Żarczyńskiej i in (2020, 2021) wykazały wzrost poziomu selenu w osoczu wielbłądów i cieląt poddanych suplementacji seleninotriglicerydami. Wydaje się, że seleninotriglicerydy jako nowa, organiczna forma suplementacji selenu, może okazać się bardzo przydatna i bezpieczna przy zapobiegania niedoborowi tego pierwiastka.

4.Cel i założenia pracy

Celem pracy było określenie wpływu seleninotriglicerydów na wybrane wskaźniki hematologiczne, biochemiczne, enzymatyczne, a także poziom selenu we krwi koźląt oraz jagniąt. Zbadanie ich wpływu na zmiany strukturalne w tkance mięśniowej badanych zwierząt, a także określenie aktywności ekspresji wybranych genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy antyoksydacyjne w tkankach badanych zwierząt.

Cele szczegółowe obejmowały:

- ocenę wpływu seleninotriglicerydów na wybrane parametry morfologiczne krwi,
- ocenę wpływu seleninotriglicerydów na wybrane parametry biochemicznego krwi ~~u~~ koźląt i jagniąt, tj. poziom glukozy (GLUC), albumin (Alb), białka całkowitego (TP), kreatyniny (Crea), mocznika (Urea), aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT), a także dehydrogenazy mleczanowej (LDH).
- zbadanie wpływu seleninotriglicerydów na poziom selenu (Se) w surowicy koźląt i jagniąt,
- ocenę wpływu badanej substancji na aktywność enzymów biorących udział w procesach antyoksydacyjnych u koźląt i jagniąt, tj. peroksydazy glutationowej (GPX) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)
- określenie zmian strukturalnych tkanki mięśniowej w przypadku suplementacji seleninotriglicerydami u koźląt i jagniąt,
- zbadanie ekspresji genów, kodujących enzymy, biorące udział w procesach antyoksydacyjnych u koźląt i jagniąt w przypadku suplementacji seleninotriglicerydami (*GPX1, SOD1*).

5. Materiały i metody

Badanie zostało zaplanowane i przeprowadzone zgodnie z decyzją Lokalnej Komisji Etycznej (Uchwała 28/2021 z dnia 21.04.2021 r.). Zwierzęta przez cały okres przeprowadzenia doświadczenia były pod stałym nadzorem lekarza weterynarii i nie wykazywały żadnych objawów mogących sugerować chorobę, a ich warunki przetrzymywania były zgodne z wytycznymi zawartymi w ustawie o ochronie zwierząt.

5.1. Zwierzęta i schemat badań

Badania przeprowadzono na grupie 12 jagniąt rasy kamienieckiej oraz 12 koźlętach rasy alpejskiej, w wieku 10 dni. Zwierzęta podzielono na następujące grupy: kontrolną koźląt i doświadczalną koźląt, kontrolną jagniąt i doświadczalną jagniąt, w każdej po 6 osobników.

W trakcie trwania eksperymentu zarówno jagnięta jak i koźlęta zostały odsadzone od matek. Jagnięta w tym czasie karmione były preparatem mlekozastępczym DOLMILK OVI, a koźlęta preparatem DOLMILK CAPRI, o składzie podanym w Tabeli 1., zgodnie z zaleceniami producenta.

Tabela 1. Skład preparatów mlekozastępczych dla jagniąt i koźląt.

DOLMILK OVI - preparat mlekozastępczy dla jagniąt	**DOLMILK CAPRI-preparat mlekozastępczy dla koźląt**
Skład: serwatka w proszku, koncentrat białka sojowego, olej kokosowy, olej palmowy, olej sojowy, otoczkowany maślan sodu; *Dodatki w 1kg:*Witaminy, prowitaminy i chemicznie dobrze zdefiniowane substancje o podobnym działaniu: Witamina A 60 000j.m., Witamina D3 10 000j.m., Witamina E 100mg, Witamina B1 12mg, Witamina B2 10mg, Witamina B6 6mg, Witamina B12 200µg, Witamina C 150mg, Biotyna 8 µg, Niacyna 50mg, Kwas pantotenowy 20mg, Mieszanki pierwiastków śladowych: Żelazo (siarczan żelaza (II), monohydrat) 8mg, Żelazo (chelat żelazowy wodzianu glicyny) 4mg, Jod (jodek potasu) 1mg, Mangan (tlenek manganu (II)) 6mg, Cynk (siarczan cynku, monohydrat) 10mg, Selen (selenian(IV) sodu) 0,3mg; *Mikroorganizmy*: *Bacillus licheniformis* (DSM 5749), *Bacillus subtilis* (DSM 5750) 1:1 12,5 x 106 CFU *Przeciwutleniacze* : Ethoxyquin 10,7mg, BHT 11,8mg, Propyl gallate 2mg; *Konserwanty:* Kwas cytrynowy 20mg	*Skład:* serwatka w proszku, koncentrat białka sojowego, olej kokosowy, olej palmowy, olej sojowy, otoczkowany maślan sodu; *Dodatki w 1kg:* Witaminy, prowitaminy i chemicznie dobrze zdefiniowane substancje o podobnym działaniu: E672 Witamina A 66 650j.m., E671 Witamina D_3 6 250 j.m., Witamina E 122mg, Witamina B_1 13mg, Witamina B_2 11mg, Witamina B_6 6,6mg, Witamina B_{12} 222µg, Witamina C 166,6mg, Biotyna 89 µg, Niacyna 55,6mg, Kwas pantotenowy 22mg, Chlorek choliny 110mg, DL- α-Tokoferol 110mg;mieszanki pierwiastków śladowych: E1 Żelazo (siarczan żelaza (II), monohydrat) 94,4mg, E1 Żelazo (chelat żelazowy wodzianu glicyny) 50mg, E2 Jod (jodek potasu) 1,1mg, E4 Miedź (siarczan miedzi, pentahydrat) 11,5mg, E5 Mangan (tlenek manganu (II)) 70mg, E6 Cynk (siarczan cynku, monohydrat) 107mg, E8 Selen (selenian(IV) sodu) 0,26mg *Przeciwutleniacze:* E 324 Ethoxyquin 11,8mg, E 321 BHT 13,1mg, E 310 Propyl gallate 2,2mg *Konserwanty:* E 330 Kwas cytrynowy 22,2mg

Grupę doświadczalną suplementowano roztworem seleninotriglicerydów w postaci 2 % roztworu doustnego, w dawce 0,5 mg substancji czynnej na kg masy ciała badanego zwierzęcia, który podawano indywidualnie, raz dziennie, przez 7 dni. Od każdej ze sztuk zarówno w przypadku jagniąt jak i koźląt pobrana została krew w 0, 1, 7, 14, 21, 30 dniu doświadczenia, w celu określenia wskaźników morfologicznych i biochemicznych oraz w celu określenia stężenia selenu w surowicy krwi. Krew została pobrana z żyły jarzmowej (*vena jugularis*) przy pomocy Vacumed Blood Collection System. Próbówki używane do pobierania to próbówki Vacuette, Greiner Bio-One, France z K2 EDTA (1 ml) wykorzystanych do badań morfologicznych krwi, Vacuette, Greiner Bio-One, France z aktywatorem wykrzepiania o objętości 4 ml do badań biochemicznych oraz próbówki Becton Dickinson Vacutainero objętości 2 ml, z fluorkiem sodu i szczawianem potasu służących do badań poziomu enzymów. Próbki krwi niezwłocznie po pobraniu były przechowywyane w temperaturze 4°C a następnie

wirowane w wirówce z chłodzeniem Beckmam J-6 MC 4000 obrotów na minutę przez 20 minut.

W 30. dniu zwierzęta grupy doświadczalnej i kontrolnej poddane zostały eutanazji. W tym celu podano zwierzętom środek uspokajający, ksylazynę (Vetaxyl, VetAgro), w dawce 0,05 mg / kg wagi ciała domięśniowo, w mięsień udowy. Po upływie 15 minut i pojawieniu się widocznych cech sedacji zwierzęcia, podano dożylnie, do żyły jarzmowej, roztwór ketaminy (Bioketan, Vetoquinol Biowet Sp.z.o.o) w dawce 15 mg/kg masy ciała. Po znieczuleniu zwierzęcia nastąpiło dożylne podanie pentobarbitalu (Morbital, Biowet Puławy) w dawce 140 mg/kg masy ciała.

Bezpośrednio po stwierdzeniu zgonu zwierzęcia pobrane zostały fragmenty następujących tkanek: mięśnia najdłuższego grzbietu, mięśnia dwugłowego uda, mięśnia sercowego i wątroby, w celu przeprowadzenia analiz histopatologicznych i genetycznych.

5.2. Badania hematologiczne i biochemiczne krwi

Parametry hematologiczne i biochemiczne krwi zostały oznaczone w laboratoriach Wydziału Weterynaryjnego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (Polska). Badanie stężenia selenu we krwi przeprowadzono w laboratoriach Uniwersytetu Nauk Weterynaryjnych i Farmaceutycznych w Brnie (Czechy).

Badania hematologiczne obejmowały oznaczenia: liczby białych krwinek (WBC), oznaczenie leukogramu (w tym: procent bazofili, eozynofili, granulocytów i segmentowanych granulocytów, limfocytów i monocytów), liczby krwinek czerwonych (RBC), wartości hematokrytu (HCT), poziomu hemoglobiny (HGB), średniej objętości krwinki (MCV), średniej masy hemoglobiny krwinkowej (MCH), średniego stężenia hemoglobiny w krwinkach (MCHC) i liczby płytek krwi (PLT). Parametry te zostały określone we krwi pełnej za pomocą analizatora hematologicznego firmy Siemens ADVIA 2120, Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA, oznaczenie w krwi pełnej pobranej na $EDTAK_2$. Pomiar polega na odczycie cytometryczno-laserowym z zestawami:

- zestaw optyczny perox – pomiar światła rozproszonego i pochłoniętego przez pojedyncze komórki z wykorzystaniem hydrodynamicznego ogniskowania strumienia komórek w kuwecie przepływowej
- laserowy zestaw optyczny – wysoko- i niskokątowy pomiar światła rozproszonego i pochłanianego przez poszczególne komórki, którego źródłem jest dioda

lasera – pomiar wykorzystywany do oceny układu czerwonokrwinkowego i płytkowego oraz określający płatowość jądra komórkowego w układzie biało krwinkowym

- zestaw kolorymetryczny hemoglobinowy – wartości napięcia na lampie hemoglobinowej odpowiadają ilości transmitowanego światła
- zestaw odczynników PEROX i BASO – wykorzystuje reakcje cytochemiczne do DIFF.

Badania biochemiczne krwi obejmowały pomiar: stężenie glukozy (GLUC), albumin (Alb), białka całkowitego (TP), kreatyniny (Crea), mocznika (Urea), aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy Badania te wykonano przy pomocy analizatora biochemicznego Cormay ACCENT 200 i zestawów diagnostycznych Cormay, Łomianki, Polska.

W badaniu poszczególnych wskaźników wykorzystano metody:

- stężenie glukozy metodą oksydazową (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 510 nm/670 nm; oznaczenie w surowicy;
- stężenie albumin – metodą z zielenią bromokrezolową (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 546 nm/670 nm, oznaczenie w surowicy;
- stężenie białka całkowitego – metodą biuretową (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 546 nm/670 nm; oznaczenie w surowicy.
- stężenie kreatyniny – metoda Jaffe (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; 340 nm/450 nm, oznaczenie w surowicy;
- stężenie mocznika – metodą kinetyczną z ureazą i dehydrogenazą glutaminianową (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm; oznaczenie w surowicy;
- aktywność aminotransferazy asparaginowej – metodą kinetyczną IFCC bez aktywacji fosforanem pirydoksalu (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na

automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm; oznaczenie w surowicy

- aktywność fosfatazy alkalicznej w surowicy – metodą kinetyczną IFCC (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; kolorymetryczny pomiar szybkości powstawania p-nitrofenolu przy długości fali 405 nm/670 nm; oznaczenie w surowicy;
- aktywność gamma-glutamylotransferazy w surowicy – metodą kinetyczną z L-γ-glutamylo-3-kaboksy-4-nitroanilidem (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; 340 nm/450 nm, oznaczenie w surowicy;
- aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy – metodą kinetyczną DGKC z pirogronianem (odczynniki firmy Cormay); oznaczenie aktywności enzymu w surowicy na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay; pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm/450 nm ; oznaczenie w surowicy.

Ponadto oznaczono stężenie peroksydazy glutationowej (GPX) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Aktywność GPX mierzono w krwi pełnej metodą Paglia i Valentine z kumenem (odczynniki RANSEL), pomiar kolorymetryczny przy długości fali 340 nm, oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay,, SOD metodą z oksydazą ksantynową XOD (odczynniki RANSOD), pomiar kolorymetryczny przy długości fali 505 nm, oznaczenie na automatycznym analizatorze biochemicznym ACCENT-200 firmy Cormay, oznaczenia we krwi heparynizowanej.

Oznaczono także stężenie selenu w surowicy krwi (Se), wykorzystując metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA), z kuwetą grafitową, za pomocą spektrometru Unicam 939 Solar.

5.3. Badanie histopatologiczne tkanek

Badanie histopatologiczne tkanek wykonano w laboratoriach Wydziału Weterynaryjnego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (Polska).

Pobrane fragmenty mięśnia sercowego, mięśnia najdłuższego grzbietu, mięśnia dwugłowego uda do analizy histopatologicznej utrwalono w 10% buforowanej formalinie. Następnie zatopiono w parafinie i pocięto na skrawki o grubości 3 µm. Przygotowane próbki mięśni barwiono metodą HE (hematoksylinowo-eozynową) oraz metodą HBFP

(Haematoxylin-Basic Fuchsin Picric Acid) w celu wykrycia martwiczych włókien mięśniowych (Lie i in., 1971, Al-Rufaie i in., 1983).

5.4. Badania genetyczne

5.4.1. Badania genetyczne – jagnięta

Badania dotyczące ekspresji wybranych genów w tkankach jagniąt owcy kamienieckiej przeprowadzono w Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt Politechniki Bydgoskiej.

Pobranie materiału biologicznego i izolacja RNA

Materiałem biologicznym pobranym do analiz były wycinki następujących tkanek: wątroba, serce, mięsień najdłuższy grzbietu(*m. longissimus dorsi),* mięsień dwugłowy uda (*m. biceps femoris)*, które pobrano na bufor konserwujący fix RNA (Eurx, Polska) i przechowywano w 4°C. Po 24 godzinach tkanki wyjęto z buforu i zamrożono w -80°C.

Wycinki tkanek rozdrobniono w homogenizatorze BeadBug (Benchmark Scientific Inc, USA) z zastosowaniem metalowych kulek w 1 ml mieszaniny RNA Extracol (Eurx, Polska). RNA izolowano przy zastosowaniu zestawu odczynników Universal RNA Purification Kit (nr kat. E3598, Eurx, Polska) wg protokołu producenta.

Analiza ilościowa i jakościowa RNA

Ocenę jakościową oraz integralności RNA przeprowadzono poprzez rozdział elektroforetyczny prób RNA w 1,2 % żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy) w buforze 1 × TBE (10 × TBE: 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02M EDTA, pH 8,0) przy napięciu 100 V przez 30 min. W celu oceny ilości i jakości RNA dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fal 260 (A260), 280 (A280) i 230 (A320) w spektrofotometrze NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, USA). Odczytano następujące parametry:

- stężenia RNA(ng/ul),
- czystość próby RNA określanej na podstawie stosunku wartości absorpcji A260 do A280 (współczynnik Ratio A260/A280) oraz A260 do A230 (współczynnik Ratio A260/A230)

Wszystkie próby rozcieńczono do stężenia roboczego 200 ng/µl. Tak przygotowane RNA stanowiło matrycę w reakcji RT-qPCR.

Odwrotna transkrypcja

Do przepisania informacji genetycznej z RNA na cDNA użyto zestawu odczynników smART First Strand cDNA Synthesis kit (nr kat. E0804, Eurx, Polska). Reakcję przeprowadzono wg protokołu producenta z użyciem 1800 ng RNA. Następnie połączono po 2 ul każdej z prób cDNA w celu uzyskania wzorcowej matrycy cDNA.

Standardowa reakcja PCR

Do analizy stabilności ekspresji wybrano 8 genów referencyjnych przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2. Sekwencje starterów dla genów referencyjnych i badanych wykorzystanych podczas badań genetycznych u jagniąt.

Skrót nazwy genu	Sekwencja (5'>3')	Źródło
SOD1	F: AAGGATGAAGAGAGGCATGTTG	Materiał i metody
	R: AAGTCATCTGGTCTTTCATGGAC	
GPX1	F: GACTACACCCAGATGAATGACC	Materiał i metody
	R: GTTCTTGGCGTTTTCCTGATG	
ACTB	F: GCAGATGTGGATCAGCAAGC	(Schulze i in., 2017)
	R: GGGTGTAACGCAGCTAACAG	
RPL19	F: AGCCTGTGACTGTCCATTCC	(Schulze i in., 2017)
	R: ACGTTACCTTCTCGGGCATT	

Do projektowania par starterów dla genów *GPX1, SOD1* zastosowano program PrimerBlast (doi: 10.1186/1471-2105-13-134).

W celu oceny specyficzności starterów wybranych do amplifikacji fragmentów poszczególnych genów referencyjnych przeprowadzono standardową reakcję PCR. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 50 ng cDNA, po 5 pmol każdego ze starterów (forward i

reverse), 200µM mixu dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (ThermoFisher Scientific, USA), 1 U polimerazy DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA), 1 × stężony bufor DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA) oraz woda wolna od nukleaz, zgodnie z protokołem Grochowskiej (metoda własna). Informacje na temat sekwencji starterów zastosowanych do amplifikacji fragmentów genów referencyjnych zawarto w Tabeli 2. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler Pro (Eppendorf AG, Germany).

Wydajność reakcji qPCR

W celu określenia wydajności łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, qPCR) dla każdego analizowanego genu wykonano krzywą standardową z użyciem kolejnych rozcieńczeń wzorcowego cDNA. W celu sporządzenia krzywej przygotowano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń seryjnych matrycy wzorcowej cDNA (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) uzyskanej z mieszaniny wszystkich uzyskanych matryc cDNA. Reakcję qPCR wykonano w trzech powtórzeniach technicznych dla matrycy wzorcowej i każdego z jej rozcieńczeń seryjnych, osobno dla każdego genu referencyjnego. Reakcję qPCR wykonano w termocyklerze LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Niemcy).

Analiza ekspresji badanych genów

Poziom ekspresji badanych genów referencyjnych i badanych (*GPX1, SOD1*) oznaczano za pomocą reakcji qPCR. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji fragmentów genów referencyjnych i badanych przedstawiono w Tabeli 2. Reakcję qPCR przeprowadzono w termocyklerze LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Niemcy).

Ekspresję badanych genów normalizowano względem poziomu ekspresji dwóch genów referencyjnych *ACTB i RPL19*.

5.4.2. Badania genetyczne – koźlęta

Badania dotyczące ekspresji genów w tkankach koźląt wykonano w laboratorium Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

W celu przeprowadzeniu analiz genetycznych pobrano fragmenty następujących tkanek: wątroba, serce, mięsień dwugłowy uda (*m. biceps femoris*). Po pobraniu tkanki, materiał bezzwłocznie przeniesiono do probówek Simport Microtube i szokowo zamrożono w

ciekłym azocie. Próbki następnie były przechowywane w ultra zamrażarce w temperaturze -80°C do późniejszej analizy. Następnie tkanki homogenizowano przy użyciu kulek ceramicznych w aparacie Fast-Prep 24 (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). Do homogenizacji użyto odczynnika Tri-Reagent (Merck, Kenilworth, NJ, USA), a izolacja RNA W celu izolacji RNA postępowano zgodnie z instrukcją producenta Tri-Reagent (Merck, Kenilworth, NJ, USA).

Analiza ilościowa i jakościowa RNA

Ocenę jakościową oraz integralności RNA przeprowadzono poprzez rozdział elektroforetyczny prób RNA w 1,2 % żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy) w buforze 1 × TBE (10 × TBE: 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02M EDTA, pH 8,0) przy napięciu 100 V przez 30 min. W celu oceny ilości i jakości RNA dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fal 260 (A260), 280 (A280) i 230 (A320) w spektrofotometrze NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, USA). Odczytano następujące parametry:

- stężenia RNA (ng/ul),
- czystość próby RNA określanej na podstawie stosunku wartości absorpcji A260 do A280 (współczynnik Ratio A260/A280) oraz A260 do A230 (współczynnik Ratio A260/A230).

Wszystkie próby rozcieńczono do stężenia roboczego 200 ng/µl. Tak przygotowane RNA stanowiło matrycę w reakcji RT-qPCR.

Odwrotna transkrypcja

Do przepisania informacji genetycznej z RNA na cDNA zastosowano kit do odwrotnej transkrypcji RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher,Waltham, MA, USA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono według instrukcji producenta. Następnie połączono po 2 ul każdej z prób cDNA w celu uzyskania wzorcowej matrycy cDNA.

Standardowa reakcja PCR

W celu oceny specyficzności starterów wybranych do amplifikacji fragmentów poszczególnych genów referencyjnych przeprowadzono standardową reakcję PCR w termocyklerze SensoQuest (*SensoQuest*, Göttingen, Germany)**,** zgodnie z instrukcją

producenta. Informacje na temat sekwencji starterów zastosowanych do amplifikacji fragmentów genów referencyjnych zawarto w Tabeli 3 .

Tabela 3. Sekwencje starterów dla genów referencyjnych i badanych wykorzystanych podczas badań genetycznych u koźląt.

Skrót nazwy genu	**Sekwencja (5'>3')**	**Źródło**
SOD1	F: AAGGATGAAGAGAGGCATGTTG	Materiał i metody
	R: AAGTCATCTGGTCTTTCATGGAC	
GPX1	F: GACTACACCCAGATGAATGACC	Materiał i metody
	R: GTTCTTGGCGTTTTCCTGATG	
SDHA	F: CTCTCTGAGGCCGGGTTTAA	(Salgado i in., 2022)
	R: CCAGTTGTCCTCCTCCATGTTC	

Do projektowania par starterów dla genów *SOD1, GPX1* zastosowano program Primer Express™ Software v3.0.

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym użyto aparatu ABI Prism 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems,Waltham, MA, USA) oraz kitu reakcyjnego Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, #K0222).

Reakcja RCR w czasie rzeczywistym została przeprowadzona dla każdej próbki w dwóch powtórzeniach na 384-dołkowych płytkach reakcyjnych. W skład mieszaniny

reakcyjnej wchodził: ekwiwalent 5 ng RNA amplifikowanego cDNA, starter foward, starter reverse w ilości po 5 nM każdy oraz 5 µl Master Mix (2X) oraz H2Odd do objętości 10 µl.

Analiza poziomu ekspresji badanych genów

Poziom ekspresji badanych genów referencyjnych i badanych (*GPX1, SOD1*) oznaczano za pomocą reakcji qPCR. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji fragmentów genów referencyjnych i badanych przedstawiono w Tabeli 3 .

5.5. Analiza statystyczna

Zestaw danych, skompletowany na podstawie plików tekstowych oraz arkuszy kalkulacyjnych programu EXCEL, poddano analizie za pomocą dwóch języków programowania – Python 3.10.0 (van Rossum i Drake, 2009) oraz R 4.3.1 (R Core Team, 2020). Opracowane statystyki opisowe zostały zaprezentowane w formie tabel, które zawierają wartości średnie oraz odchylenia standardowe dla każdej zmiennej i punktu czasowego. W celu określenia czy dane podążają za rozkładem normalnym, zastosowano test Shapiro-Wilka (Royston, 1995). Aby sprawdzić jednorodność wariancji między poszczególnymi grupami, wykorzystano test Levene'a (Levene, 1960). Z uwagi na rozmiar próby oraz niezgodność z założeniami dotyczącymi normalności rozkładu, wybrano test nieparametryczny do dalszej analizy. Dla porównań między badanymi grupami w każdym dniu eksperymentu zastosowano test U Manna-Whitneya (Mann & Whitney, 1947). Wizualne przedstawienie wyników zostało przygotowane przy użyciu wykresów liniowych oraz słupkowych, za pomocą biblioteki Matplotlib (Hunter, 2007). Biblioteka ta stanowi standard w dziedzinie wizualizacji danych, oferując szeroki wachlarz możliwości w zakresie stylów i formatów graficznych. Dane były analizowane na jednym poziomie istotności: $p<0,05$.

6. Wyniki

6.1 Wyniki badań morfologicznych krwi

Wyniki badań morfologicznych krwi przedstawiono w Tabelach 4. i 5.

Uzyskane wyniki wykazały, że suplementacja seleninotriglicerydów u jagniąt owcy kamienieckiej nie wpływa znacząco na większość parametrów morfologicznych krwi. Jedynie MCHC w 21. dniu doświadczenia było znacząco wyższe ($p<0,05$) w grupie doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 4., Rycina 1.).

Analogicznie przedstawiają się wyniki parametrów morfologicznych krwi w przypadku koźląt. Wskaźnikami wykazującymi istotne różniącymi się między grupą kontrolną a suplementowaną ($p<0,05$) w 1. dniu doświadczenia były #LYMPH, MCV, MCH, HDW (Tabela 5., Rycina 2. — 5.). Pozostałe wyniki nie różniły się między grupami ($p>0.05$).

Tabela 4. Wyniki badań morfologicznych grupy kontrolnej i doświadczalnej jagniąt w 0., 1., 7., 14., 21., 30. dniu doświadczenia.

Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
WBC (10^3/µl)	Kon	6	7,79 ± 2,08	7,99 ± 1,63	6,71 ± 1,31	7,78 ± 2,11	7,73 ± 1,86	8,13 ± 1,64
	Sel	6	9,01 ± 3,77	8,3 ± 3,18	8,15 ± 3,03	7,69 ± 2,43	7,89 ± 1,55	8,67 ± 1,6
%NEUT (%)	Kon	6	35,93 ± 9,2	34,92 ± 8,69	24,34 ± 8,38	29,8 ± 17,32	25,5 ± 9	25,53 ± 5,59
	Sel	6	41,73 ± 7,69	36 ± 8,78	30,48 ± 7,5	29,3 ± 3,51	30,82 ± 7,64	26,4 ± 6,48
%LYMPH (%)	Kon	6	55,22 ± 10,05	55,4 ± 7,37	63,06 ± 6,93	59,82 ± 14,51	63,67 ± 10,19	65,52 ± 5,7
	Sel	6	50,27 ± 9,57	55,32 ± 10,58	57,65 ± 7,45	58,65 ±4,86	59,3 ± 8,01	64,75 ± 7,77
% MONO (%)	Kon	6	4,07 ± 0,57	4,82 ± 1,65	4,82 ± 1,14	5,38 ± 2,18	5,43 ± 2,26	5,01 ± 0,6
	Sel	6	3,9 ± 1,32	4,6 ± 1,74	6,2 ± 2,34	6,35 ± 1,71	5,33 ± 2,07	5,16 ± 1,39
%EOS (%)	Kon	6	1,73 ± 0,99	2,32 ± 1,43	3,58 ± 1,77	2,83 ± 1,74	3,27 ± 3,35	1,84 ± 1,09
	Sel	6	1,63 ± 1,1	1,8 ± 0,73	2,68 ± 2,06	2,77 ± 1,08	2,47 ± 1,19	1,63 ± 0,62
%BASO (%)	Kon	6	1,18 ± 0,5	1,03 ± 0,64	0,86 ± 0,31	0,85 ± 0,34	0,82 ± 0,38	1,03 ± 0,28
	Sel	6	0,95 ± 0,31	1,32 ± 0,43	0,82 ± 0,32	0,98 ± 0,44	0,8 ± 0,24	1,09 ± 0,41
%LUC (%)	Kon	6	1,88 ± 0,44	1,55 ± 0,83	3,3 ± 2,83	1,35 ± 0,87	1,32 ± 0,65	1,03 ± 0,32
	Sel	6	1,53 ± 0,62	0,97 ± 0,36	2,18 ± 1,38	1,92 ± 1,25	1,32 ± 0,65	0,93 ± 0,46
#NEUT (10^3/µl)	Kon	6	2,93 ± 1,57	2,85 ± 1,07	1,72 ± 0,87	2,57 ± 2,21	1,97 ± 0,85	2,1 ± 0,64
	Sel	6	3,94 ± 2,24	3,18 ± 2,02	2,61 ± 1,46	2,28 ± 0,87	2,44 ± 0,76	2,27 ± 0,58
#LYMPH (10^3/µl)	Kon	6	4,17 ± 0,61	4,39 ± 0,95	4,16 ± 0,58	4,46 ± 0,92	4,42 ± 2,25	5,29 ± 1,21
	Sel	6	4,31 ± 1,4	4,35 ± 0,97	4,54 ± 1,38	4,44 ± 1,19	4,68 ± 1,16	5,64 ± 1,48
#MONO (10^3/µl)	Kon	6	0,31 ± 0,07	0,38 ± 0,15	0,31 ± 0,04	0,39 ± 0,14	0,43 ± 0,21	0,4 ± 0,1
	Sel	6	0,39 ± 0,29	0,41 ± 0,31	0,53 ± 0,3	0,49 ± 0,21	0,41 ± 0,13	0,44 ± 0,12
#EOS (10^3/µl)	Kon	6	0,15 ± 0,13	0,17 ± 0,09	0,23 ± 0,12	0,2 ± 0,13	0,25 ± 0,29	0,15 ± 0,08
	Sel	6	0,15 ± 0,16	0,16 ± 0,13	0,23 ± 0,23	0,23 ± 0,15	0,2 ± 0,11	0,14 ± 0,06
#BASO (10^3/µl)	Kon	6	0,1 ± 0,04	0,08 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01
	Sel	6	0,09 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,04

Wskaźnik	Grupa	N	Dzień doświadczenia					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
#LUC (10^3/µl)	Kon	6	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,09	0,23 ± 0,22	0,11 ± 0,08	0,1 ± 0,05	0,08 ± 0,03
	Sel	6	0,14 ± 0,07	0,09 ± 0,05	0,17 ± 0,12	0,16 ± 0,14	0,1 ± 0,04	0,08 ± 0,04
RBC (10^6/µl)	Kon	6	8,58 ± 1,03	8,04 ± 0,68	7,92 ± 0,75	8,4 ± 0,83	8,77 ± 0,68	9,9 ± 0,88
	Sel	6	8,77 ± 0,83	8,62 ± 1,05	8,6 ± 0,76	9,09 ± 0,64	9,66 ± 0,71	10,47 ± 0,93
HGB (g/Dl)	Kon	6	10,97 ± 1,77	9,85 ± 1,34	8,2 ± 1,29	8,63 ± 1,47	8,33 ± 1,52	9,57 ± 1,49
	Sel	6	11,6 ± 1,5	11,13 ± 1,82	9,32 ± 1,41	9,5 ± 1,37	9,5 ± 1,08	10,28 ± 0,61
HCT (%)	Kon	6	31,28 ± 4,37	28,85 ± 3,44	24,64 ± 3,48	24,88 ± 3,96	24,22 ± 3,85	27,37 ± 3,41
	Sel	6	32,22 ± 3,59	31,78 ± 4,2	27,45 ± 3,53	27,23 ± 3,21	26,65 ± 2,96	28,71 ± 1,65
MCV (fL)	Kon	6	36,43 ± 1,95	35,87 ± 2,09	30,96 ± 1,69	29,57 ± 3,18	27,57 ± 3,44	27,88 ± 4,27
	Sel	6	36,75 ± 2	36,83 ± 1,76	31,93 ± 2,74	29,9 ± 2,42	27,58 ± 2,52	27,59 ± 2,52
MCH (pg)	Kon	6	12,77 ± 0,89	12,22 ± 0,83	10,26 ± 0,68	10,28 ± 1,37	9,5 ± 1,53	9,75 ± 1,81
	Sel	6	13,2 ± 0,86	12,87 ± 1,03	10,78 ± 1,14	10,43 ± 1,16	9,83 ± 0,99	9,87 ± 0,98
MCHC (g/dL)	Kon	6	35 ± 0,73	34,05 ± 0,91	33,2 ± 0,52	34,63 ± 1,13	**34,27^A ± 1,24**	34,8 ± 1,77
	Sel	6	35,95 ± 0,83	34,95 ± 1,22	33,78 ± 0,93	34,78 ± 1,2	**35,62^B ± 0,62**	35,78 ± 1,08
RDW (%)	Kon	6	23,88 ± 2,64	24,6 ± 2,77	22,3 ± 10,14	25,82 ± 2,06	24,85 ± 2,2	22,8 ± 1,98
	Sel	6	26,05 ± 2,81	25,88 ± 1,64	29,02 ± 4,62	27,9 ± 4,32	24,87 ± 3,07	25,29 ± 4,27
HDW (g/dL)	Kon	6	2,56 ± 0,22	2,44 ± 0,15	2,63 ± 0,26	2,74 ± 0,2	2,73 ± 0,22	2,7 ± 0,32
	Sel	6	2,65 ± 0,3	2,44 ± 0,19	2,59 ± 0,34	2,67 ± 0,43	2,59 ± 0,27	2,6 ± 0,24
PLT (10^3/µl)	Kon	6	969,83 ± 261,43	878,33 ± 162,37	937,8 ± 297,22	762,83 ± 230,63	1287,83 ± 401,6	848,44 ± 267,98
	Sel	6	903,83 ± 235,04	680 ± 271,74	745 ± 256,13	910,33 ± 156,67	826 ± 252,67	875,08 ± 144,31
MPV (fL)	Kon	6	5,5 ± 0,17	5,17 ± 0,23	4,86 ± 0,2	5,23 ± 0,29	6,23 ± 0,61	5,54 ± 0,81
	Sel	6	5,63 ± 0,45	5,32 ± 0,67	5,18 ± 0,61	5,27 ± 0,34	6 ± 0,75	5,1 ± 0,35

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

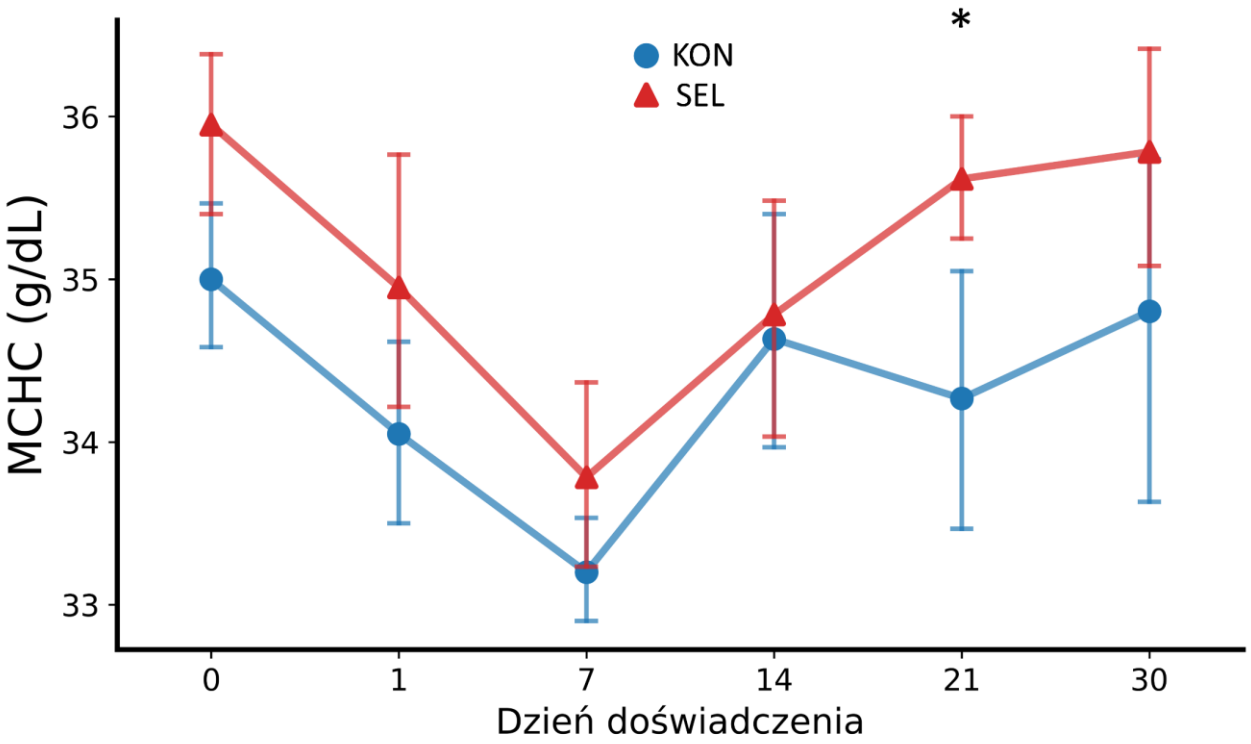
Tabela 5. Wyniki badań morfologicznych grupy kontrolnej i doświadczalnej u koźląt w 0., 1., 7., 14., 21., 30. dniu doświadczenia.

Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
WBC (10^3/µl)	Kon	6	6,96 ± 1,8	7,9 ± 1,2	7,9 ± 0,94	11,8 ± 2,85	12,34 ± 2,31	12,26 ± 2,71
	Sel	6	7,31 ± 2,32	10,11 ± 2,54	11,07 ± 4,12	11,48 ± 3,92	11,56 ± 2,67	15,95 ± 4,54
%NEUT (%)	Kon	6	32,08 ± 11,85	20,85 ± 10,01	20,15 ± 3,92	34,15 ± 11,35	37,68 ± 9,94	36,98 ± 7,82
	Sel	6	24,92 ± 6,29	17,08 ± 3,43	26,02 ± 9,56	33,07 ± 8,28	67,55 ± 90,55	28,78 ± 10,07
%LYMPH (%)	Kon	6	4,07 ± 0,84	5,77 ± 1	5,85 ± 0,73	6,99 ± 1,03	7,2 ± 1,89	6,97 ± 1,34
	Sel	6	5,19 ± 2,01	7,94 ± 2,19	7,51 ± 2,62	7,06 ± 2,42	7,68 ± 2,13	10,93 ± 4,39
% MONO (%)	Kon	6	4,55 ± 1,59	3,2 ± 2,2	3,33 ± 2,82	2,67 ± 0,95	2,1 ± 0,44	2,75 ± 0,62
	Sel	6	2,9 ± 0,94	2,28 ± 1,07	2,38 ± 2,14	2,72 ± 1,13	2,33 ± 0,95	1,97 ± 0,41
%EOS (%)	Kon	6	0,38 ± 0,19	0,72 ± 0,38	0,65 ± 0,57	0,55 ± 0,27	0,6 ± 0,33	0,77 ± 0,41
	Sel	6	0,52 ± 0,37	0,62 ± 0,35	0,92 ± 1,1	0,38 ± 0,29	0,58 ± 0,66	0,78 ± 0,47
%BASO (%)	Kon	6	2 ± 1,02	1,43 ± 0,3	1,28 ± 0,5	0,9 ± 0,23	0,82 ± 0,17	0,87 ± 0,23
	Sel	6	1,8 ± 0,66	1,4 ± 0,32	1,27 ± 0,29	1,12 ± 0,31	0,9 ± 0,24	1,05 ± 0,26
%LUC (%)	Kon	6	0,73 ± 0,87	0,33 ± 0,21	0,43 ± 0,55	0,7 ± 0,18	0,42 ± 0,19	0,55 ± 0,19
	Sel	6	0,33 ± 0,12	0,33 ± 0,16	0,28 ± 0,17	0,73 ± 0,43	0,33 ± 0,14	0,5 ± 0,32
#NEUT (10^3/µl)	Kon	6	2,37 ± 1,24	1,68 ± 0,91	1,59 ± 0,36	4,27 ± 2,24	4,67 ± 1,66	4,6 ± 1,75
	Sel	6	1,73 ± 0,38	1,7 ± 0,43	2,98 ± 1,42	3,86 ± 1,59	3,4 ± 0,84	4,31 ± 0,97
#LYMPH (10^3/µl)	Kon	6	4,07 ± 0,84	**5,77^{A} ± 1**	5,85 ± 0,73	6,99 ± 1,03	7,2 ± 1,89	6,97 ± 1,34
	Sel	6	5,19 ± 2,01	**7,94^{B} ± 2,19**	7,51 ± 2,62	7,06 ± 2,42	7,68 ± 2,13	10,93 ± 4,39
#MONO (10^3/µl)	Kon	6	0,3 ± 0,11	0,26 ± 0,16	0,27 ± 0,24	0,3 ± 0,1	0,26 ± 0,07	0,34 ± 0,12
	Sel	6	0,22 ± 0,11	0,23 ± 0,1	0,33 ± 0,45	0,3 ± 0,13	0,27 ± 0,12	0,32 ± 0,15
#EOS (10^3/µl)	Kon	6	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,03
	Sel	6	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,09 ± 0,1	0,06 ± 0,04	0,08 ± 0,1	0,38 ± 0,65

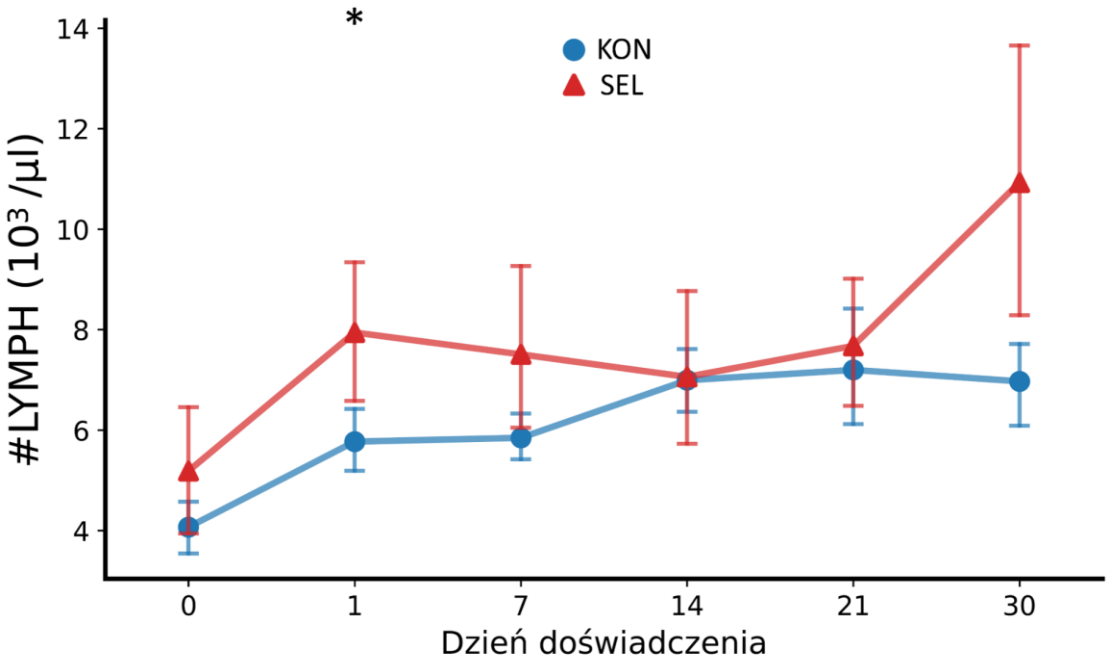
Wskaźnik	Grupa	N	Dzień doświadczenia					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
#BASO (10^3/µl)	Kon	6	0,14 ± 0,09	0,12 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,04
	Sel	6	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,06	0,14 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,1 ± 0,02	0,18 ± 0,09
#LUC (10^3/µl)	Kon	6	0,05 ± 0,07	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,07 ± 0,03
	Sel	6	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,08
RBC (10^6/µl)	Kon	6	10,52 ± 0,79	11,72 ± 1,03	12,13 ± 1,78	12,39 ± 1,28	13,37 ± 1,28	14,35 ± 1,78
	Sel	6	10,05 ± 1,5	11,47 ± 0,97	12,27 ± 1,27	12,8 ± 1,38	14,07 ± 1,38	15,15 ± 1,5
HGB (g/Dl)	Kon	6	9,55 ± 1,32	10,2 ± 1,53	9,67 ± 1,4	8,98 ± 0,77	8,8 ± 1	8,95 ± 1,15
	Sel	6	8,4 ± 1,3	8,92 ± 1,32	9,2 ± 1,31	8,9 ± 0,95	8,97 ± 0,73	9,28 ± 0,83
HCT (%)	Kon	6	39,32 ± 4,84	42,58 ± 6,02	39,22 ± 6,13	36,65 ± 3,43	35,73 ± 4,39	36,03 ± 5,05
	Sel	6	93,73 ± 150,32	36,78 ± 3,97	37,02 ± 3,94	35,87 ± 3,62	36,7 ± 1,94	37,35 ± 2,75
MCV (fL)	Kon	6	37,37 ± 3,38	**36,32^{A} ± 3,4**	32,4 ± 2,82	29,67 ± 2,19	26,72 ± 1,9	25,08 ± 1,5
	Sel	6	33,7 ± 2,77	**32,03^{B} ± 1,5**	30,28 ± 3,63	28,12 ± 2,34	26,22 ± 1,84	24,75 ± 1,23
MCH (pg)	Kon	6	9,07 ± 0,8	**8,68^{A} ± 0,74**	8,02 ± 0,76	7,25 ± 0,65	6,6 ± 0,41	6,25 ± 0,43
	Sel	6	8,42 ± 0,75	**7,73^{B} ± 0,55**	7,53 ± 0,96	6,97 ± 0,71	6,4 ± 0,63	6,15 ± 0,43
MCHC (g/dL)	Kon	6	24,32 ± 0,69	23,95 ± 0,7	24,72 ± 0,5	24,5 ± 0,47	24,67 ± 0,63	24,88 ± 0,8
	Sel	6	24,92 ± 1,07	24,18 ± 1,12	24,82 ± 1,04	24,73 ± 0,76	24,38 ± 1,08	24,8 ± 0,85
RDW (%)	Kon	6	39,07 ± 2,19	40,45 ± 2,6	42,97 ± 3,38	40,63 ± 4,75	37,23 ± 5,95	34,75 ± 4,46
	Sel	6	42,2 ± 4,4	44,67 ± 6,4	41,88 ± 6,31	37,98 ± 6,24	77,73 ± 105,15	33,43 ± 5,24
HDW (g/dL)	Kon	6	4,22 ± 0,24	**4,34^{A} ± 0,25**	4,23 ± 0,19	3,82 ± 0,18	3,61 ± 0,21	3,71 ± 0,21
	Sel	6	4,65 ± 0,7	**5,23^{B} ± 1,31**	4,38 ± 0,42	3,86 ± 0,22	3,51 ± 0,2	3,76 ± 0,32
PLT (10^3/µl)	Kon	6	1286,33 ± 311,42	1340,33 ± 372,44	1218,83 ± 293,26	1015,67 ± 341,75	987,17 ± 126,81	913,33 ± 119,66
	Sel	6	1458,5 ± 573,72	1382,5 ± 480,9	1119,17 ± 320,96	1096,83 ± 132,96	1115 ± 124,75	962,67 ± 230,83
MPV (fL)	Kon	6	7,77 ± 0,12	7,67 ± 0,1	8,28 ± 0,13	8,03 ± 0,16	8,02 ± 0,15	8,42 ± 0,1
	Sel	6	7,92 ± 0,18	7,78 ± 0,16	8,22 ± 0,28	8,12 ± 0,28	7,97 ± 0,16	8,43 ± 0,2

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

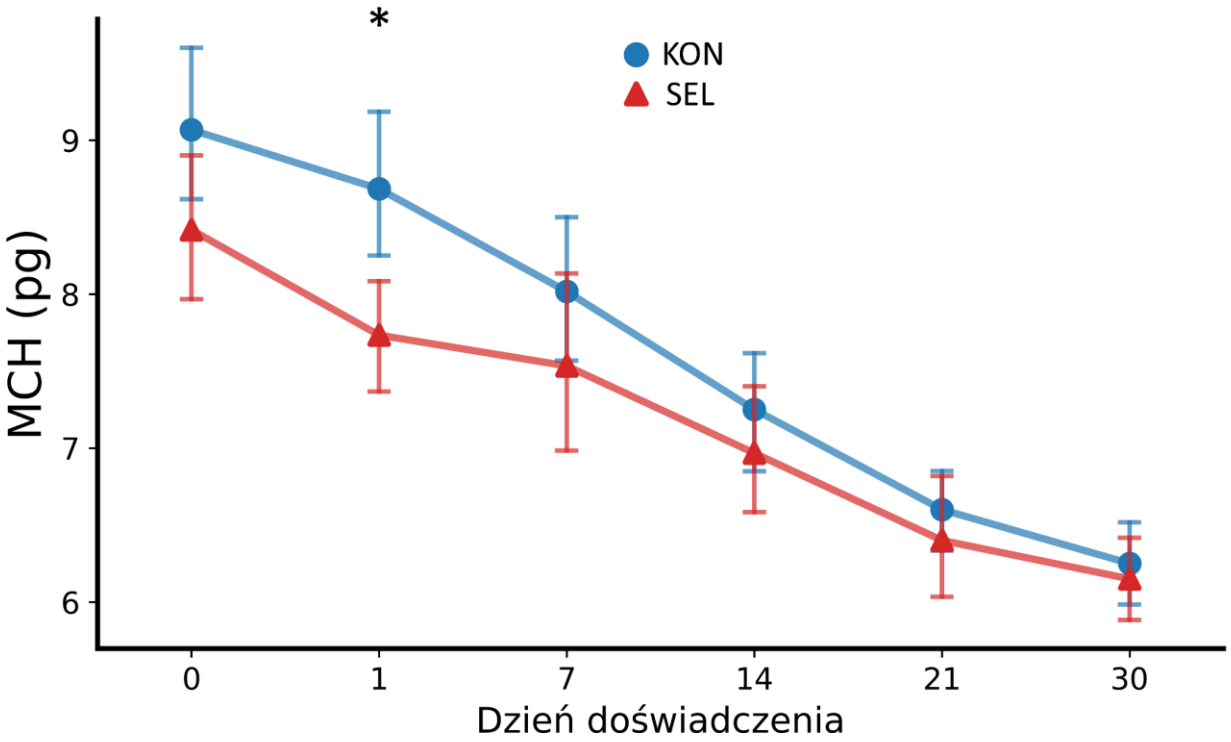
Rycina 1. Wskaźnik MCHC (g/dL) u jagniąt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



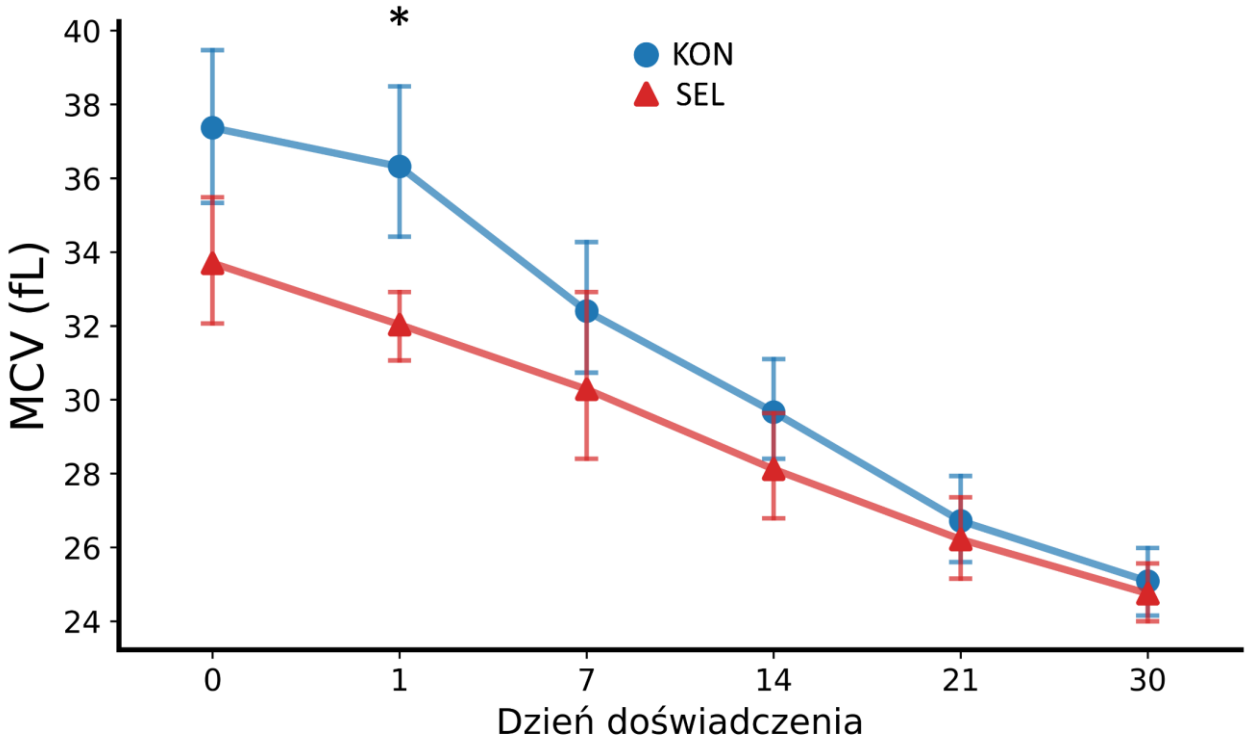
Rycina 2. Wskaźnik #LYMPH (10^3/µl) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



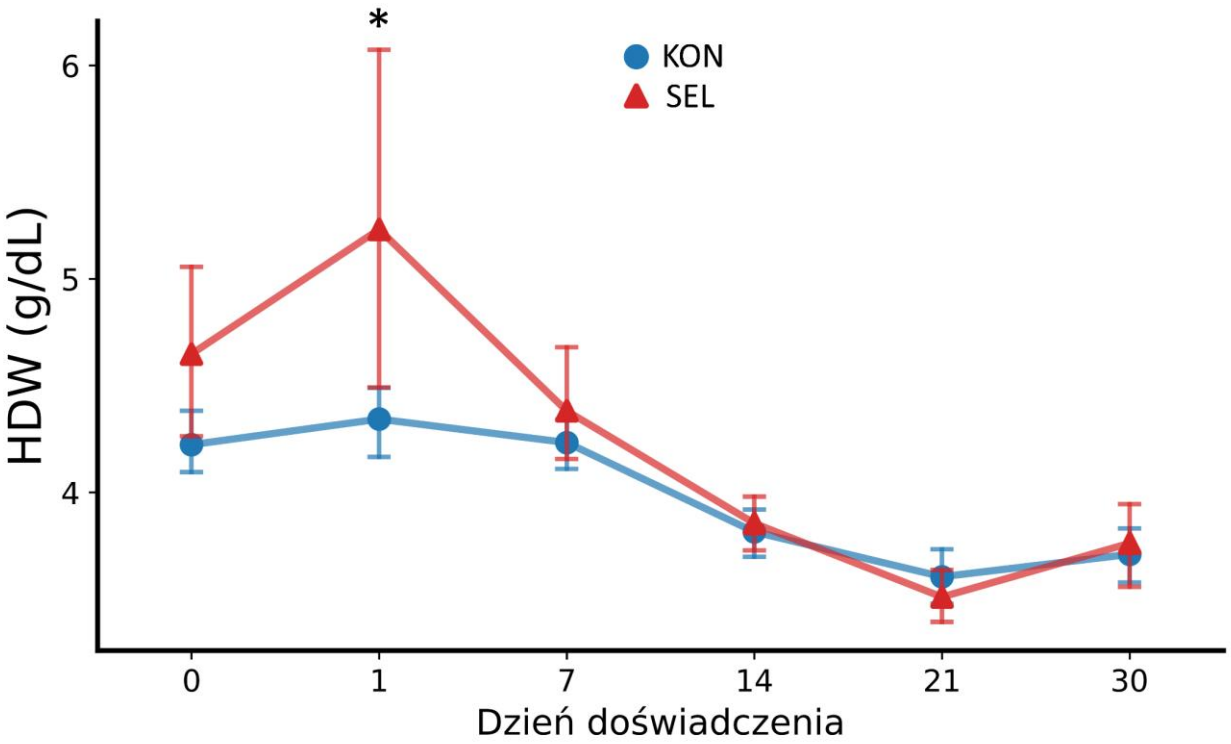
Rycina 3. Wskaźnik MCH (pg) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 4. Wskaźnik MCV (fL) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 5. Wskaźnik HDW (g/dL) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



6.2 Wyniki badań biochemicznych krwi

Wyniki badań biochemicznych krwi przedstawiono w Tabelach 3. i 4. oraz Rycinach 6. — 8.

Suplementacja seleninotriglicerydów nie wpłynęła znacząco na większość badanych parametrów biochemicznych krwi u jagniąt oraz koźląt. Wskaźnikami, które wykazały istotne różnice między grupami była aktywność AST u jagniąt w 1. dniu doświadczenia, będąca statystycznie niższa w grupie suplementowanej ($p<0,05$) (Tabela 6., Rycina 6.) oraz aktywność GGT u koźląt, której poziom był znacząco wyższy w grupie kontrolnej w 7., 21. i 30.dniu doświadczenia ($p<0,05$) (Tabela 7., Wykres 7.) W 30. dniu doświadczenia wykazano również istotnie wyższy poziom aktywności AST u koźląt grupy doświadczalnej ($p<0,05$) (Tabela 7., Rycina 8.).

Tabela 6. Wyniki badań biochemicznych grupy kontrolnej i doświadczalnej jagniąt w 0., 1., 7., 14., 21., 30 dniu doświadczenia.

Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
GLUC (mmol/l)	Kon	6	6,86 ± 0,62	7,02 ± 0,49	6,44 ± 1,25	5,87 ± 1,29	5,44 ± 0,68	4,78 ± 0,54
	Sel	6	6,48 ± 0,27	6,61 ± 0,38	6,45 ± 0,76	5,95 ± 0,86	5,06 ± 0,9	5,26 ± 1,11
ALB (g/l)	Kon	6	31,27 ±1,31	31,18 ±1,57	32,07 ±2,23	31,9 ±2,55	32,13 ±1,17	33,33 ±2,12
	Se	6	29,32 ±1,7	29,88 ±2,06	32,08 ±0,99	31,43 ±1,86	32,78 ±0,37	33,58 ±1,85
TP (g/l)	Kon	6	63,83 ±4,61	61,48 ±4,91	60,82 ±4,88	60,83 ±5,35	59,7 ±5,19	61,13 ±5,61
	Se	6	60,33 ±5,47	59,65 ±3,97	58,63 ±3,37	57,92 ±4,71	58,53 ±1,94	60,72 ±2,22
UREA (Mmol/l)	Kon	6	4,63 ± 0,75	4,97 ± 0,6	4,7 ± 0,64	4,98 ± 0,54	4,82 ± 0,62	6,35 ± 1,51
	Sel	6	4,87 ± 0,31	4,87 ± 0,41	5,15 ± 0,45	5,48 ± 0,79	5,13 ± 0,42	6,32 ± 4,3]
CREA (µmol/l)	Kon	6	37,21 ± 12,21	39,47 ± 10,55	44,01 ± 12,16	53,97 ± 10,54	59,41 ± 22,65	79,7 ± 16,96
	Sel	6	36,33 ± 10,86	37,61 ± 8,16	44,85 ± 10,87	50,29 ± 12,32	55,63 ± 15,72	75,4 ± 12,09
AST (u/l)	Kon	6	66,33 ± 8,45	**69^{A} ± 9,55**	57,33 ± 10,37	54,67 ± 13,2	54,83 ± 16,46	79,33 ± 43,28
	Sel	6	59,17 ± 6,18	**58^{B} ± 6,87**	53,17 ± 7,19	62,5 ± 30,59	54,5 ± 17,67	71 ± 13,86
ALP (u/l)	Kon	6	1125,5 ± 358,73	966,17 ± 265,52	792,17 ± 172,01	679,83 ± 203,25	426 ± 186,86	307,96 ± 158,03
	Sel	6	927,67 ± 144,58	876,5 ± 163,91	718,5 ± 150,86	609,67 ± 151,72	465,5 ± 153,24	432,67 ± 70,7
GGT (u/l)	Kon	6	459,83 ± 228,11	355,67 ± 168,71	186,17 ± 68,94	144,83 ± 48,83	99,67 ± 17,03	85,5 ± 18,77
	Sel	6	386,5 ± 279,7	298,17 ± 203,24	146,5 ± 66,75	117,5 ± 45,5	87,67 ± 17,48	88,67 ± 14,54
LDH (u/l)	Kon	6	1364,17 ±143,34	1362 ±84	1186,5 ±143,83	1132 ±190,38	1001,33 ±122,45	1014,5 ±161,09
	Sel	6	1247 ±169,64	1263 ±162,94	1169,33 ±94,99	1133,33 ±156,18	995,67 ±216,66	1095,33 ±94,07

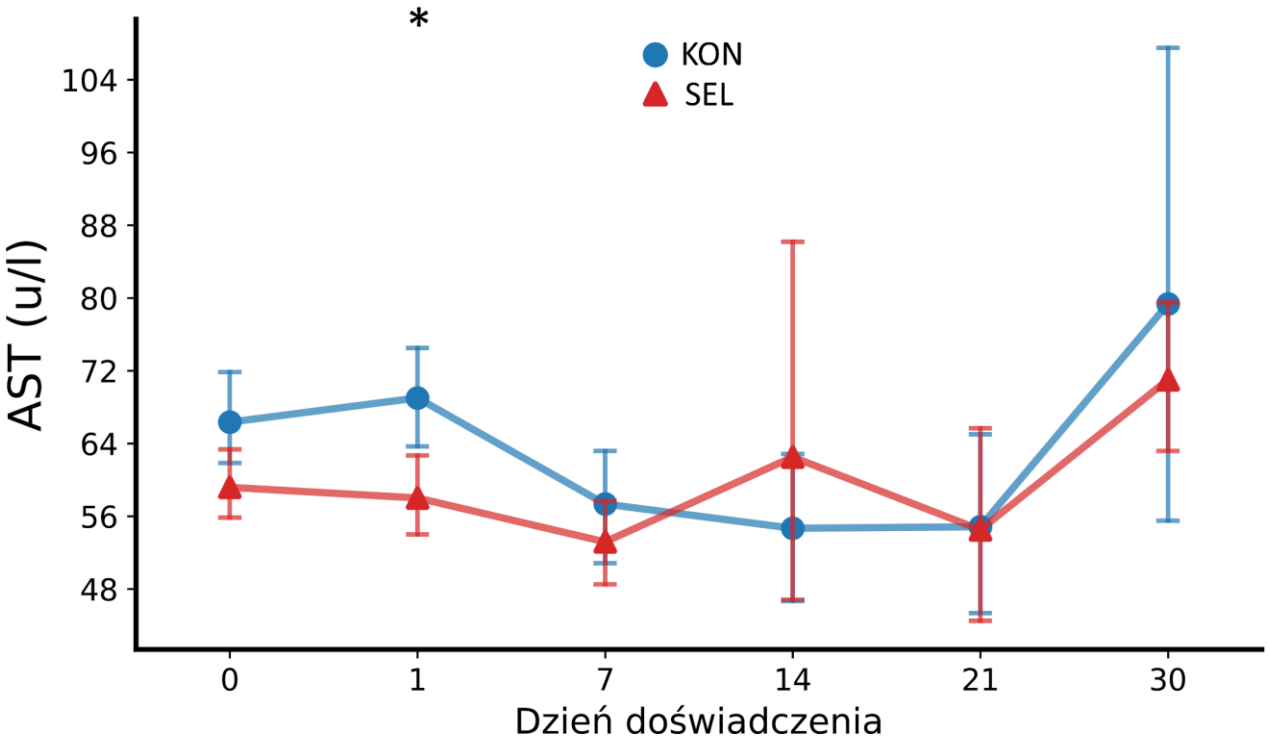
Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

Tabela 7. Wyniki badań biochemicznych grupy kontrolnej i doświadczalnej koźląt w 0., 1., 7., 14., 21., 30 dniu doświadczenia.

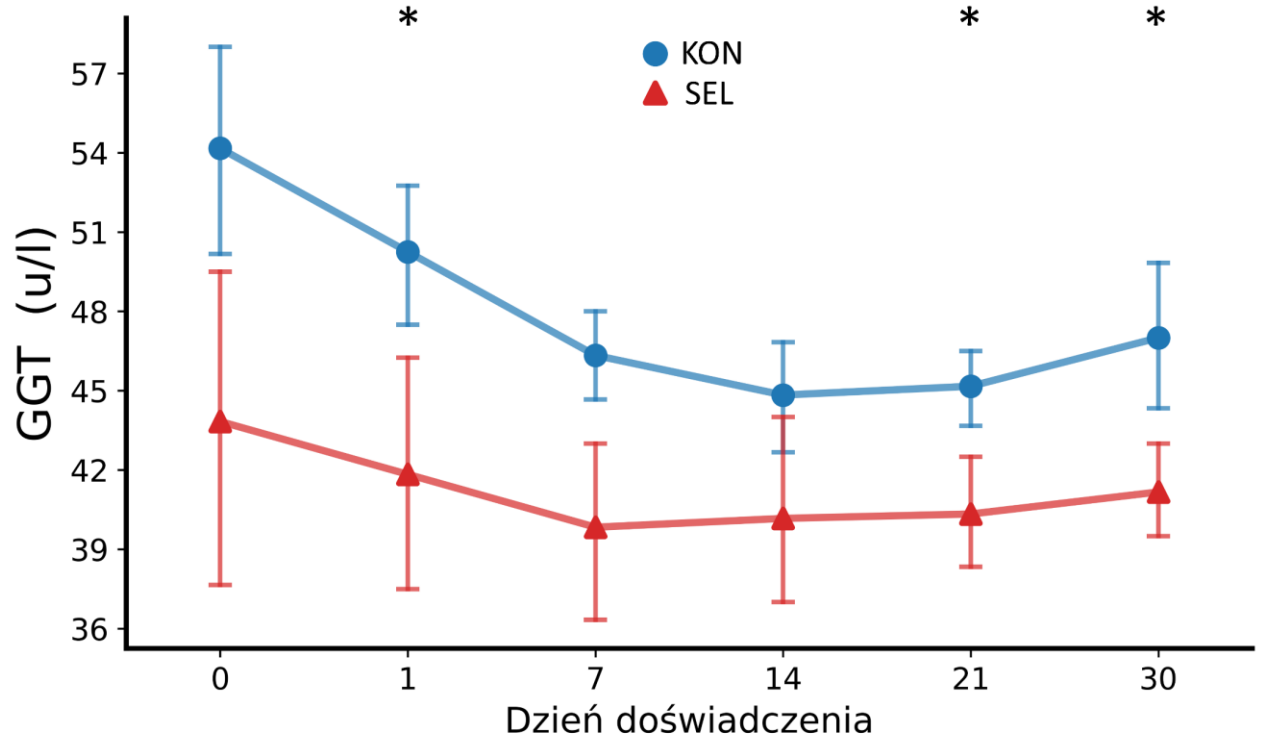
Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
GLUC (mmol/l)	Kon	6	4,39 ± 0,24	4,7 ± 0,32	5 ± 0,55	4,9 ± 0,54	4,44 ± 0,69	4,35 ± 0,89
	Sel	6	5,1 ± 0,84	5,24 ± 0,91	5,37 ± 1,08	5,39 ± 0,35	4,37 ± 0,65	4,44 ± 0,49
ALB (g/l)	Kon	6	35,35 ±1,49	34,75 ±1,67	34,15 ±2,01	33,5 ±1,55	32,08 ±1,23	32,07 ±1,34
	Sel	6	36,03 ±1,21	35,53 ±1,64	35,03 ±2,13	33,87 ±2,45	32,37 ±2,45	32,15 ±1,75
TP (g/l)	Kon	6	53,6 ±5,81	52,33 ±5,34	51,05 ±5,06	50,8 ±3	49,2 ±2,35	49,52 ±2,67
	Sel	6	56,47 ±6,02	55,12 ±6,02	53,77 ±6,24	52,78 ±6,13	51,63 ±4,95	51,63 ±5,37
CREA (µmol/l)	Kon	6	39,17 ± 11,42	44,2 ± 14,24	49,22 ± 17,6	50,38 ± 13,61	43,15 ± 16,48	46,19 ± 9,81
	Sel	6	43,11 ± 15,59	43,47 ± 13,27	43,83 ± 12,95	43,26 ± 9,28	48,26 ± 15,34	39,27 ± 12,66
UREA (Mmol/l)	Kon	6	6,33 ± 2,05	5,46 ± 1,36	4,58 ± 0,88	3,72 ± 0,86	4,92 ± 1,31	4,52 ± 1,43
	Sel	6	6,92 ± 1,82	5,99 ± 1,47	5,07 ± 1,22	4,25 ± 1,37	3,75 ± 1	4,63 ± 0,92
AST (u/l)	Kon	6	104,5 ± 30,61	92,5 ± 16,01	80,5 ± 10,33	82,67 ± 11,96	66,83 ± 17,5	**55,83^{A} ± 29,46**
	Sel	6	76,67 ± 27,93	77,83 ± 26,59	79 ± 26,9	84,33 ± 19,93	64,83 ± 23,06	**87^{B} ± 10,35**
ALP (u/l)	Kon	6	596 ± 286,46	505,25 ± 231,83	414,5 ± 179,49	282,17 ± 114,04	230,33 ± 63,3	228,33 ± 58,54
	Sel	6	715,17 ± 131,82	570,08 ± 121,81	425 ± 122,8	284,33 ± 112,92	223,17 ± 138,02	149,17 ± 83,32
GGT (u/l)	Kon	6	54,17 ± 6,31	50,25 ± 4,23	**46,33^{A} ± 2,66**	44,83 ± 3,49	**45,17^{A} ± 2,23**	**47^{A} ± 4,29**
	Sel	6	43,83 ± 9,58	41,83 ± 6,98	**39,83^{B} ± 5,49**	40,17 ± 5,98	**40,33^{B} ± 3,33**	**41,17^{B} ± 2,93**
LDH (u/l)	Kon	6	768,67 ±445,18	757,42 ±263,75	746,17 ±123,58	528,17 ±74,67	557,5 ±137,65	605,67 ±96,38
	Sel	6	703 ±115,87	698,92 ±124,9	694,83 ±141,19	548,17 ±97,09	548,17 ±139,36	567,17 ±83,79

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

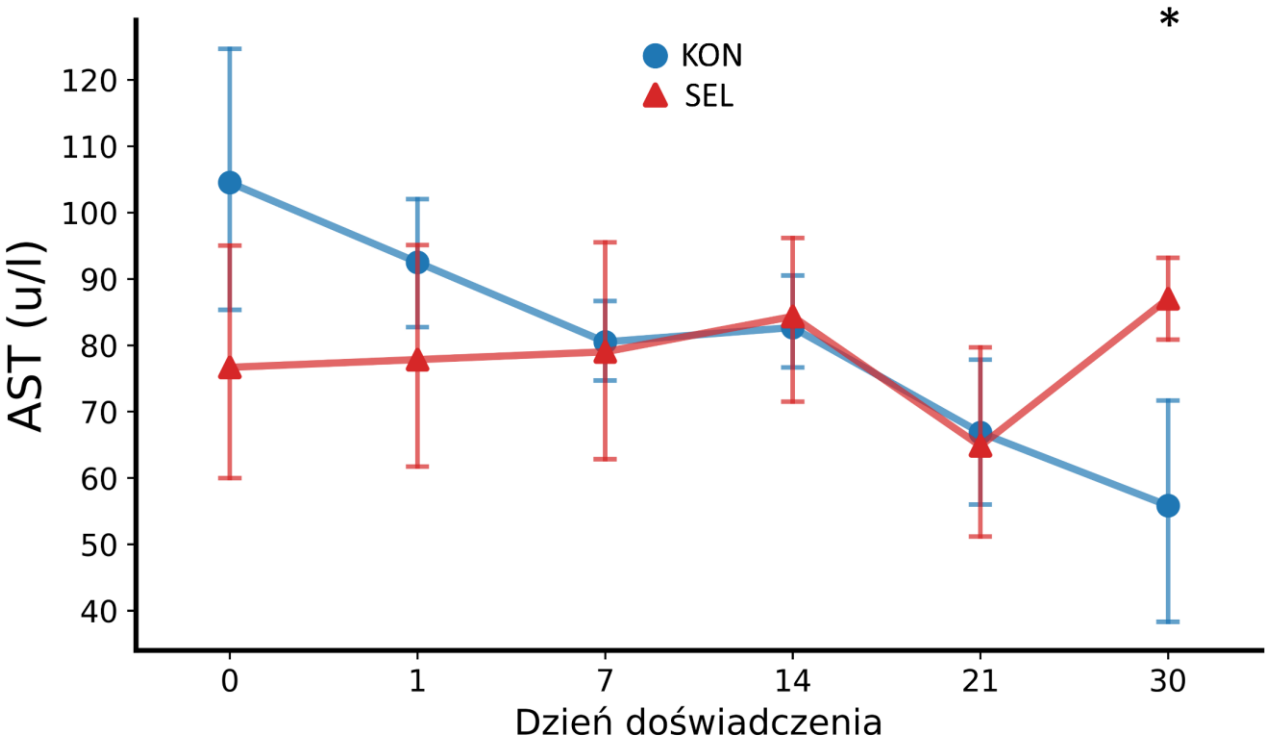
Rycina 6. Aktywność AST (u/l) u jagniąt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 7. Aktywność GGT (u/l) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 8. Aktywność AST (u/l) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



6.3 Wyniki badania aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

6.3.1 Aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej u jagniąt.

Aktywność GPX u jagniąt przedstawia Tabela 8. oraz Ryciny 9. i 10.

Aktywność GPX u jagniąt po suplementacji seleninotriglicerydami była istotnie wyższa w porównaniu do jagniąt grupy kontrolnej. Aktywność GPX grupy doświadczalnej osiągnęła najwyższy poziom 14. dnia eksperymentu (338, 94 ± 36,19 IU/gHB, $p<0,05$). Aktywność GPX u jagniąt grupy kontrolnej utrzymywała się na porównywalnym poziomie w trakcie całego eksperymentu.

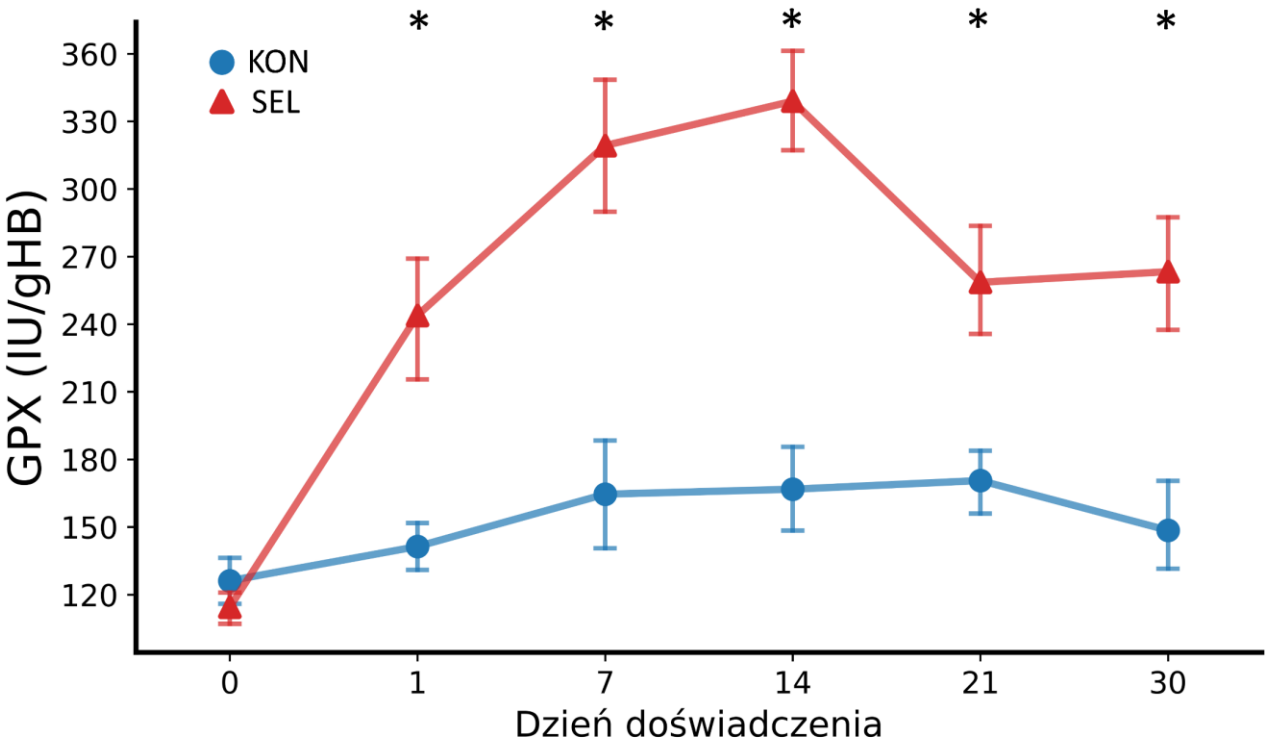
Aktywność SOD po suplementacji seleninotriglicerydami była istotnie wyższa w porównaniu do koźląt grupy kontrolnej w 1., 7., 14., 21. oraz 30. dniu eksperymentu. Aktywność SOD grupy badawczej osiągnęła najwyższy poziom 7. dnia eksperymentu (726,25 ± 53,59 IU/ml, $p<0,05$). Natomiast aktywność SOD u jagniąt grupy kontrolnej utrzymywała się na porównywalnym poziomie w trakcie całego eksperymentu.

Tabela 8. Wyniki badań GPX i SOD grupy kontrolnej i doświadczalnej jagniąt w 0., 1., 7., 14., 21., 30 dniu doświadczenia.

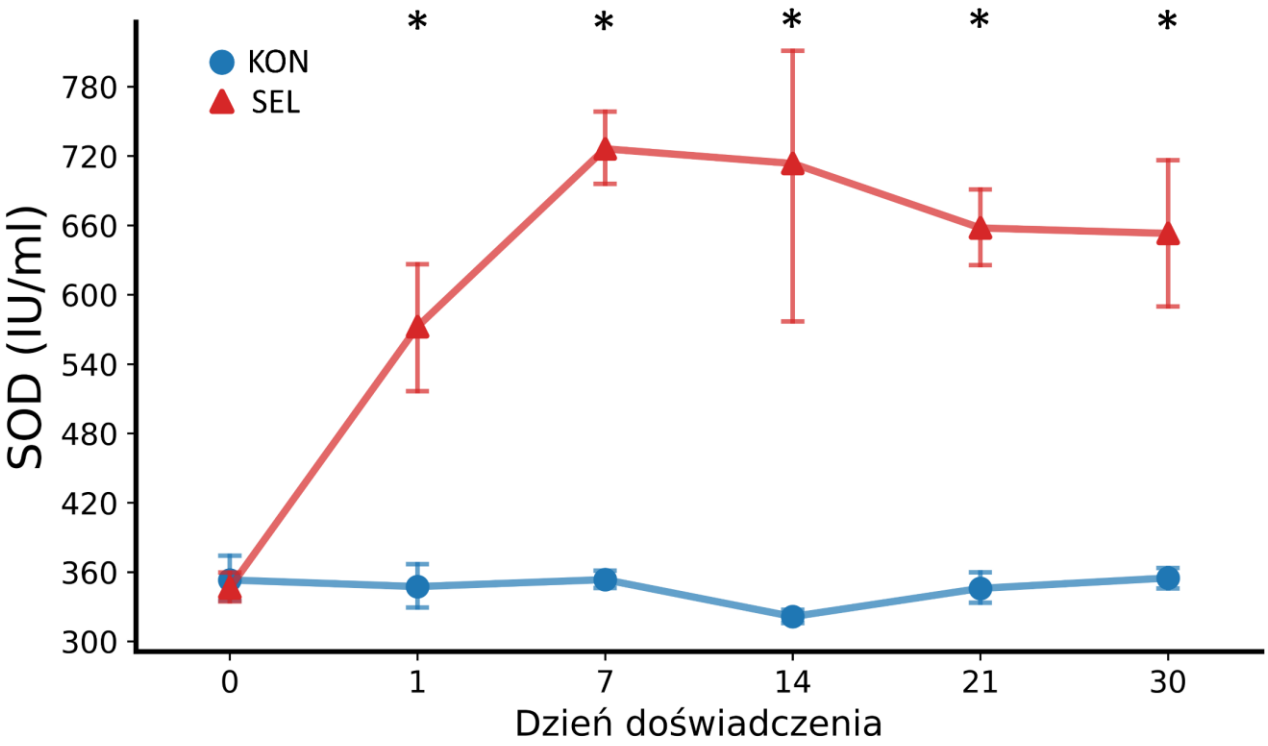
Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
GPX (IU/gHB)	Kon	6	126,16 ± 16,61	**141,33^{A} ± 17,19**	**164,55^{A} ± 39,08**	**166,75^{A} ± 30,81**	**170,6^{A} ± 22,75**	**148,51^{A} ± 32,23**
	Sel	6	114,4 ± 11,16	**243,89^{B} ± 43,34**	**319,26^{B} ± 47,51**	**338,94 ^{B} ± 36,19**	**258,57 ^{B} ± 43,68**	**263,28 ^{B} ± 41,45**
SOD (IU/ml)	Kon	6	353,16 ± 31,5	**347,43 ^{A} ± 29,84**	**353,48 ^{A} ± 12,97**	**321,47 ^{A} ± 10,26**	**345,88 ^{A} ± 22,28**	**354,87 ^{A} ± 14,34**
	Sel	6	346,36 ± 19,75	**572,32 ^{B} ± 86,53**	**726,25 ^{B} ± 53,59**	**713,56 ^{B} ± 194,4**	**657,74 ^{B} ± 54,48**	**653,03 ^{B} ± 104,34**

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

Rycina 9. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) u jagniąt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 10. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) u jagniąt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



6.3.2 Aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej u koźląt

Aktywność GPX u koźląt przedstawia Tabela 9 oraz Ryciny 11. i 12.

Aktywność GPX u koźląt po suplementacji seleninotriglicerydami była istotnie wyższa w porównaniu do koźląt grupy kontrolnej. Aktywność GPX grupy badawczej charakteryzowała się stałym wzrostem przez cały okres doświadczenia i osiągnęła najwyższy poziom w 21. dnia 300,49 ± 58,55 IU/gHB ($p<0,05$). Natomiast aktywność GPX u koźląt grupy kontrolnej utrzymywała się na porównywalnym poziomie w trakcie całego eksperymentu.

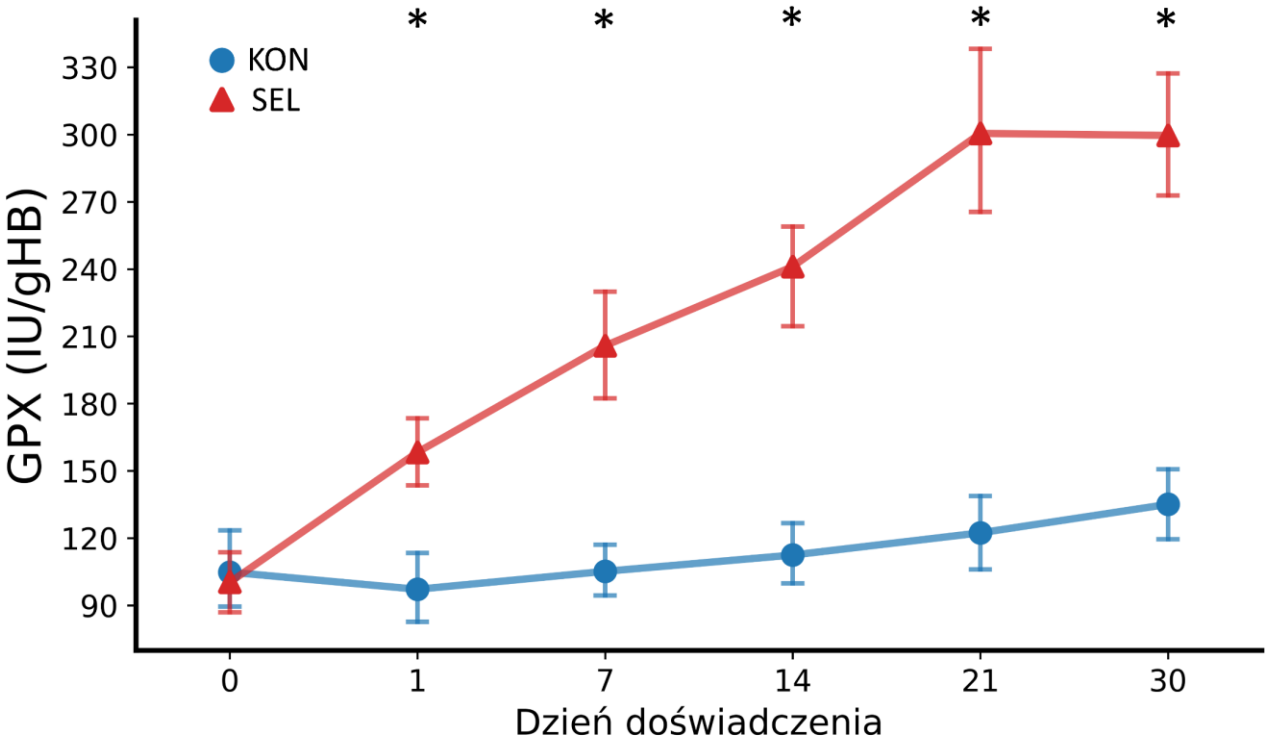
Aktywność SOD u koźląt suplementowanych seleninotriglicerydami w porównaniu do koźląt grupy kontrolnej była istotnie wyższa od 7 dnia do końca doświadczenia. Aktywność SOD grupy badawczej osiągnęła najwyższy poziom 30. dnia eksperymentu (753,71 ± 47,27 IU/ml, $p<0,05$). Aktywność SOD u koźląt grupy kontrolnej utrzymywała się na porównywalnym poziomie w trakcie całego eksperymentu.

Tabela 9. Wyniki badań GPX i SOD grupy kontrolnej i doświadczalnej koźląt w 0., 1., 7., 14., 21., 30 dniu doświadczenia.

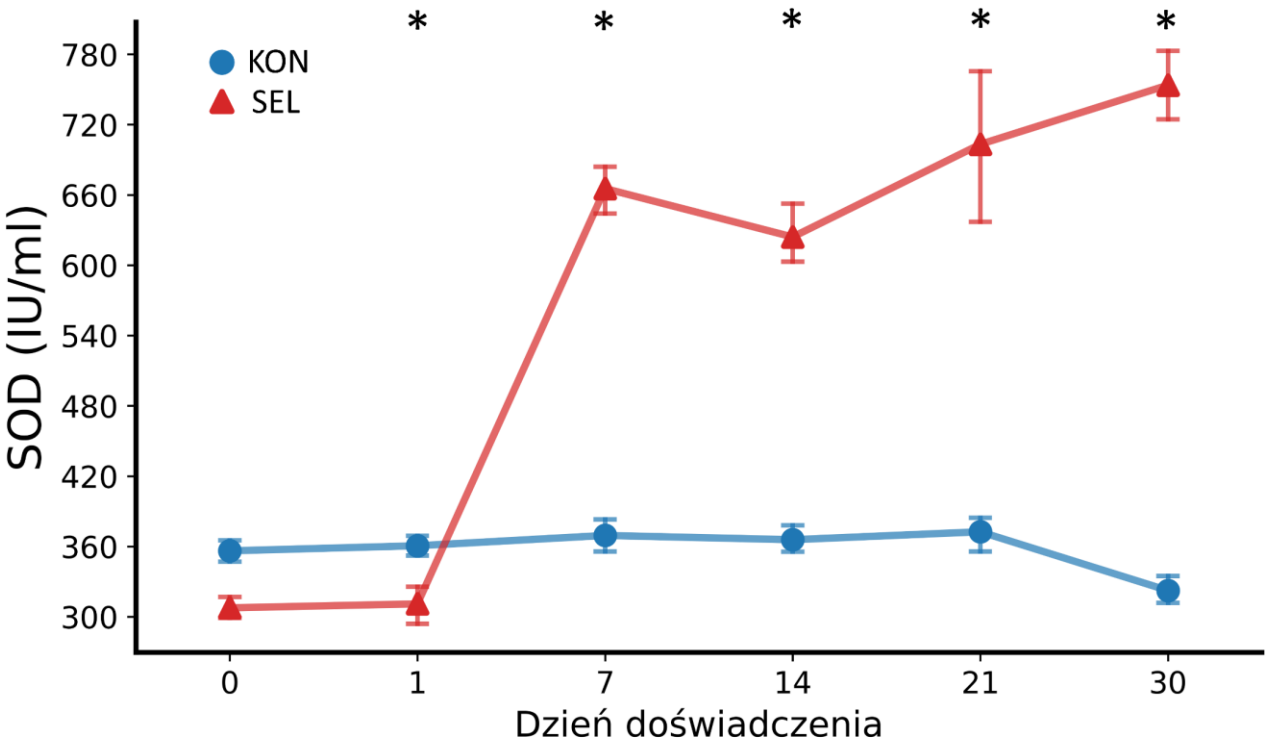
Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
GPX (IU/gHB)	Kon	6	104,84 ± 28,69	**97,19^{A} ± 24,01**	**105,19^{A} ± 18,23**	**112,47^{A} ± 21,93**	**122,37^{A} ± 26,5**	**135,08^{A} ± 25,31**
	Sel	6	100,31 ± 22,65	**158,28^{B} ± 23,59**	**205,8^{B} ± 38,76**	**241,1^{B} ± 35,15**	**300,4^{B} 9 ± 58,55**	**299,59^{B} ± 44,7**
SOD (IU/ml)	Kon	6	356,24 ± 14,72	**360,59^{A} ± 14,03**	**369,39^{A} ± 22,95**	**365,74^{A} ± 18,38**	**372,52^{A} ± 22,25**	**322,38^{A} ± 17,85**
	Sel	6	307,6 ± 13,94	**310,99^{B} ± 28,28**	**665,45^{B} ± 30,88**	**624,11^{B} ± 39,94**	**703,24^{B} ± 101,9**	**753,71^{B} ± 47,27**

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

Rycina 11. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



Rycina 12. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



6.4 Wyniki badania stężenia selenu w surowicy krwi jagniąt i koźląt

Wyniki badań stężenia selenu w surowicy krwi u jagniąt i koźląt przedstawia Tabela 7. i 8.

Suplementacja jagniąt roztworem seleninotriglicerydów spowodowała znaczący wzrost stężenie selenu w surowicy grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną ($p<0,05$) w 1., 7., 14., 21. i 30. dniu doświadczenia (Tabela 10.). Podobnie u koźląt suplementowanych seleninotriglicerydami zaobserwowano znacząco wyższe stężenie selenu w surowicy grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą badaną ($p<0,05$) w 1., 7., 14., 21. i 30. dniu doświadczenia (Tabela 11.). Najwyższe stężenie selenu w grupie doświadczalnej zanotowano w 7 dniu doświadczenia zarówno w przypadku jagniąt, jak i koźląt, przy czym najwyższą wartość sięgającą 509,33 ±200,16 µg/l zaobserwowano w grupie doświadczalnej koźląt.

Tabela 10. Wartość stężenia Se (µg/l) w grupie kontrolnej i doświadczalnej u jagniąt w dniu 0., 1., 7., 14., 21. i 30 doświadczenia

Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
Se (µg/l)	Kon	6	76,22 ±7,12	**73,57^{A} ±9,54**	**94,78^{A} ±25,75**	**72,83^{A} ±14,67**	**73,68^{A} ±12,59**	**87,35^{A} ±15,13**
	Sel	6	70,75 ±25,91	**393,02^{B} ±98,65**	**464,58^{B} ±205,51**	**370,83^{B} ±146,04**	**171,59^{B} ±23**	**136,63^{B} ±22,6**

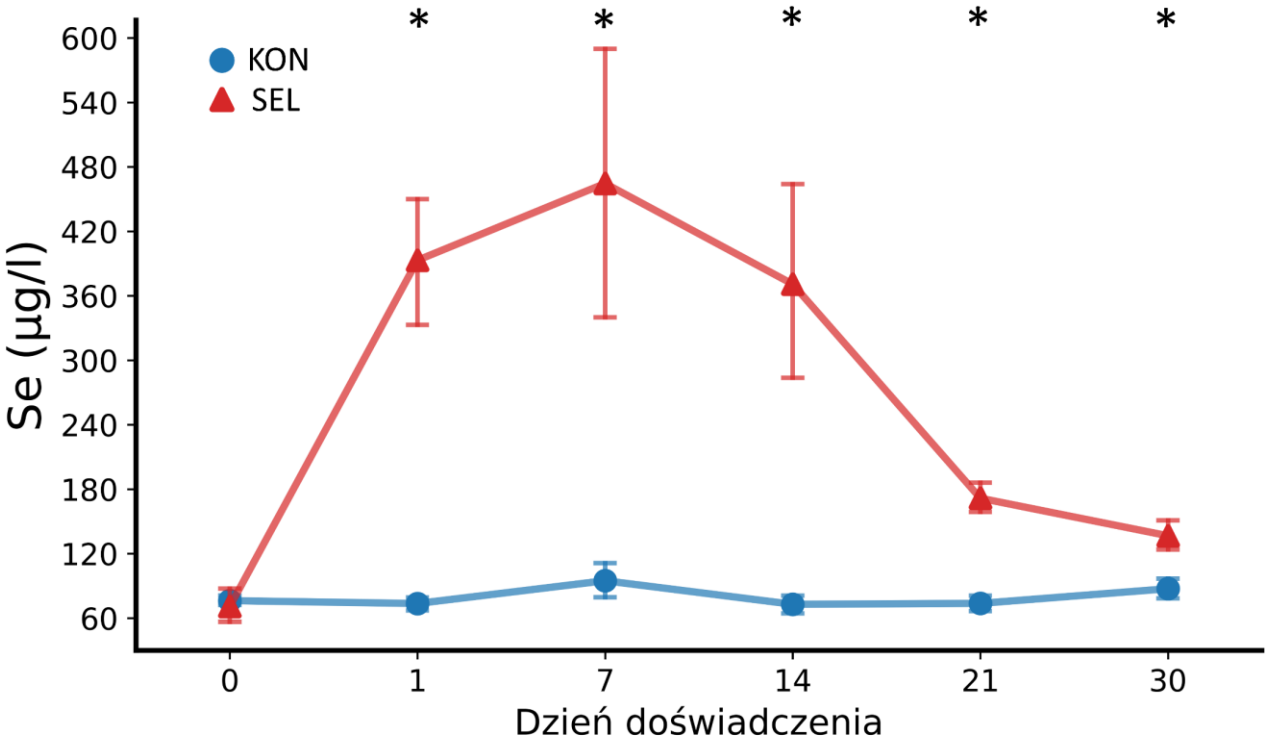
Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

Tabela.11 Wartość stężenia Se (µg/l) w grupie kontrolnej i doświadczalnej u koźląt w dniu 0., 1., 7., 14., 21. i 30 doświadczenia.

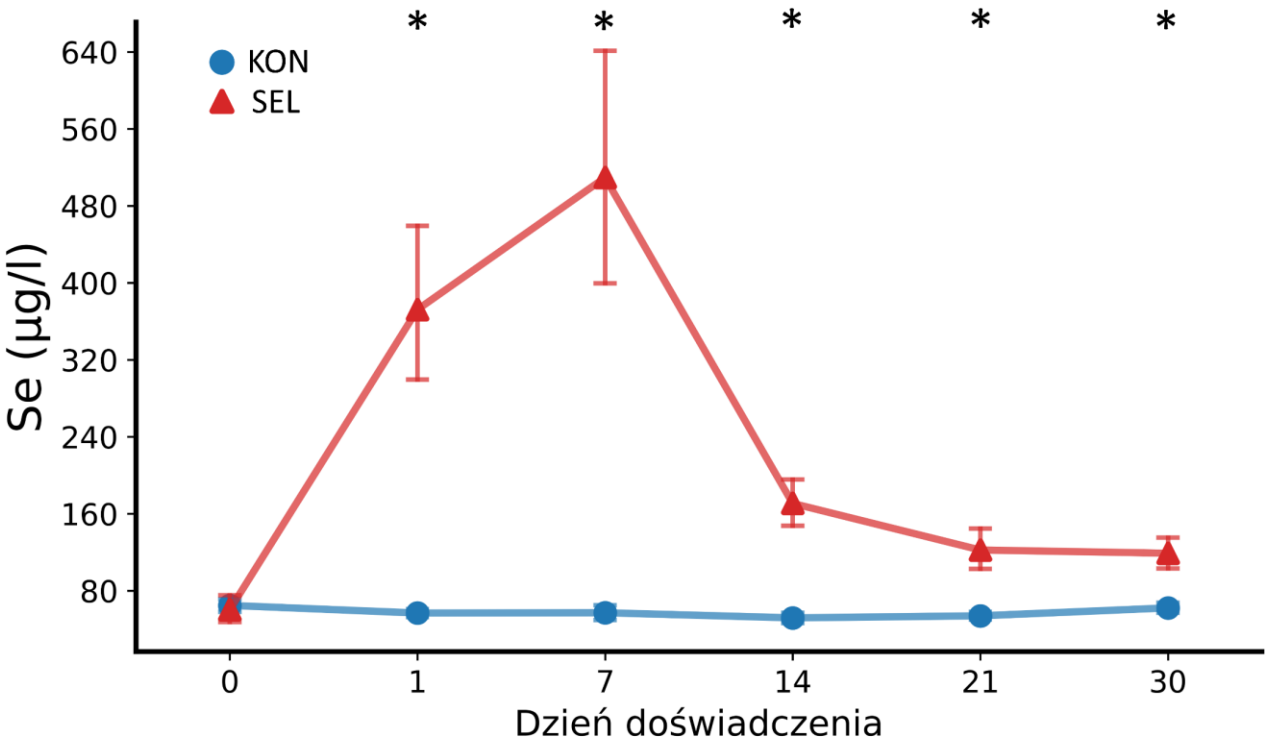
Wskaźnik	**Grupa**	**N**	**Dzień doświadczenia**					
			0	**1**	**7**	**14**	**21**	**30**
Se (µg/l)	Kon	6	64,75 ± 10,65	**56,85^{A} ±6 ,95**	**57,13^{A} ± 13,28**	**51,82^{A} ± 8,7**	**53,93^{A} ± 6,45**	**62,18^{A} ± 8,67**
	Sel	6	60,25 ± 22,61	**372,12^{B} ± 133,33**	**509,33^{B} ± 200,16**	**170,75^{B} ± 41,80**	**122,33^{B} ± 34,65**	**118,98^{B} ± 25,09**

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ oznaczono literami A-B

Rycina 12. Stężenie selenu (Se µg/l) u jagniąt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



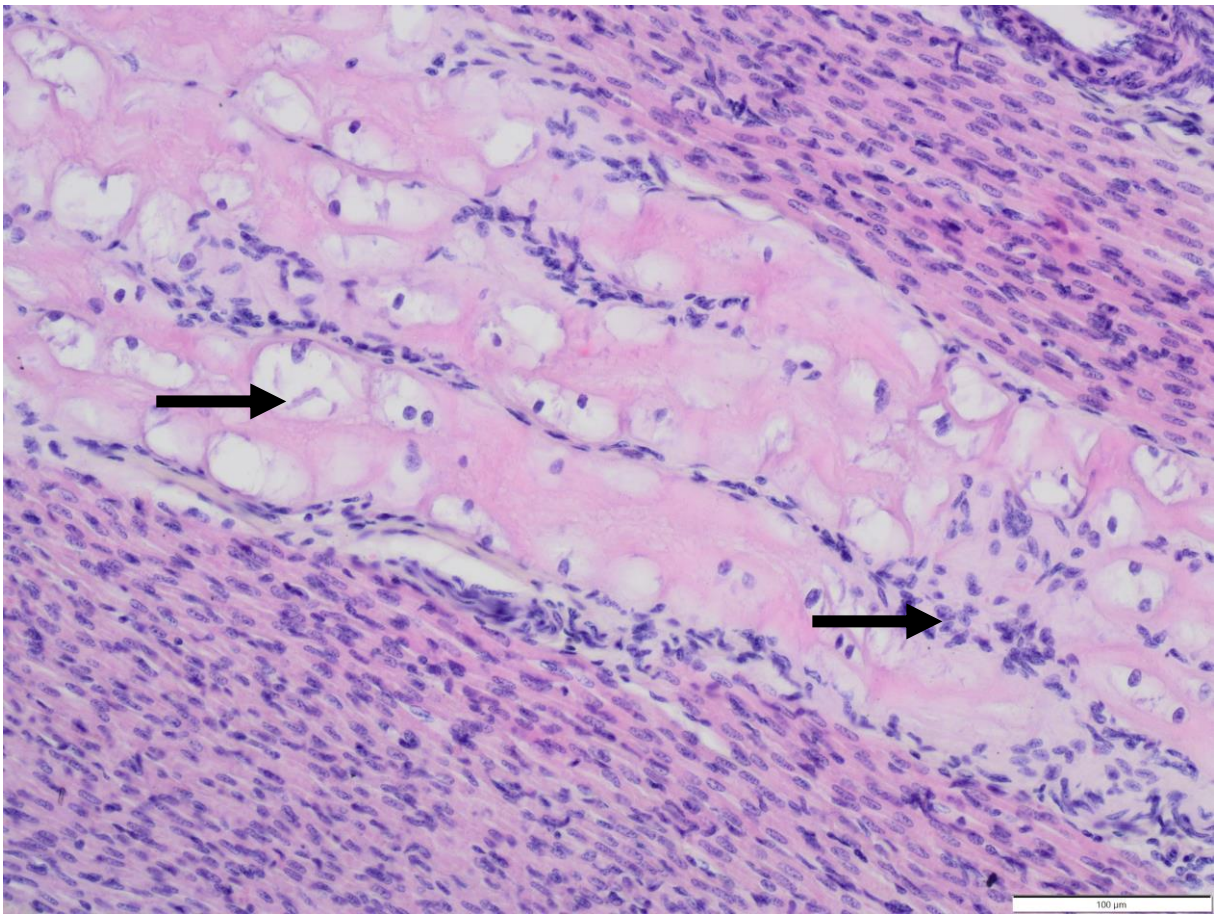
Rycina 13. Stężenie selenu (Se µg/l) u koźląt grupy kontrolnej i doświadczalnej. Wartości istotne na poziomie p ≤0,05 zostały oznaczone *.



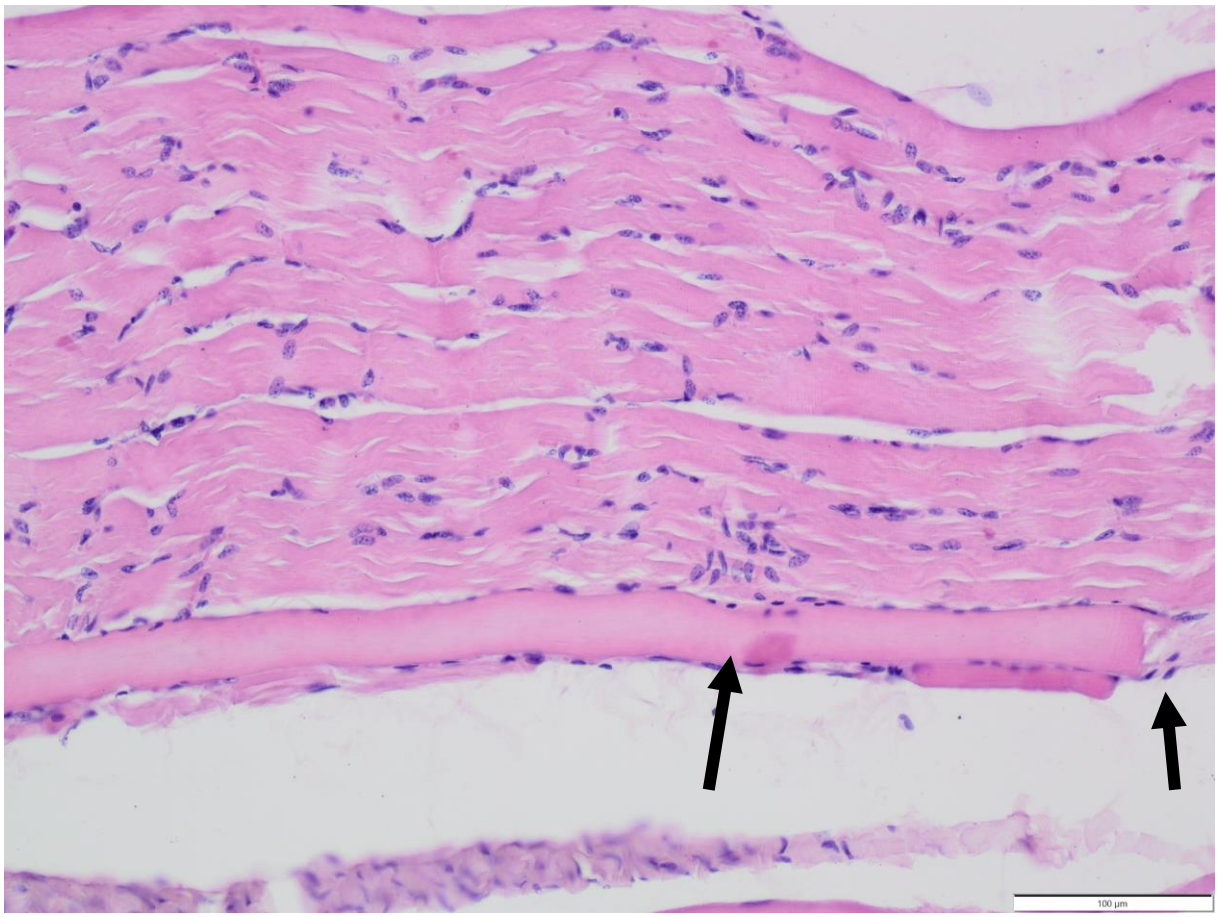
6.5 Wyniki badań histopatologicznych

W grupie kontrolnej jagniąt w 4 na 6 badanych zwierząt obserwowano odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania mięśnia najdłuższego grzbietu *m. longisimus dorsi* (Fot. 1.) oraz mięśnia dwugłowego uda *m. biceps femoris* (Fot. 2.) barwionych metodą HE. W 1 z 6 badanych jagniąt grupy kontrolnej w próbkach mięśnia najdłuższego grzbietu, jak i mięśnia dwugłowego uda, oprócz odcinkowego szkliwienia z zanikiem poprzecznego prążkowania, w pojedynczych włóknach mięśniowych zaobserwowano także odcinkową martwicę włókien z rozpadem grudkowym sarkoplazmy i naciekiem makrofagów, limfocytów oraz pojedynczych eozynofilii, (Fot. 3., 4.). W barwieniu HBFP, u tych samych jagniąt należących do grupy kontrolnej, stwierdzano podobne zmiany charakteryzujące się obecnością włókien mięśniowych z zanikiem poprzecznego prążkowania i szkliwieniem sarkoplazmy oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych (Fot. 5., 6.). Nie obserwowano takich zmian w grupie doświadczalnej, jak i w badanych fragmentach mięśnia sercowego w grupie kontrolnej i doświadczalnej jagniąt.

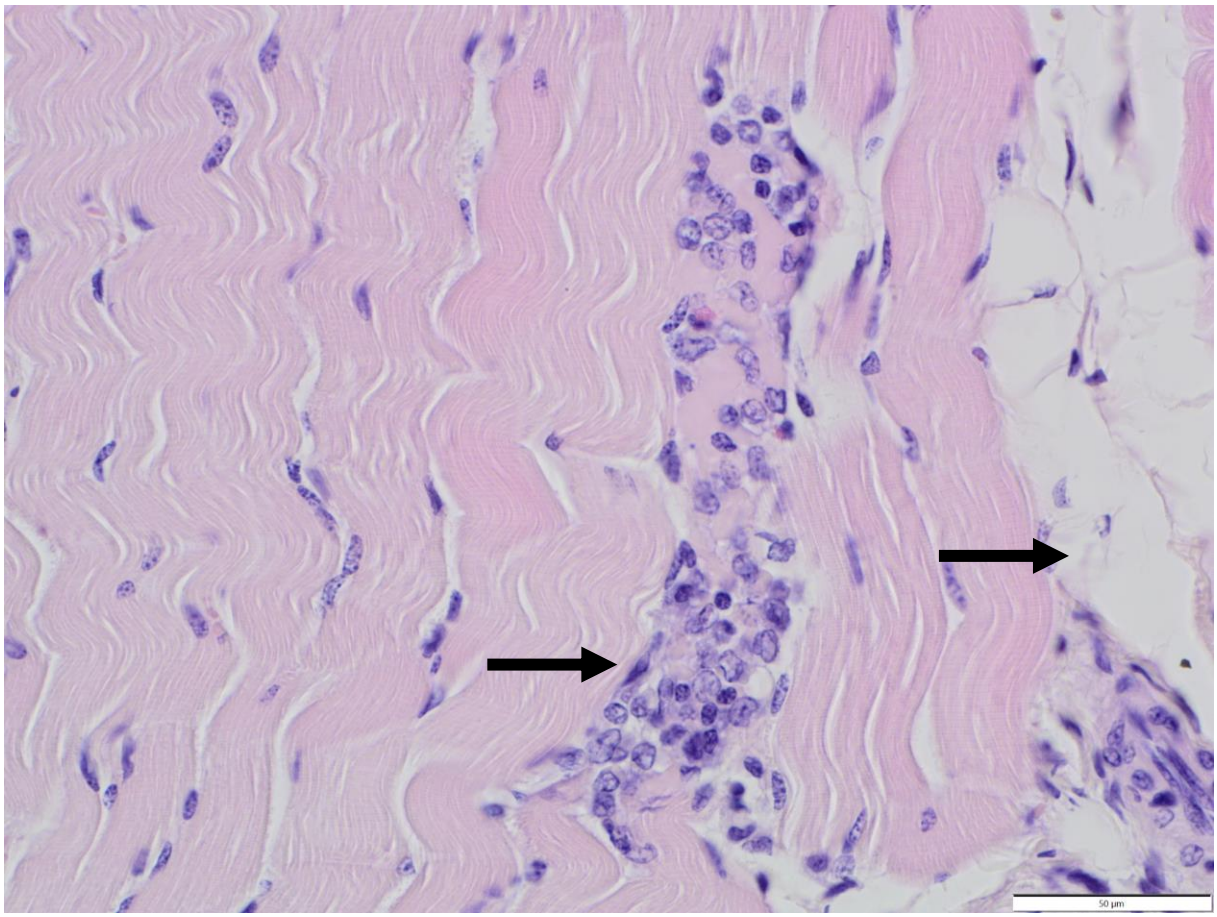
W barwieniu HE, w grupie kontrolnej koźląt, również stwierdzono zmiany w obrazie histopatologicznym badanych fragmentów tkanki mięśniowej mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi)* i dwugłowego uda (*m. biceps femoris)* (Fot. 7., 8.). Obserwowano u nich odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania. Barwieniem HBFP (Fot. 9.,10.) u tych samych koźląt należących do grupy kontrolnej, stwierdzano podobne zmiany charakteryzujące się rozległą martwicą całych włókien mięśniowych z rozpadem sarkoplazmy i zanikiem poprzecznego prążkowania oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych. Nie obserwowano takich zmian w grupie doświadczalnej, jak i w badanych fragmentach mięśnia sercowego w grupie kontrolnej, a także wszystkich próbach pobranych od grupy doświadczalnej koźląt.



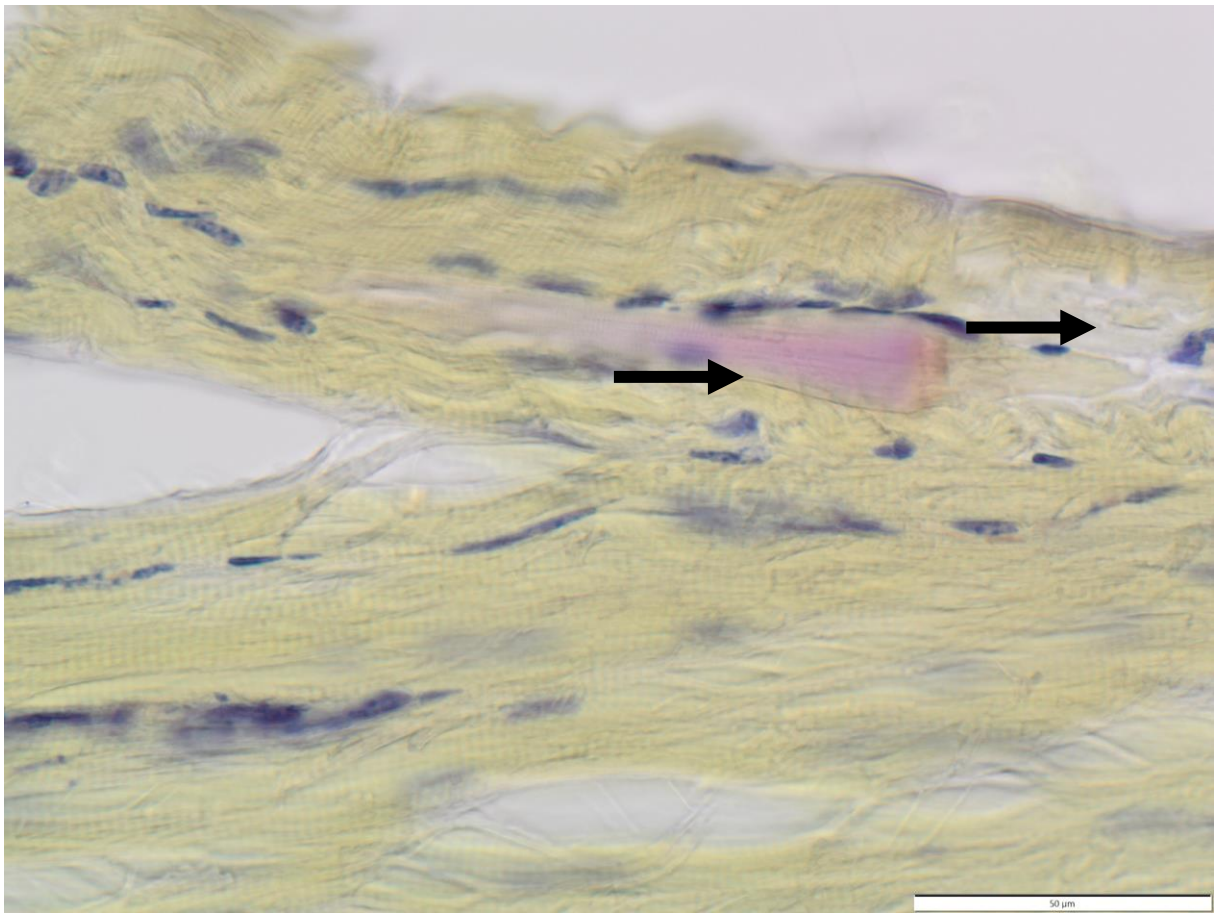
Fot. 1. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu *(m. longisimus dorsi)* u jagnięcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania (strzałka). Barwienie HE. Pow.20x.



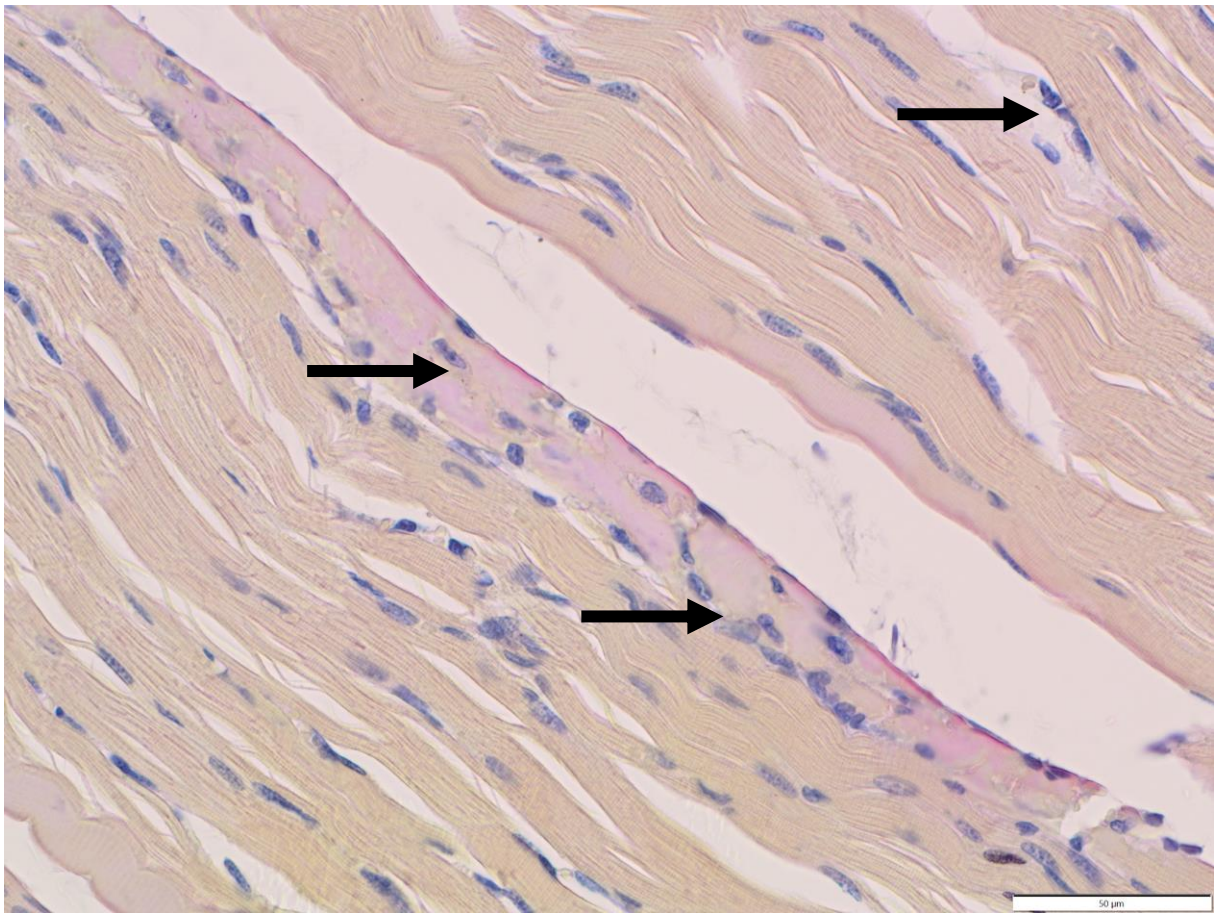
Fot. 2. Zmiany patologiczne w mięśniu dwugłowym uda *(m. biceps femoris*) u jagnięcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania (strzałka). Barwienie HE. Powiększenie 20x.



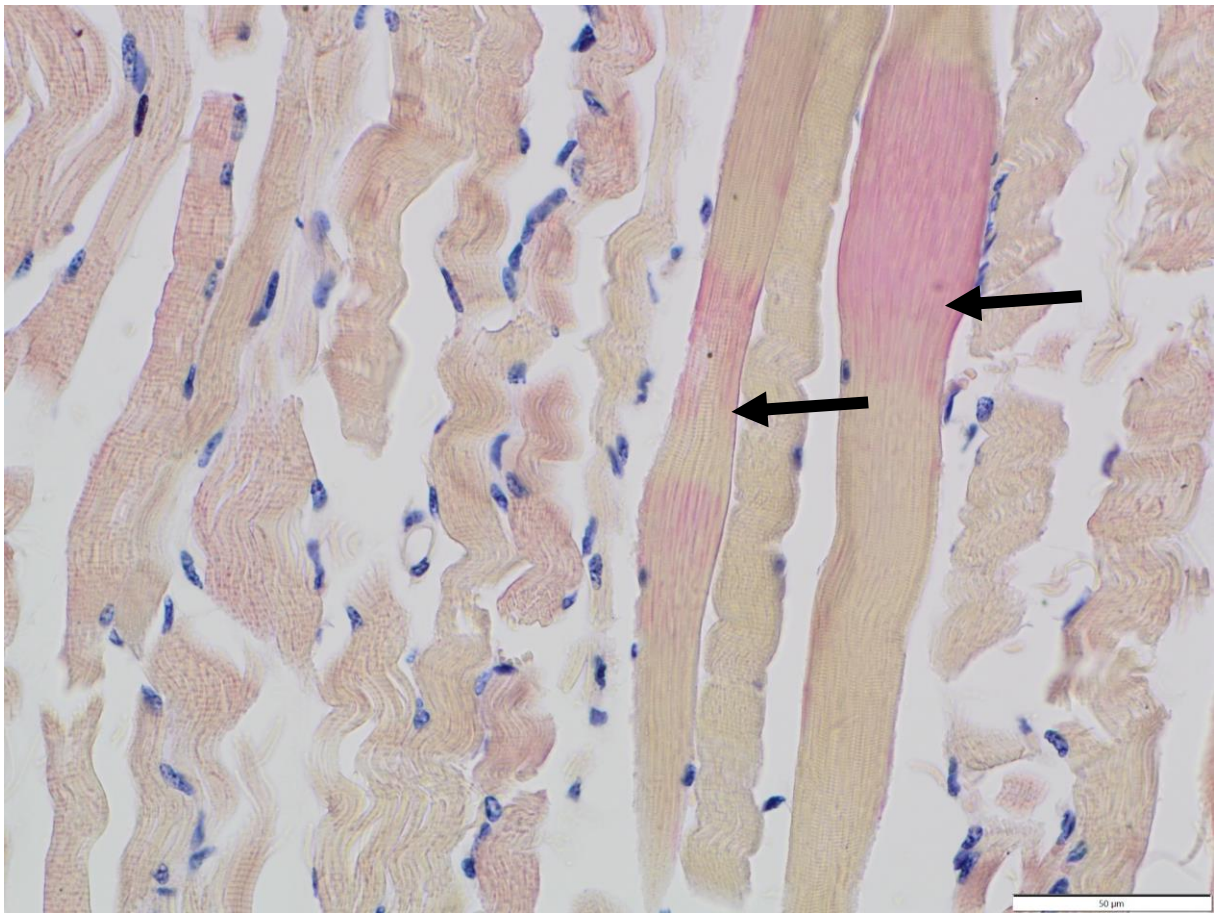
Fot. 3. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu *(m. longisimus dorsi)* u jagnięcia. Widoczne obszary odcinkowego szkliwienia z zanikiem poprzecznego prążkowania, w pojedynczych włóknach mięśniowych zaobserwowano także odcinkową martwicę włókien z rozpadem grudkowym sarkoplazmy i naciekiem makrofagów, limfocytów, pojedynczych eozynofilii (strzałka). Barwienie HE. Powiększenie 40x.



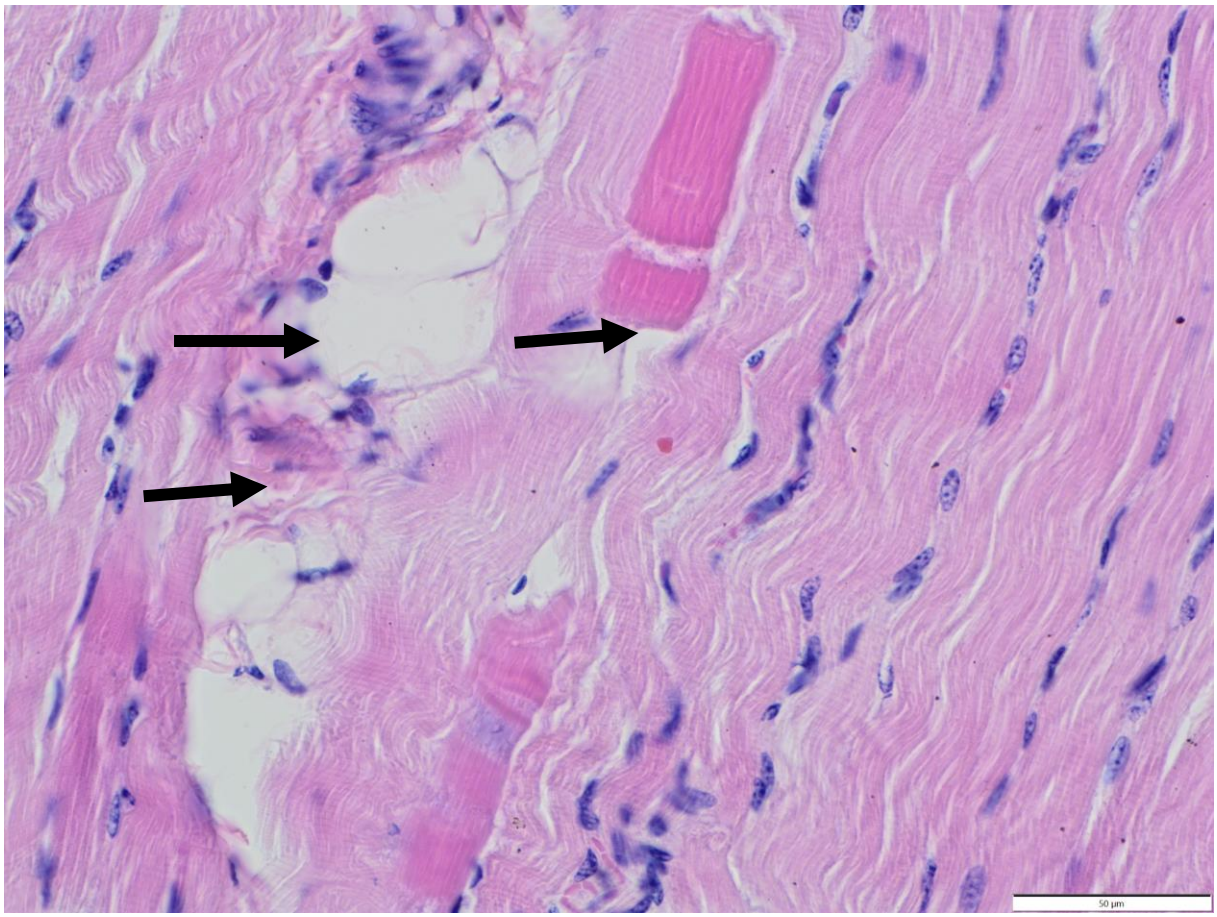
Fot. 4. Zmiany patologiczne w mięśniu dwugłowym uda *(m. biceps femoris*) u jagnięcia. Widoczne włókna mięśniowe z zanikiem poprzecznego prążkowania i szkliwieniem sarkoplazmy oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych. Barwienie HBFP. Powiększenie 60x.



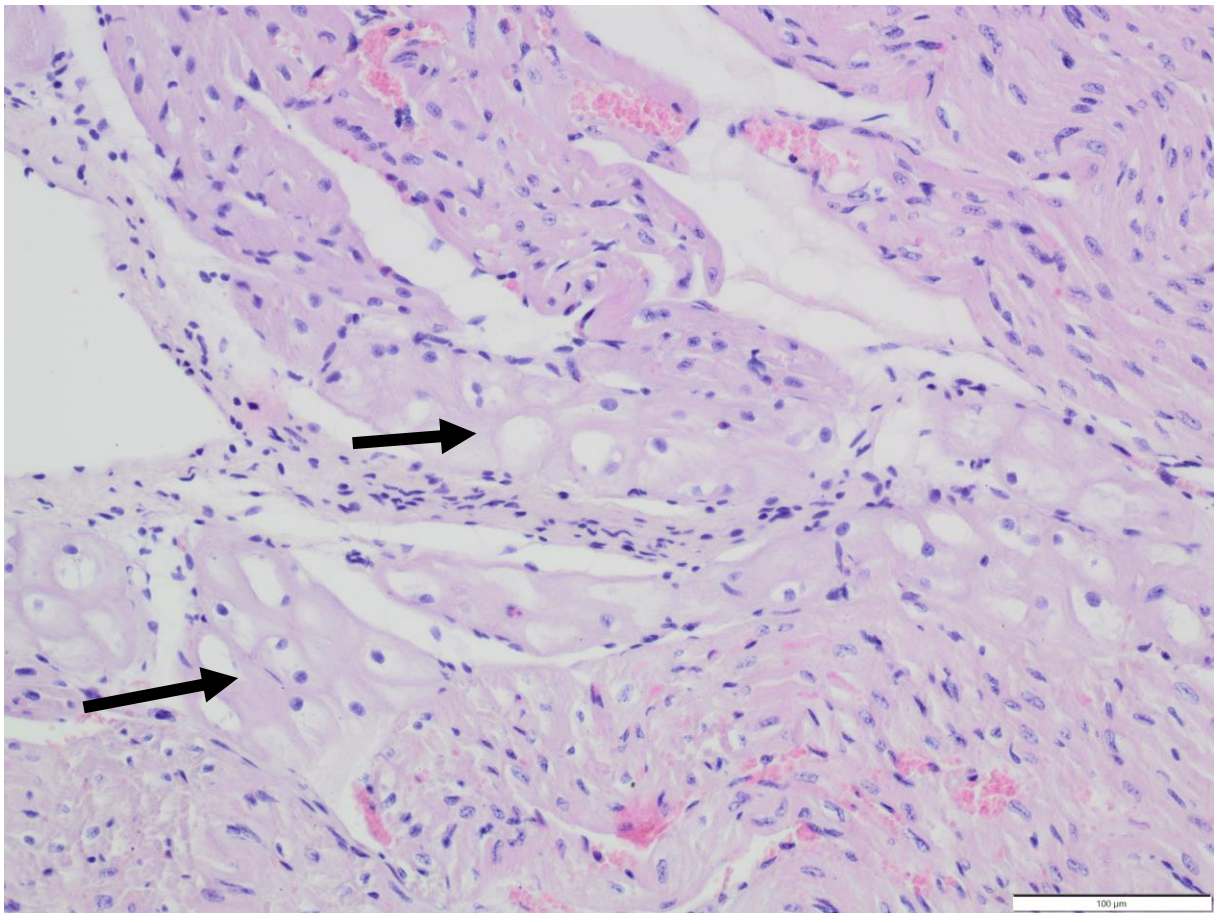
Fot. 5. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu *(m. longisimus dorsi)* u jagnięcia. Widoczne obszary odcinkowego szkliwienia z zanikiem poprzecznego prążkowania, w pojedynczych włóknach mięśniowych zaobserwowano także odcinkową martwicę włókien z rozpadem grudkowym sarkoplazmy i naciekiem makrofagów, limfocytów, pojedynczych eozynofilii (strzałka). Barwienie HBFP. Powiększenie 40x.



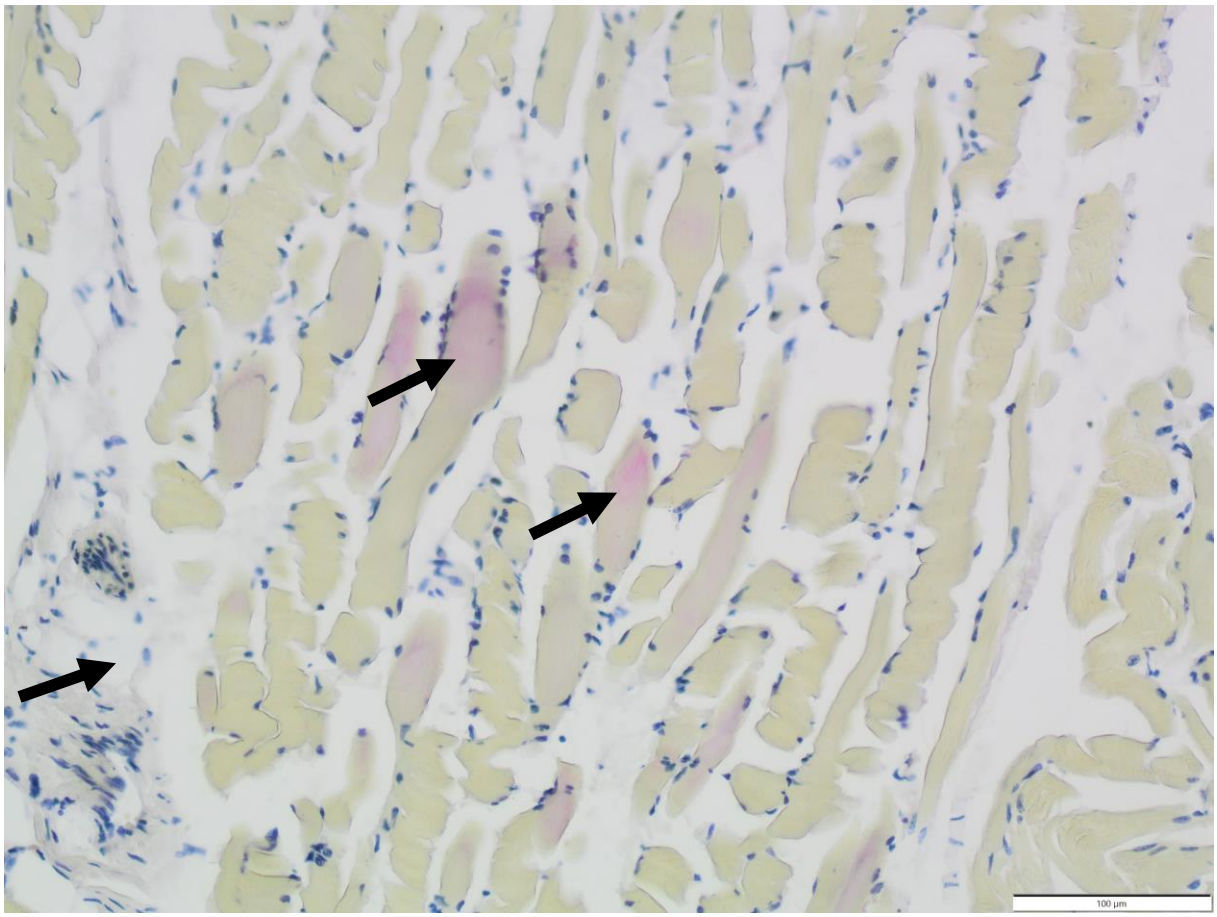
Fot. 6. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu (*m. longisimus dorsi*) u jagnięcia. Widoczne włókna mięśniowe z zanikiem poprzecznego prążkowania i szkliwieniem sarkoplazmy oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych (strzałka). Barwienie HBFP. Powiększenie 40x



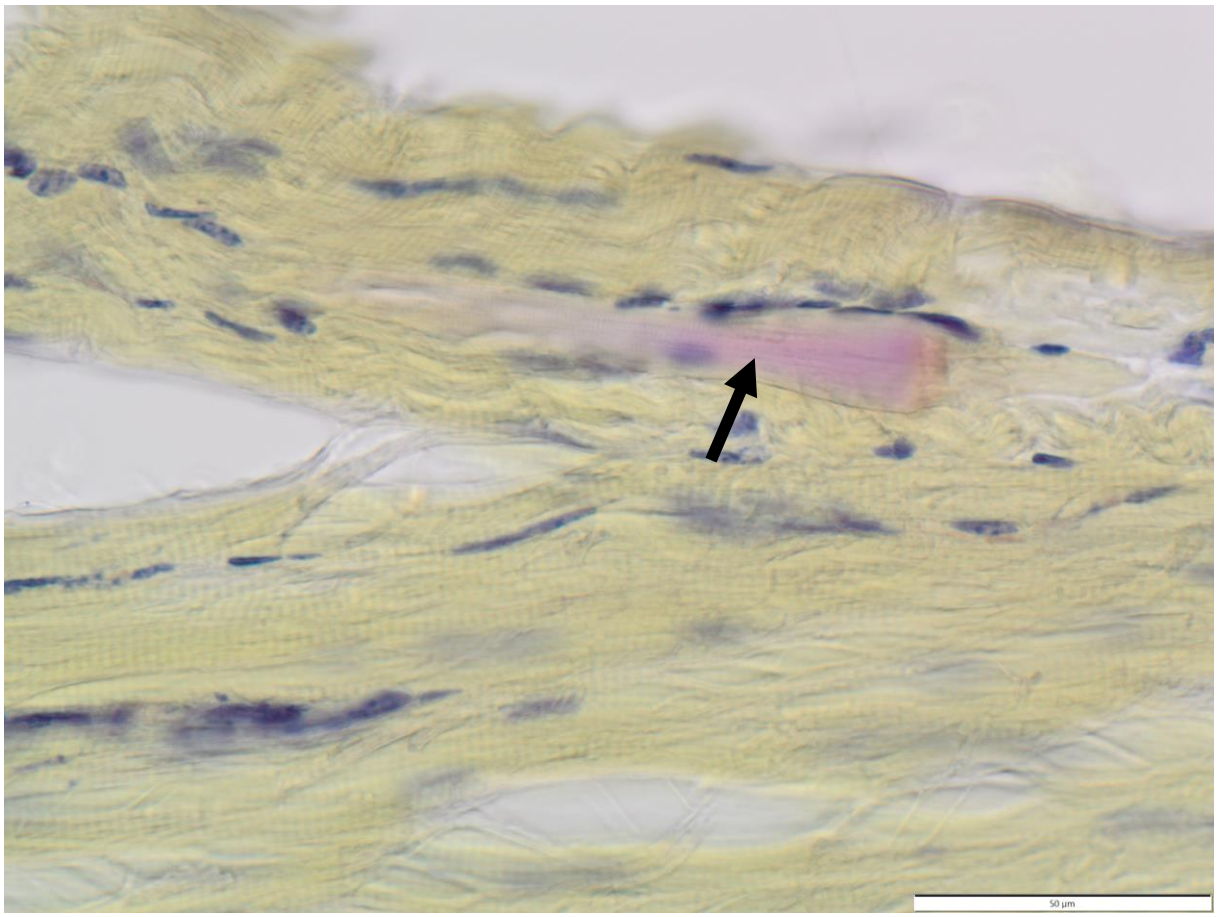
Fot. 7. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu (*m. longisimus dorsi*) u koźlęcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania (strzałka). Barwienie HE. Powiększenie 40x.



Fot. 8. Zmiany patologiczne w mięśniu dwugłowym uda (*m. biceps femoris*) u koźlęcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania (strzałka). Barwienie HE. Powiększenie 20x.



Fot. 9. Zmiany patologiczne w mięśniu najdłuższym grzbietu *(m. longisimus dorsi*) u koźlęcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania, rozległą martwicą całych włókien mięśniowych z rozpadem sarkoplazmy i zanikiem poprzecznego prążkowania oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych (strzałka). Barwienie HBFP. Powiększenie 20x.



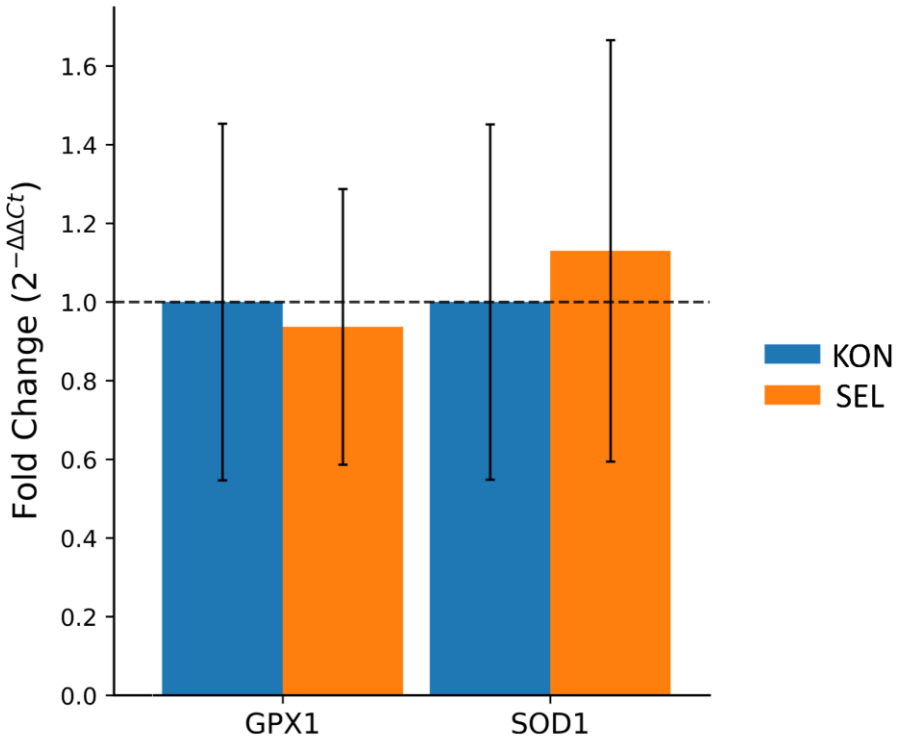
Fot. 10. Zmiany patologiczne w mięśniu dwugłowym uda (*m. biceps femoris*) u koźlęcia. Widoczne odcinkowe szkliwienie sarkoplazmy z zanikiem poprzecznego prążkowania, rozległą martwicą całych włókien mięśniowych z rozpadem sarkoplazmy i zanikiem poprzecznego prążkowania oraz obecnością pobudzonych komórek miogenicznych i komórek fagocytarnych (strzałka). Barwienie HBFP. Powiększenie 60x.

6.6 Wyniki badań genetycznych

6.6.1 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśniowej mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi*) u jagniąt.

W przypadku mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi*) u jagniąt nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genów *GPX1* i *SOD1*. W warunkach ekspozycji na selen w grupie doświadczalnej obserwowano niewielki wzrost aktywności ekspresji genu *SOD1* (p>0.1) oraz spadek ekspresji genu *GPX1* (p>0.1) w 30. dniu doświadczenia. (Rycina 14.)

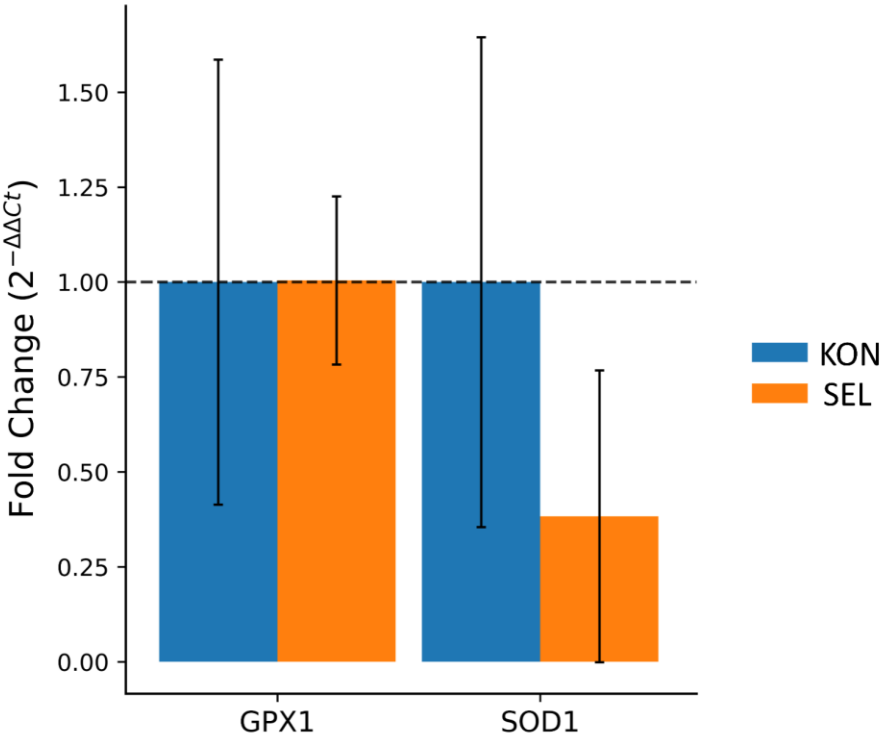
Rycina 14. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśniowej mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi*) u jagniąt.



6.6.2 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) u jagniąt.

W wyniku badań tkanek mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) u jagniąt nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1*. W grupie doświadczalnej jagniąt zaobserwowano niewielki spadek aktywności ekspresji genu *SOD1* ($p>0.1$) w 30 dniu doświadczenia. Aktywność ekspresji genu *GPX1* ($p>0.1$) była porównywalna z grupą kontrolną w 30. dniu doświadczenia (Rycina 15.).

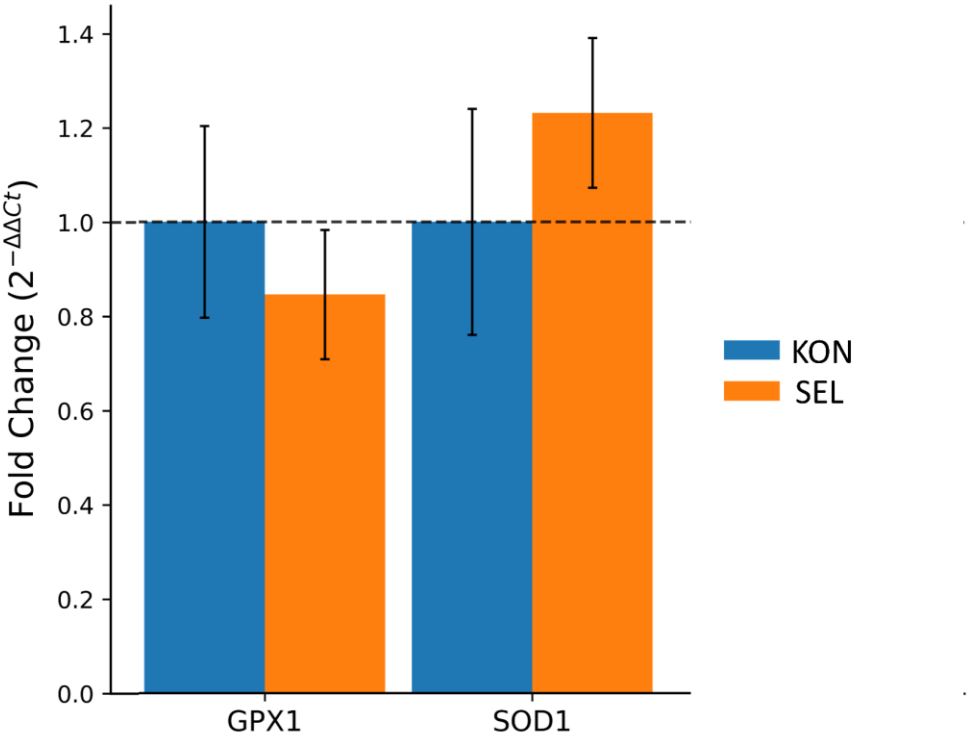
Rycina 15. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) u jagniąt.



6.6.3 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśniowej mięśnia sercowego u jagniąt

W przypadku mięśnia sercowego u jagniąt nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1*. W grupie doświadczalnej jagniąt zaobserwowano niewielki wzrost aktywności ekspresji genu *SOD1* (p>0.1) oraz spadek ekspresji genu *GPX1* (p>0.1) w 30. dniu doświadczenia. (Rycina 16.)

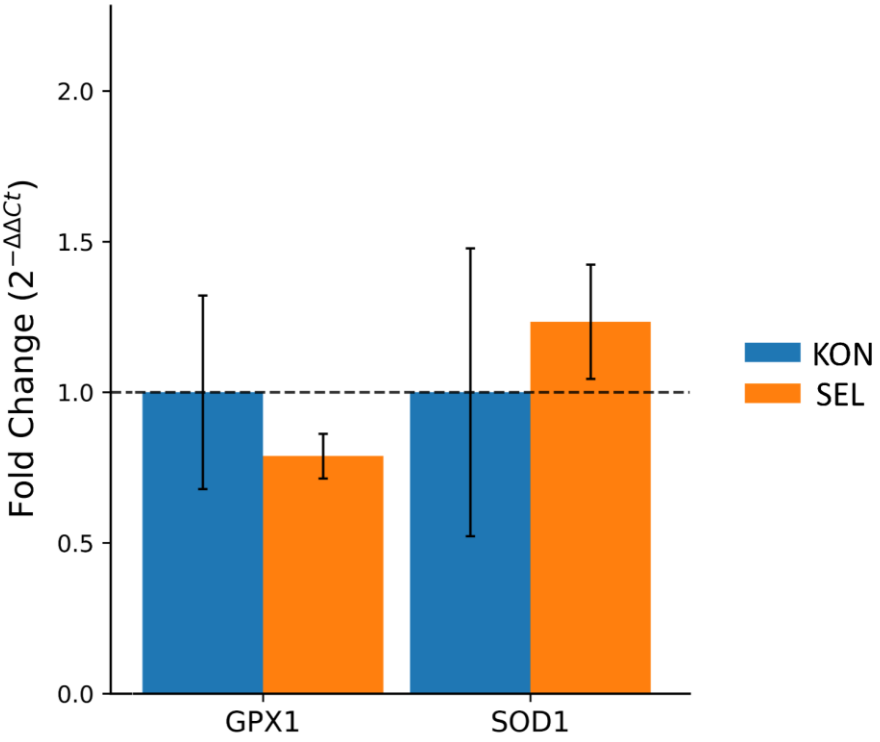
Rycina 16. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśniowej mięśnia sercowego u jagniąt.



6.6.4 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w wątrobie u jagniąt

W wątrobie u jagniąt suplementowanych seleninotriglicerydami nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1*. Po ekspozycji na selen u jagniąt zaobserwowano wzrost aktywności ekspresji genu *SOD1* (p>0.1) oraz spadek ekspresji genu *GPX1* (p>0.1) w 30. dniu doświadczenia. (Rycina 17.)

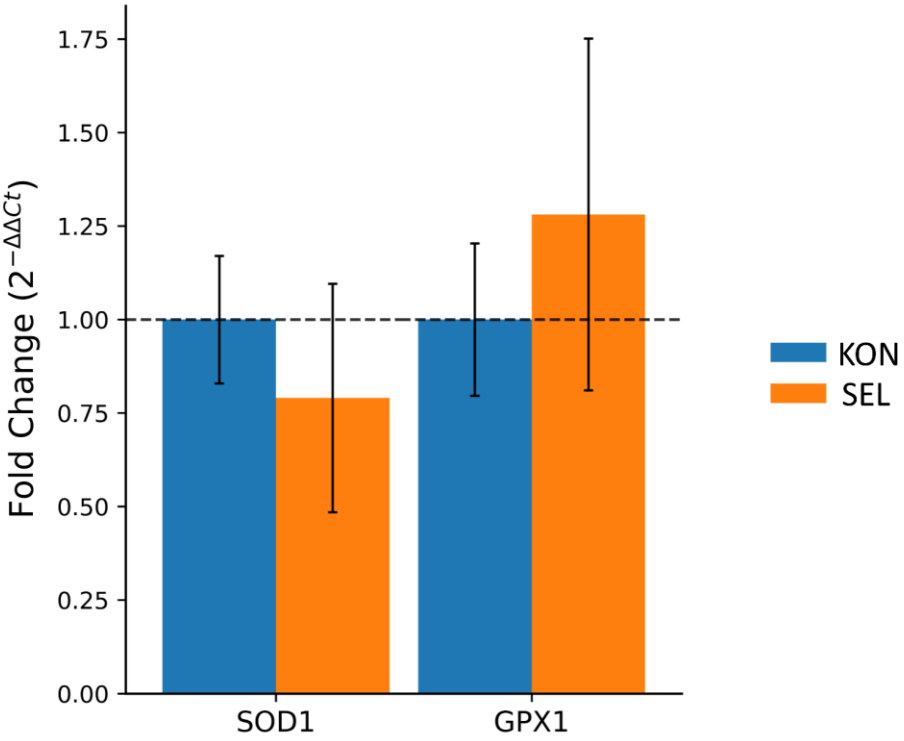
Rycina 17. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w wątrobie u jagniąt.



6.6.5 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) u koźląt.

W przypadku mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji w przypadku genu *GPX1*, jak i *SOD1*. U koźląt grupy doświadczalnej zaobserwowano niewielki spadek aktywności ekspresji genu *SOD1* ($p>0.1$) oraz wzrost ekspresji genu *GPX1* ($p>0.1$) w 30. dniu doświadczenia (Rycina 18.).

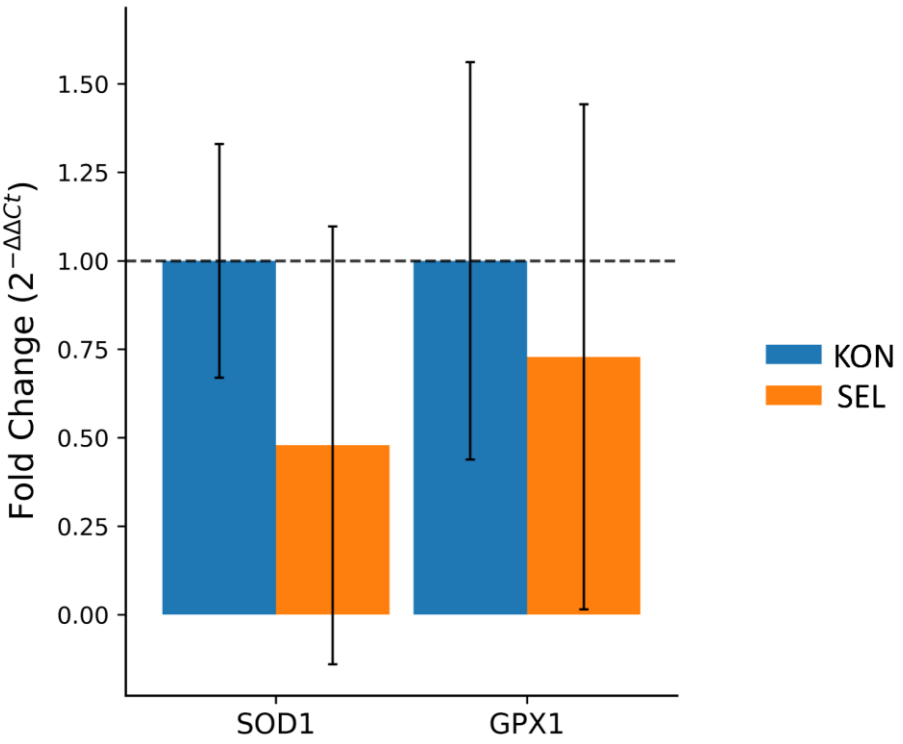
Rycina 18. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia dwugłowego uda (*m. biceps femoris*) u koźląt.



6.6.6 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia sercowego u koźląt.

W przypadku mięśnia sercowego u koźląt nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genu *GPX1* oraz *SOD1*. U koźląt grupy doświadczalnej zaobserwowano numeryczny spadek ekspresji genu *GPX1* oraz *SOD1* (p>0.1) w 30. dniu doświadczenia. (Rycina 19.)

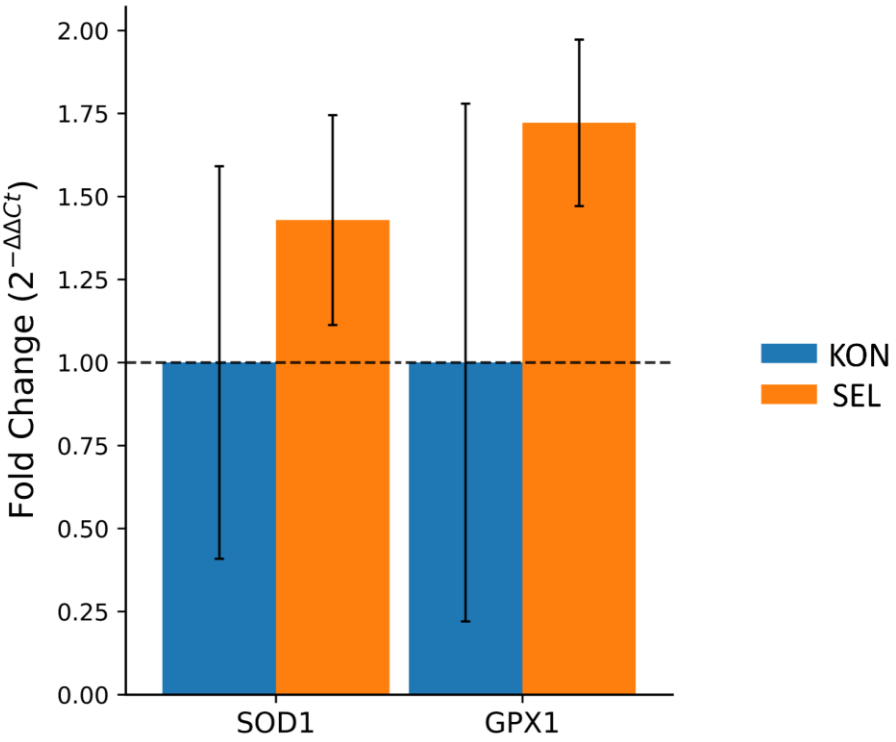
Rycina 19.Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w tkance mięśnia sercowego u koźląt.



6.6.7 Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w wątrobie u koźląt.

W wątrobie koźląt nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji genu *GPX1* oraz *SOD1*. W grupie doświadczalnej koźląt zaobserwowano niewielki wzrost ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* ($p>0.1$) w 30. dniu doświadczenia. (Rycina 20.)

Rycina 20. Wyniki badań ekspresji genów *GPX1* oraz *SOD1* w wątrobie u koźlęta.



7. Dyskusja

7.1. Wpływ seleninotriglicerydów na wskaźniki hematologiczne krwi

Badanie wykazało, że suplementacja seleninotriglicerydami nie wpływa znacząco na większość wskaźników morfologicznych krwi u koźląt i jagniąt. Wskaźnikiem, który był znacząco wyższy u grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną u jagniąt w 21. dniu doświadczenia był MCHC. W trakcie doświadczenia nie zauważono takich zmian w grupie eksperymentalnej koźląt. Podobny wzrost MCHC w swoim badaniu, ale w odróżnieniu od wyników opisywanych w niniejszej pracy, u koźląt, zaobserwowali Barcelos i in. (2022). Należy jednak podkreślić, że istotne zmiany wykazano jedynie w 21. dniu doświadczenia, natomiast w kolejnych pobraniach nie zaobserwowano wpływu seleninotriglicerydów na wskaźniki morfologiczne krwi u jagniąt.

Wskaźnikami wykazującymi istotne różnice ($p<0,05$) u koźląt była ogólna liczba limfocytów (#LYMPH), MCV, MCH, HDW, ale jedynie w 1 dniu doświadczenia. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że seleninotriglicerydy nie wpływają znacząco na produkcje komórek krwi u koźląt i jagniąt. Podobne wyniki uzyskała (Żarczyńska i in., 2021) u cieląt, gdzie jednokrotna suplementacja seleninotriglicerydami nie wpłynęła znacząco na liczbę erytrocytów, leukocytów czy płytek krwi. Fakt ten, potwierdzają wcześniejsze badania, które dowiodły, że suplementacja selenem w postaci nieorganicznej nie stymuluje procesów erytropoezy zachodzących w szpiku kostnym (Snarska i in., 2018). Suplementacja selenu nie miała także istotnego wpływu na erytrogram lub leukogram u cieląt (Bordignon i in., 2019), cieląt bawołów (Shinde i in., 2009a), jagniąt (Mohri i in., 2011) i kóz (Shi i in., 2018).

Uzyskane w opisywanych badaniach własnych wyniki są różne od otrzymanych w innych badaniach przeprowadzonych na koźlętach i jagniętach (Soliman, 2015, Barwary i in., 2016, Mohamed i in., 2017, Khalid i Jasim, 2019), gdzie suplementacja nieorganicznymi formami selenu miała istotny wpływ na wskaźniki morfologiczne krwi. Może być to związane z wiekiem, stanem fizjologicznym, poziomem Se w diecie badanych zwierząt lub różnicami w źródłach selenu wykorzystanych w wyżej wymienionych badaniach (Shi i in., 2018).

7.2. Wpływ seleninotriglicerydów na wskaźniki biochemiczne w surowicy.

W trakcie trwania doświadczenie nie zaobserwowano istotnych zmian dotyczących poziomu glukozy w surowicy. Podobne wyniki zaobserwowali inni autorzy (Domínguez-Vara i in., 2009, Abbas, 2002). Z kolei badania (Jablonska i in., 2016) przeprowadzone na szczurach wykazały, że selen może wpływać na procesy glikemiczne w organizmie tj. reakcję insulinową, glikolizę i metabolizm pirogronianu. Podobnie Ebrahimi i in. (2009), zaobserwowali istotny spadek poziomu glukozy u cieląt pojonych mlekiem z dodatkiem organicznej formy selenu. Wyżej wymienione doświadczenia nie odnosiły się jednak do badania wpływu suplementacji selenu w postaci seleninotriglicerydów.

W trakcie trwania eksperymentu zauważono brak wpływu prowadzonej suplementacji na poziom albumin i poziom białka całkowitego u jagniąt i koźląt. Podobne wyniki w przypadku suplementacji seleninotriglicerydami zaobserwowano na grupie badanych wielbłądów i cieląt (Zarczynska i in., 2020, Żarczyńska i in., 2021). Z drugiej strony badania wpływu selenu na poziom białka całkowitego i albumin w surowicy krwi u kóz wykazały, że selen może stymulować biosyntezę białek, a jego suplementacja powoduje wzrost poziomu białka całkowitego we krwi (Reczyńska i in., 2019). Podobnie spadek białka całkowitego w surowicy krwi cieląt z wrodzoną postacią pokarmowej dystrofii mięśni obserwował (Abutarbush i Radostits, 2003) czy (Gerloff, 1992) u bydła mlecznego. Badania przeprowadzone na owcach przez innych autorów (El-Shahat i Abdel Monem, 2011, Soliman i in., 2012) wykazały wzrost poziomu białka całkowitego w surowicy zwierząt suplementowanych selenem czego nie potwierdziły wyniki uzyskane przez Ziaei (2015). Z kolei w innych badaniach (Saba i in., 2019) wykazano, że różnice w stężeniu białka całkowitego zależą nie tylko od formy Se, ale także od rasy owiec. W cytowanym badaniu przeprowadzonym na owcach rasy Farafra stężenie białka ogólnego było istotnie wyższe w grupie otrzymującej organiczny Se niż w grupie kontrolnej, podczas gdy takiej zależności nie zaobserwowano u rasy Saidi, gdzie stężenie białka wzrastało w grupach otrzymujących obie formy selenu.

W badaniu wykazano również brak wpływu suplementacji seleninotriglicerydami na prawidłowe działanie nerek, o czym świadczy poziom mocznika i kreatyniny w surowicy badanych zwierząt. Zmian w stężeniach wymienionych enzymów nie zaobserwowano w pracach dotyczących wpływu selenitriglicerydów na organizm szczurów (Jastrzebski i in., 1995), cieląt (Żarczyńska i in., 2021) oraz wielbłądów (Zarczynska i in., 2020). Podobnie,

zmiany stężenia mocznika i kreatyniny nie były obserwowane przy zastosowaniu selenianu baru u jagniąt (Błażejak-Grabowska i in., 2022), a także selenianu sodu u koźląt (Sobiech i Żarczyńska, 2020) i cieląt (Mudgal i in., 2008, Shinde i in., 2009b).

Badanie wykazało istotnie niższą aktywność AST w grupie doświadczalnej jagniąt w 1. dniu doświadczenia. W 30.dniu doświadczenia wykazano istotnie wyższy wynik AST u koźląt suplementowanych seleninotriglicerydami. Wzrost średniej aktywności aminotranferazy asparaginianowej u kóz obserwowali m.in. Sobiech i Żarczyńska (2020). W badaniu tym wzrost aktywności tego wskaźnika tłumaczono występowaniem pokarmowej dystrofii mięśni u badanych przez nich zwierząt. Należy podkreślić, że aktywność AST może być ~~jest~~ wskaźnikiem toksyczności selenu. Dawka seleninotriglicerydów użyta w doświadczeniu dobrana została na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań (Jastrzebski i in., 1995, Zarczynska i in., 2020, Żarczyńska i in., 2021). Należy podkreślić, że dotychczas nie badano wpływu seleninotriglicerydów na wskaźniki biochemiczne krwi koźląt. W związku z występującą podwyższoną aktywnością AST u badanej grupy doświadczalnej koźląt w 30 dniu, słuszne wydaje się być przeprowadzenie kolejnych badań dotyczących suplementacji seleninotriglicerydów w dawce mniejszej niż zastosowana w niniejszym eksperymencie. Jednocześnie należy podkreślić, że dotychczas przeprowadzone doświadczenia dotyczące suplementacji selenitriglicerydami u zwierząt nie udowodniły wpływu badanego suplementu diety na parametry wątrobowe w surowicy zwierząt (Żarczyńska i in., 2021, Zarczynska i in., 2020).

W przypadku badanych koźląt zaobserwowano wyższą aktywność GGT w grupie kontrolnej w 7., 21. i 30. dniu doświadczenia. Enzym ten znajduje się m.in w hepatocytach, nerkach oraz trzustce (Pratt i Kaplan, 2000). GGT może stanowić ważny wskaźnik dotyczący zmian w wątrobie, ponieważ najwyższą jego aktywność u kóz obserwujemy właśnie w tym narządzie (Dufour i in., 2000). Należy jednak podkreślić, że inne wskaźniki oceniające stan wątroby u koźląt grupy kontrolnej, nie świadczyły o zaburzeniach przebiegających w obrębie tego narządu.

Kolejnym enzymem analizowanym w niniejszym badaniu własnym jest fostataza alkaliczna.. W przypadku przeżuwaczy pochodzi ona głównie z wątroby i nerek (Doornenbal i in., 1988). Opisany w niniejszej pracy doktorskiej brak wpływu seleninotriglicerydów na aktywność ALP w surowicy może świadczyć o tym, że badana substancja nie powoduje zaburzeń funkcjonowania wątroby u małych przeżuwaczy.

W trakcie badań własnych nie wykazano wpływu suplementacji seleninotriglicerydami na aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) zarówno u badanych owiec jak i kóz. Podobne wyniki otrzymali Żarczynska i in. (2020) u wielbłądów. Podwyższoną aktywność LDH często obserwuje się w przypadkach klinicznych pokarmowej dystrofii mięśni (Andrés i in., 1997, Kozat, 2007). Należy jednak pamiętać, że odstępstwa od normy fizjologicznej tego enzymu, mogą występować także w przypadku wystąpienia chorób wątroby, nerek, układu szkieletowego czy w dysfunkcjach trawiennych (Klein i in., 2020).

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że seleninotriglicerydy nie działają negatywnie na funkcjonowanie wątroby, nerek, płuc, serca czy mięśni jagniąt i koźląt. Preparat ten jest więc bezpieczną formą suplementacji selenu u wymienionych małych przeżuwaczy.

7.3. Wpływ seleninotriglicerydów na poziom selenu w surowicy krwi

Badania własne wykazały, że suplementacja jagniąt rasy kamienieckiej jak i koźląt rasy alpejskiej roztworem seleninotriglicerydów w postaci doustnej, powoduje istotny wzrost stężenia Se w surowicy tych zwierząt. Potwierdza to hipotezę, że forma selenu użyta w doświadczeniu cechuje się wysoką biodostępnością w przypadku podania *per os* u młodych małych przeżuwaczy. Dotychczas przeprowadzone doświadczenia na szczurach, cielętach i wielbłądach, również potwierdzają to założenie (Sochacka i in., 2014, Jastrzebski i in., 1997, Jastrzebski i in., 1995, Żarczyńska i in., 2021 Zarczynska i in., 2020). Należy podkreślić, że wysoki poziom selenu utrzymywał się w obu grupach doświadczalnych przez cały okres trwania eksperymentu i był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto grupy kontrolne zarówno jagniąt, jak i koźląt cechowały się niskim poziomem selenu w surowicy, który mógł świadczyć o podklinicznym niedoborze tego pierwiastka (Ammerman i Miller, 1975, Sobiech i Żarczyńska, 2020).

W grupie doświadczalnej koźląt w 1, 14, 21 i 30 dniu doświadczenia poziom selenu był istotnie wyższy ($p<0,05$) i mieścił się on w granicach fizjologicznej normy dla tego pierwiastka (Pugh, 2002). Co ciekawe w 7 dniu doświadczenia zaobserwowano gwałtowny wzrost stężenia selenu, który był wyższy niż fizjologiczna norma dla tego gatunku (Pugh, 2002). Nie obserwowano jednak żadnych objawów klinicznych zatrucia selenem (Ahmed i in., 1990), ponadto w surowicy nie zaobserwowano istotnych różnic w przypadku aktywności enzymów wątrobowych, informujących o stanie wątroby i ewentualnym zatruciu między grupą kontrolną i badaną. Podobny wzrost stężenia selenu w surowicy wielbłądów w 7 dniu doświadczenia,

wykraczający poza fizjologiczne normy obserwowali Żarczyńska i in.(2020).

W przypadku jagniąt, poziom selenu w grupie suplementowanej był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Surowicze stężenie tego pierwiastka wykraczało poza przyjęte do tej pory fizjologiczne normy u owiec (Błażejak-Grabowska i in.,2022), od momentu suplementacji aż do 21. dnia eksperymentu. Podobnie jak u koźląt nie wiązało się to jednak z pojawieniem żadnych symptomów świadczących o podklinicznej lub klinicznej selenozie (Blodgett i Bevill, 1987, Smyth i in., 1990).

Należy podkreślić, że dawka seleninotriglicerydów, podawana jagniętom i koźlętom, została dobrana na podstawie dotychczasowych badań (Jastrzebski i in., 1995, Jastrzebski i in., 1997, Sochacka i in., 2014, Żarczyńska i in., 2021, Żarczyńska i in., 2021). Słuszne wydaje się więc przeprowadzenie dalszych badań w celu określenia toksyczności badanej dawki preparatu selenowego oraz ewentualnej jej modyfikacji.

7.4. Wpływ seleninotriglicerydów na aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej

Pomiar aktywności peroksydazy glutationowej wykorzystywany jest w celu wykrywania i monitorowania przypadków niedoboru selenu, a co za tym idzie między innymi pokarmowej dystrofii mięśni zarówno u kóz (Bickhardt i in., 1999, Ramírez-Bribiesca i in., 2001, Song i in., 2015, Sobiech i Żarczyńska, 2020), owiec (Thompson i in., 1976, Ramírez-Bribiesca i in., 2001, Milad i in., 2001, Pavlata i in., 2012), jak i u bydła (Hoshino i in., 1989, Żarczyńska i in., 2018a, Żarczyńska i in., 2018b, Żarczyńska i in., 2021) czy koni (Higuchi i in., 1989, Katz i in., 2009). Większość z wymienionych autorów zwraca uwagę na ujemną korelację pomiędzy spadkiem aktywności peroksydazy glutationowej a narastaniem objawów dystrofii mięśni, przy jednoczesnym obniżonym stężeniu selenu w surowicy.

Badania koźląt grupy doświadczalnej wykazały stały wzrost aktywności peroksydazy glutationowej w trakcie trwania eksperymentu. Wyniki te korespondują z danymi uzyskanymi przez innych autorów (Shi i in., 2011), którzy zauważyli istotny wzrost aktywności GPX po suplementacji koźląt selenianem sodu, drożdżami wzbogaconymi w selen, a także preparatami zawierającymi w swoim składzie nanoselen. W cytowanym badaniu wzrost aktywności peroksydazy glutationowej obserwowano po 90 dniach. Uzyskane w badaniu własnym wyniki aktywności peroksydazy glutationowej w przypadku jagniąt cechowały się istotną różnicą w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki innych badań również wykazały istotnie wyższą aktywność peroksydazy glutationowej w przypadku suplementacji selenianem sodu i

drożdżami wzbogaconymi w selen u jagniąt (Bai i in., 2022) i dorosłych owiec (Čobanová i in., 2017). Należy podkreślić, że w dostępnej literaturze brak jest badań dotyczących wpływu selenitriglicerydów na aktywność peroksydazy glutationowej u jagniąt i koźląt.

Analizując korelację między stężeniem Se w surowicy a aktywnością peroksydazy u koźląt i jagniąt grupy suplementowanej, zauważono dalszy wzrost aktywności GPX, mimo obniżenia się stężenia tego biopierwiastka. Dane te potwierdzają wnioski wyciągnięte przez innych badaczy (Osame i in., 1990, Yaghmaie i in., 2017, Pavlata i in., 2000, Sobiech i Żarczyńska, 2020), że wzrost aktywności peroksydazy jest związany ze wzrostem stężenia Se w surowicy tylko do osiągnięcia przez organizm stanu wysycenia tym pierwiastkiem.

Osiągnięta pod koniec eksperymentu u koźląt i jagniąt grupy doświadczalnej aktywność peroksydazy glutationowej wynosząca odpowiednio: 263,28± 41,45 IU/gHb i 299,59± 44,7 IU/gHb była dosyć wysoka i może świadczyć o dużej biodostępności badanego pierwiastka.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) była istotnie wyższa u koźląt i jagniąt grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne wyniki uzyskano w przypadku suplementacji koźląt innymi preparatami selenowymi, tj. nano- selenem, drożdżami wzbogaconymi selenem oraz selenianem sodu, przy czym najwyższy poziom aktywności tego enzymu obserwowano w przypadku suplementów zawierających nano-selen (Shi i in., 2011, Zhan i in., 2007). Dotychczas nie przeprowadzono takich badań w przypadku seleninotriglicerydów.

7.5. Badania histopatologiczne

Badania własne wykazały zmiany charakterystyczne dla pokarmowej dystrofii mięśni u większości koźląt i jagniąt grup kontrolnych. Należy jednak podkreślić, że ze względu na brak objawów klinicznych oraz istotnych zmian aktywności enzymów związanych z tkanką mięśniową (AST i LDH) zmiany te wskazują na nieznaczne zaburzenia o charakterze podklinicznym. Badane próbki mięśni grupy kontrolnej charakteryzowały się występowaniem m.in. włókien o jednorodnej, szklistej sarkoplazmie. Podobne zmiany w mięśniach u przeżuwaczy były opisane przez licznych autorów, m.in. (Beytut i Karatas, 2002, Hafner i in., 1996). W badaniach własnych u zwierząt grup kontrolnych stwierdzono obecność komórek miogenicznych, procesy łączenia się w miotuby oraz powstawanie młodych włókien mięśniowych. Według niektórych autorów (Beytut i Karatas, 2002, Gore i in., 1990) zarówno procesy martwicowe, jak i regeneracyjne, są charakterystyczne dla pokarmowej dystrofii mięśni. Zmianom wstecznym w mięśniach towarzyszą procesy regeneracji rozpoczynające się

bardzo szybko po uszkodzeniu włókien. Badania (Hafner i in., 1996, Mikaelian i in., 1996) wykazały, że regeneracja włókien mięśniowych może następować już po 1–2 dniu od uszkodzenia. Zmiany obrazu histopatologicznego tkanek następują więc dość szybko po usunięciu przyczyny patognomicznej występowania pokarmowej dystrofii mięśni, jaką jest niedobór selenu. Można więc wnioskować, że brak charakterystycznych zmian w tkankach mięśniowych kóz i owiec w grupach doświadczalnych, świadczy o tym, że seleninotriglicerydy mogą zapobiegać występowaniu PDM u jagniąt i koźląt.

7.6. Ekspresja wybranych genów biorący udział w procesach antyoksydacyjnych

W przeprowadzonym badaniu własnym wykazano brak istotnych różnic statystycznych w przypadku ekspresji genów *GPX1* i *SOD1*. Należy podkreślić, że opisywane badania są pierwszą próbą określenia wpływu seleninotriglicerydów na ekspresję wymienionych genów, zarówno w przypadku kóz jak i owiec.

GPX1 jest jednym z kluczowych enzymów należących do grupy peroksydaz (Lei i in., 1995). Ma działanie antyoksydacyjne, a glutation wchodzący w skład wyżej wymienionego enzymu stanowi kofaktor w procesach redukcji nadtlenków do alkoholi (Modrick i in., 2009). Ponadto badania dowiodły, że u myszy genetycznie pozbawionych genu *GPX1* (*GPx-1*−/−) wzrasta produkcja mitochodrialnego reaktywnego tlenu (ROS), co może powodować uszkodzenia DNA, a także uszkodzenia tkanek z powodu ich niedokrwienia. (Thu i in., 2010). Co więcej, aktywność ekspresji genu *GPX1* jest silnie powiązana z niedoborami selenu (Schomburg i Schweizer, 2009).

Gen kodujący *GPX1* obserwowany jest w wielu tkankach tj. mięśnie, wątroba, nerki czy gruczoły endokrynne. Ponadto, Zhang i in. (2011) donieśli, że poziom ekspresji mRNA genu *GPX1* u kóz, jest różna w zależności od rodzaju tkanki. Najwyższy jej poziom notowano w wątrobie, następnie w płucach, sercu, śledzionie, nerkach i mięśniu najdłuższym grzbietu, co potwierdziło wcześniejsze badania Lei i in. (1995) oraz Evenson i in. (2004).

Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że aktywność ekspresji genu *GPX1* była znacząco wyższa w przypadku podaży selenu (Jiang i in., 2012). Porównanie aktywności ekspresji genu *GPX1* u kóz wypasanych na obszarach bogatych w selen, z grupą kóz wypasaną na glebach ubogich w ten pierwiastek (Zhang, Zhou i in., 2013), udowodniły, że aktywność *GPX1* jest wyższa w przypadku skarmiania paszą z wyższą zawartością Se. Podobnie wyższą aktywność *GPX1* w badaniach *in vitro* zaobserwowali Abo El-Magd i in. (2022). Wykazali oni,

że dodatek selenianu sodu do hodowli komórkowej adipocytów wpływa na zwiększoną aktywność genu *GPX1*, w porównaniu do linii komórkowych bez dodatku selenianu sodu. Autorzy tłumaczyli ten fakt udziałem *GPX1* w procesach związanych ze stresem oksydacyjnym w badanych komórkach tkanki tłuszczowej. Badania prowadzone na grupie owiec wykazały wyższą aktywność genu *GPX1* w przypadku zwierząt skarmianych paszą z dodatkiem selenianu sodu (Humann-Ziehank i in., 2013). Należy podkreślić, że w tym przypadku zwierzęta były suplementowane przez okres 750 dni i był to czas, w którym mogło dojść do uzupełnienia niedoborów selenu w organizmie. Podobne wyniki badań uzyskali Juszczuk-Kubiak i in. (2016). Wykazali oni istotny wzrost aktywności ekspresji genu *GPX1* w wątrobie i mięśniach jagniąt suplementowanych selenianem sodu przez okres 8 tygodni.

Z drugiej strony, część doniesień opisuje spadek poziomu ekspresji genu *GPX1* w przypadku suplementacji selenem. Przykładem mogą być tu badania przeprowadzone na komórkach endometrium bydła mlecznego, które wykazały spadek poziomu ekspresji genu *GPX1* w przypadku podaży selenometioniny (Adeniran i in., 2022). Według autorów, ma to związek z faktem, że *GPX1* jest stosunkowo nisko w hierarchii dostępności selenu, występującej w przypadku selenoprotein (Mariotti i in., 2012). Ponadto Zhou i in. (2009) zaobserwowali, że poziom mRNA innej selenoproteiny - *GPX2* w przysadce prosiąt był wyższy u zwierząt skarmianych paszą z dodatkiem selenianu sodu w dawce 0,3 mg Se/kg, niż u prosiąt suplementowanych wyższą dawką selenu (3,0 mg Se/kg). Podobnie badania przeprowadzone na myszach u których dietę wzbogacono odpowiednio w 0,045 mg Se/kg, 0.1 mg Se/kg, 0.4 mg Se/kg i 0.8 mg Se/kg wykazały, że dawka selenu 0,8 mg Se/ kg spowodowała spadek poziomu mRNA w wątrobie (Zhang i in., 2013). Możliwe, że jest to konsekwencja wyższej toksyczności selenianu sodu w przypadku jego wysokiego stężenia w paszy (Zhang i in., 2013).

Enzymem biorącym udział w procesach antyoksydacyjnych jest również dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). W ich wyniku w organizmie powstają aktywne formy tlenu (ROS), które następnie metabolizowane są przez wyżej wymieniony enzym do H_2O_2. Następnie nowo powstały nadtlenek wodoru redukowany jest do $H_2O + O_2$, z udziałem GPX. (Trachootham i in., 2009, Peng i in.., 2019). Wiele badań donosi, że dodatek selenu do diety może zwiększać ekspresję *SOD1* (Chen i in., 2017, Khan i in., 2018, Mengistu i in., 2021).

Badania *in vitro* przeprowadzone na komórkach epithelium gruczołu mlekowego kóz w trakcie stresu cieplnego wykazały, że dodatek selenu powoduje wzrost ekspresji genu *SOD1* (Liu i in., 2021). Podobnie wyniki badań (Ibrahim i in., 2019) przeprowadzonych na brojlerach kurzych, suplementowanych selenem w postaci siarczku selenu, selenometioniny i nanoselenu, w różnych stężeniach dowiodły, że dawka 0,6 mg/kg selenometioniny i nanoselenu powoduje

wyższy poziom ekspresji mRNA *GPX1* jak i *SOD1*. Zwiększony poziom aktywności genu *SOD1* obserwował także Zhang i in. (2018) u szczurów suplementowanych selenem, u których zastosowano wysokotłuszczową dietę.

W badaniu własnym zaobserwowano niższą aktywność ekspresji genów *GPX1* i *SOD1*, w przypadku tkanki mięśnia sercowego jagniąt i koźląt oraz mięśnia dwugłowego uda jagniąt w grupach suplementowanych selenem. Należy jednak podkreślić, że różnica ta nie była istotna statystycznie. Podobne wyniki uzyskali Gholam i in. (2012), którzy badali wpływ selenu na ekspresję genu kodującego transferrynę u owiec. Autorzy zauważyli, że poziom mRNA wyżej wymienionego genu u zwierząt suplementowanych selenianem sodu przez 10 dni, wzrasta do ostatniego dnia suplementacji, po czym poziom ten znacząco spada ($p < 0.05$).

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazujące na brak istotnego wpływu suplementacji seleninotriglicerydami na poziom ekspresji genów GPX1 i SOD1 wynika prawdopodobnie z dosyć krótkiego, bo tylko 7 – dniowego okresu ich podawania i tym samym braku możliwości wpływu na aktywację mechanizmów molekularnych w 30. dniu doświadczenia. Należałoby podjąć dalsze badania mogące wyjaśnić te zależności z użyciem liczniejszych grup zwierzęcych i uwzględnieniem różnych okresów suplementacji.

8. Wnioski

Wyniki badań nad wpływem seleninotriglicerydów na status zdrowotny i ekspresję genów GPX1 i SOD1 u jagniąt i koźląt upoważniają do sformułowania następujących wniosków:

1. Seleninotriglicerydy nie wpływają negatywnie na wyniki badań morfologicznych i biochemicznych krwi jagniąt i koźląt, a co za tym idzie mogą być wykorzystywane jako bezpieczny środek uzupełniający selen w ich organizmach.
2. Seleninotriglicerydy powodują znaczący wzrost stężenia selenu w organizmie małych przeżuwaczy, co świadczy o jego wysokiej biodostępności w organizmie.
3. Aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej, osiąga wyższy poziom po ekspozycji na badany preparat. Co może świadczyć o wzmożonych procesach antyoksydacyjnych.
4. Seleninotriglicerydy mogą być wykorzystywane w celu zapobiegania pokarmowej dystrofii mięśni u młodych małych przeżuwaczy. Potwierdza to brak zmian w obrazie histopatologicznym tkanek, charakterystycznych dla podklinicznej formy PDM, u zwierząt suplementowanych tą formą selenu.
5. Suplementacja seleninotriglicerydami nie wpłynęła znacząco na ekspresję genów GPX1 i SOD1.

9. Piśmiennictwo

Abbas, S. F. 2002. Effect of vitamin E and selenium injection on lamb viability, growth performance and some blood serum constituents in Saidi lambs. *Assiut Vet Med J* , 47, 129-136.

Abo El-Magd, N., Barbosa, P.O., Nick, J., Covalero, V.,Grignetti, G., Bermano, G. 2022. Selenium, as selenite, prevents adipogenesis by modulating selenoproteins gene expression and oxidative stress–related genes. *Nutrition,* 93,11424.

Abutarbush, S. M. , Radostits, O. M. 2003. Congenital nutritional muscular dystrophy in a beef calf. *Can Vet J*, 44, 738-9.

Adeniran, S. O., Zheng, P., Feng, R., Adegoke, E. O., Huang, F., Ma, M., Wang, Z., Ifarajimi, O. O., Li, X. , Zhang, G. 2022. The Antioxidant Role of Selenium via GPx1 and GPx4 in LPS-Induced Oxidative Stress in Bovine Endometrial Cells. Biol Trace Elem Res., 200, 1140-1155.

Ahmed, K. E., Adam, S. E., Idrill, O. F. , Wahbi, A. A. 1990. Experimental selenium poisoning in Nubian goats. *Vet Hum Toxicol,* 32, 249-51.

Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M.H.I.Z. 2014. Role of selenium in male reproduction-A review. *Anim Reprod Sci*, 146 , 55-62,

Akyol, T., Bulucu, F., Sener, O., Yamanel, L., Aydin, A., Inal, V., Bozoglu, E., Demirkaya, E., Eken, A. , Musabak, U. 2007. Functions and oxidative stress status of leukocytes in patients with nephrotic syndrome. *Biol Trace Elem Res*, 116, 237-48.

Al-Rufaie, H. K., Florio, R. A. , Olsen, E. G. 1983. Comparison of the haematoxylin basic fuchsin picric acid method and the fluorescence of haematoxylin and eosin stained sections for the identification of early myocardial infarction. *J Clin Pathol,* 36, 646-9.

Alaejos, M. S., Díaz Romero, F. J., Díaz Romero, C. 2000. Selenium and cancer: some nutritional aspects. *Nutrition,* 16, 376-83.

Aleman, M. 2008. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscul Disord,* 18, 277-87.

Bin Talib Ali, A., Bomboi, G., Floris, B. 2010. Does Vitamin E or Vitamin E plus Selenium improve reproductive performance of rams during hot weather? *Ital J Anim Sci*, 8, 743-754.

Ali-Vehmas, T., Vikerpuur, M., Fang, W., Sandholm, M. 1997. Giving selenium supplements to dairy cows strengthens the inflammatory response to intramammary infection and

induces a growth-suppressing effect on mastitis pathogens in whey. *Zentralbl Veterinarmed* A, 44, 559–571.

Ammerman, C. B. , Miller, S. M. 1975. Selenium in Ruminant Nutrition: A Review 1. *J Dairy S,* 58, 1561-1577.

Andrés, S., Mañé, M. C., Sánchez, J., Barrera, R. , Jiménez, A. 1997. Changes in GSHPx and muscle enzyme activities in lambs with nutritional myodegeneration following a single treatment with sodium selenite. *Small Rumin Res,* 23, 183-186.

Arnér, E. S. , Holmgren, A. 2006. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol,* 16, 420-6.

Arshad, M. A., Ebeid, H. M. , Hassan, F. U. 2021. Revisiting the Effects of Different Dietary Sources of Selenium on the Health and Performance of Dairy Animals: a Review. *Biol Trace Elem Res,* 199, 3319-3337.

Arthur, J. R., McKenzie, R. C. , Beckett, G. J. 2003. Selenium in the immune system. *J Nutr,* 133, 1457s-9s.

Arthur, J. R., Nicol, F. , Beckett, G. J. 1992. The role of selenium in thyroid hormone metabolism and effects of selenium deficiency on thyroid hormone and iodine metabolism. *Biol Trace Elem Res,* 33, 37-42.

Avery, J. C. , Hoffmann, P. R. 2018. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients,* 10.

Badade, Z.G., More, K., Narshetty, J. 2011. Oxidative stress adversely affects spermatogenesis in male infertility. *Biomed Res,* 22, 323–328.

Bai, X., Li, F., Li, F. , Guo, L. 2022. Different dietary sources of selenium alter meat quality, shelf life, selenium deposition, and antioxidant status in Hu lambs. *Meat Sci,* 194, 108961.

Barcelos, B., Gomes, V., Vidal, A. M. C., de Freitas Júnior, J. E., de Araújo, M., Alba, H. D. R. , Netto, A. S. 2022. Effect of selenium and vitamin E supplementation on the metabolic status of dairy goats and respective goat kids in the peripartum period. *Trop Anim Health Prod,* 54, 36.

Barceloux, D. G. 1999. Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol,* 37, 145-72.

Barwary, M., Alkass, J. , Ahmed, S. 2016. Studies on the effect of selenium and vitamin E on some haematological and biochemical parameters in female Meriz Goats. *JUD,* 19, 210-215.

Beckendorf, L. , Linke, W. A. 2015. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *J Muscle Res Cell Motil,* 36, 25-36.

Bednarek D., Bik D. 1994b. Wpływ selenu na zdrowie zwierząt. Część II. Życie Wet, 7, 269-272.

Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R. , Hesketh, J. E. 1995. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J,* 311 (Pt 2), 425-30.

Beytut, E. , Karatas, F. 2002. Lambs with white muscle disease and selenium content of soil and meadow hay in the region of Kars, Turkey. *Vet J,* 163, 214-7.

Bickhardt, K., Ganter, M., Sallmann, P. , Fuhrmann, H. 1999. [Investigations on manifestations of vitamin E and selenium deficiency in sheep and goats]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr,* 106, 242-7.

Blodgett, D. J. , Bevill, R. F. 1987. Acute selenium toxicosis in sheep. *Vet Hum Toxicol,* 29, 233-6.

Bordignon, R., Volpato, A., Glombowsky, P., Souza, C. F., Baldissera, M. D., Secco, R., Pereira, W. A. B., Leal, M. L. R., Vedovatto, M. , Da Silva, A. S. 2019. Nutraceutical effect of vitamins and minerals on performance and immune and antioxidant systems in dairy calves during the nutritional transition period in summer. *J Therm Biol,* 84, 451-459.

Brigelius-Flohé, R. , Flohé, L. 2020. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal,* 33, 498-516.

Brinkman, M., Reulen, R.C., Kellen, E., Buntinx, F., Zeegers, M.P. 2006. Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer? *Eur J Canc,* 42, 15, 2463-2471,

Brouwers, J.F., Gadella, B.M. 2003. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radic Biol Med,* 35, 1382–1391

Burk, R. F. 1991. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *Faseb J* 5, 2274-9.

Burk, R. F. , Hill, K. E. 2015. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr,* 35, 109-34.

Błażejak-Grabowska, J., Milewski, S., Ząbek, K., Sobiech, P., Wójcik, R., Żarczyńska, K. , Miciński, J. 2022. Effect of Long-Acting Selenium Preparation on Health and Productivity of Sheep. *Animals (Basel),* 12.

Cao, Y. Z., Maddox, J. F., Mastro, A. M., Scholz, R. W., Hildenbrandt, G. , Reddy, C. C. 1992. Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes. *J Nutr,* 122, 2121-7.

Carlson, B. A., Yoo, M. H., Shrimali, R. K., Irons, R., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. , Park, J. M. 2010. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. *Proc Nutr Soc,* 69, 300-10.

Castets, P., Lescure, A., Guicheney, P. , Allamand, V. 2012. Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J Mol Med (Berl),* 90, 1095-107.

Ceko, M. J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W. M., Aitken, J. B., Russell, D. L., Lane, M., Rodgers, R. J. , Harris, H. H. 2015. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. *Metallomics,* 7, 66-82.

Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci,* 58, 99–111.

Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. , Harrison, P. R. 1986. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo j,* 5, 1221-7.

Chen, F., Zhu, L., Qiu, H., Qin, S. 2017. Selenium-enriched Saccharomyces cerevisiae improves growth, antioxidant status and selenoprotein gene expression in arbor acres broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr,* 101(2), 59–266.

Combs, G. F., Jr. , Gray, W. P. 1998. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther,* 79, 179-92.

Crosley, L. K., Méplan, C., Nicol, F., Rundlöf, A. K., Arnér, E. S., Hesketh, J. E. , Arthur, J. R. 2007. Differential regulation of expression of cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys,* 459, 178-88.

Dalto, D. B., Roy, M., Audet, I., Palin, M. F., Guay, F., Lapointe, J. , Matte, J. J. 2015. Interaction between vitamin B6 and source of selenium on the response of the selenium-dependent glutathione peroxidase system to oxidative stress induced by oestrus in pubertal pig. *J Trace Elem Med Biol,* 32, 21-9.

Daniels, L. A. 1996. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res,* 54, 185-99.

Davis, C. D., Tsuji, P. A. , Milner, J. A. 2012. Selenoproteins and cancer prevention. *Annu Rev Nutr,* 32, 73-95.

Davis, T. Z. , Hall, J. O. 2017. Chapter 34 - Selenium. In: Gupta, R. C. (ed.) *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition).* Academic Press.

Dhillon, K.S., Dhillon, S.K.. 2003. Distribution and management of seleniferous soils. *Adv Agron*, 79, 119-184.

Dodig, S. , Cepelak, I. 2004. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharm*, 54, 261-76.

Domínguez-Vara, I. A., González-Muñoz, S. S., Pinos-Rodríguez, J. M., Bórquez-Gastelum, J. L., Bárcena-Gama, R., Mendoza-Martínez, G., Zapata, L. E. , Landois-Palencia, L. L. 2009. Effects of feeding selenium-yeast and chromium-yeast to finishing lambs on growth, carcass characteristics, and blood hormones and metabolites. *Anim Feed Sci Technol*, 152, 42-49.

Doornenbal, H., Tong, A.K., Murray N. L.. 1988. Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Can J Vet Res*, 52, 99–105.

Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., Seeff, L.B., 2000. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I, Performance characteristics of laboratory tests, *Clinl Chem*, 46, 2027-2049.

Ebrahimi, M., Towhidi, A. , Nikkhah, A. 2009. Effect of Organic Selenium (Sel-Plex) on Thermometabolism, Blood Chemical Composition and Weight Gain in Holstein Suckling Calves. *Asian-Australas J Anim Sci*, 22, 984-992.

El-Shahat, K. H. , Abdel Monem, U. M. 2011. Effects of dietary supplementation with vitamin E and/or selenium on metabolic and reproductive performance of Egyptian Baladi ewes under subtropical conditions. *World Appl Sci J*, 12, 1492-1499.

Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Grasso, P.J., Scholz, R.W. 1989. Induction of Escherichia coli mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. *Am J Vet Res*, 50, 2093–2100.

Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Scholz, R.W. 1990. Experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. *Am J Vet Res*, 51, 1107–1111.

Evenson, J. K., Wheeler, A. D., Blake, S. M. , Sunde, R. A. 2004. Selenoprotein mRNA Is Expressed in Blood at Levels Comparable to Major Tissues in Rats. *J Nutr.*, 134, 2640-2645.

Fairweather-Tait, S. J., Collings, R. , Hurst, R. 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *AJCN*, 91, 1484S-1491S.

Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F. , Maiorino, M. 2002. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod*, 67, 967-971.

Foster, L. H. , Sumar, S. 1997. Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37, 211-28.

Fredericks, G. J. , Hoffmann, P. R. 2015. Selenoprotein K and protein palmitoylation. *Antioxid Redox Signal*, 23, 854-62.

Gawłowska, M., Rabe-Jabłońska, J. 2008. Genetyka obrony antyoksydacyjnej. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia/Neuropsychiatry and Neuropsychology*, 3, 37-46.

Gerloff, B. J. 1992. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J Anim Sci*, 70, 3934-40.

Ghelichkhani, F., Gonzalez, F. A., Kapitonova, M. A., Schaefer-Ramadan, S., Liu, J., Cheng, R. , Rozovsky, S. 2022. Selenoprotein S: A versatile disordered protein. *Arch Biochem Biophys*, 731, 109427.

Gholam, A.K., Jahanabadi, S., Shakibaie, M., Ahadi, A.M., Shahverdi, A.R. 2012. Effect of selenium supplementation with sodium selenite and selenium nanoparticles on iron homeostasis and transferrin gene expression in sheep: A preliminary study. *Res in Vet Sci*, 93, 1, 275-278.

Giadinis, N.D., Loukopoulos, P., Petridou, E.J., Panousis, N., Konstantoudaki, K., Filioussis, G., Tsousis, G., Brozos, C., Koutsoumpas, A.T., Chaintoutis, S.C. 2016. Abortions in three beef cattle herds attributed to selenium deficiency. *Pak Vet J*, 36, 145–148.

Giadinis, N.D., Panousis, N., Petridou, E.J., Siarkou, V.I., Lafi, S.Q., Pourliotis, K., Hatzopoulou, E., Fthenakis, G.C. 2011. Selenium, vitamin E and vitamin A blood concentrations in dairy sheep flocks with increased or low clinical mastitis incidence. *Small Rumin Res*, 95, 193–196.

Gore, M. T., McCarthy, F. D., Mulvaney, D. R., Blodgett, D. J. , Greyson, R. L. 1990. Skeletal muscle infrastructure and protein turnover of lambs fed a diet low in selenium and vitamin E. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 64, 125-132.

Gorini, F., Sabatino, L., Pingitore, A. , Vassalle, C. 2021. Selenium: An Element of Life Essential for Thyroid Function. *Molecules*, 26.

Haddad el, B., McCluskie, K., Birrell, M. A., Dabrowski, D., Pecoraro, M., Underwood, S., Chen, B., De Sanctis, G. T., Webber, S. E., Foster, M. L. , Belvisi, M. G. 2002. Differential effects of ebselen on neutrophil recruitment, chemokine, and inflammatory mediator expression in a rat model of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. *J Immunol*, 169, 974-82.

Hafner, A., Dahme, E., Obermaier, G., Schmidt, P., Doll, K. , Schmahl, W. 1996. Congenital myopathy in Braunvieh x Brown Swiss calves. *J Comp Pathol*, 115, 23-34.

Hassan, S., Hassan, F. U. , Rehman, M. S. 2020. Nano-particles of Trace Minerals in Poultry Nutrition: Potential Applications and Future Prospects. *Biol Trace Elem Res,* 195, 591-612.

Hawkes, W. C., Kelley, D. S. , Taylor, P. C. 2001. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men. *Biol Trace Elem Res,* 81, 189-213.

Hefnawy, A. E. G. , Tórtora-Pérez, J. L. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Rumin Res,* 89, 185-192.

Helke, K. L., Wolfe, A. M., Smith, A. C., Swagel, R., Gross, R. H., Yao, H. , McCrackin, M. A. 2020. Mulberry Heart Disease and Hepatosis Dietetica in Farm Pigs (Sus scrofa domesticus) in a Research Setting. *Comp Med,* 70, 376-383.

Higuchi, T., Ichijo, S., Osame, S. , Ohishi, H. 1989. Studies on serum selenium and tocopherol in white muscle disease of foal. *Nihon Juigaku Zasshi,* 51, 52-9.

Hoffmann, P. R. 2007. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz),* 55, 289-97.

Hoshino, Y., Ichijo, S., Osame, S. , Takahashi, E. 1989. Studies on serum tocopherol, selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in calves with white muscle disease. *Nihon Juigaku Zasshi,* 51, 741-8.

Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttkay-Nedecky, B., Malevu, T. D., Sochor, J., Baron, M., Melcova, M., Zidkova, J. , Kizek, R. 2017. A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species-A Critical Review. *Int J Mol Sci,* 18.

Huang, Z., Rose, A. H. , Hoffmann, P. R. 2012. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal,* 16, 705-43.

Humann-Ziehank, E., Renko, K., Mueller, A. S., Roehrig, P., Wolfsen, J. , Ganter, M. 2013. Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep. J Trace Elem Med Biol, 27, 380-390.

Hunter, J.D.. 2007. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput Sci Eng*, *9*(03),.90-95.

Ibrahim, D., Kishawy, A. T. Y., Khater, S. I., Hamed Arisha, A., Mohammed, H. A., Abdelaziz, A. S., Abd El-Rahman, G. I. , Elabbasy, M. T. 2019. Effect of Dietary Modulation of Selenium Form and Level on Performance, Tissue Retention, Quality of Frozen Stored Meat and Gene Expression of Antioxidant Status in Ross Broiler Chickens. *Animals.*

Ivancic, J., Jr. , Weiss, W. P. 2001. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J Dairy Sci,* 84, 225-32.

Jablonska, E., Reszka, E., Gromadzinska, J., Wieczorek, E., Krol, M. B., Raimondi, S., Socha, K., Borawska, M. H. , Wasowicz, W. 2016. The Effect of Selenium Supplementation on Glucose Homeostasis and the Expression of Genes Related to Glucose Metabolism. *Nutrients,* 8, 772.

Jastrzebski, Z., Czyzewska-Szafran, H., Fijatek, Z., Suchocki, P. , Fitak, B. A. 1995. Toxicity studies of a new selenium compound, Selol, in rats. *Drugs Exp Clin Res,* 21, 217-220.

Jastrzebski, Z., Czyzewska-Szafran, H., Remiszewska, M., Fijalek, Z., Fitak, B. A. , Suchocki, P. 1997. Pharmacokinetics of selol, a new agent containing selenium, in rats. *Drugs Exp Clin Res,* 23, 7-11.

Jiao, X.L., Jing, J.J., Qiao, L.Y., Liu, J.H., Li, L.A., Zhang, J., Jia, X.L., Liu, W.Z. 2016. Ontogenetic Expression of Lpin2 and Lpin3 Genes and Their Associations with Traits in Two Breeds of Chinese Fat-tailed Sheep. *Asian-Australas J Anim Sci*. 29(3), 333-42.

Johnson, V. J., Tsunoda, M. , Sharma, R. P. 2000. Increased production of proinflammatory cytokines by murine macrophages following oral exposure to sodium selenite but not to seleno-L-methionine. *Arch Environ Contam Toxicol,* 39, 243-50.

Juszczuk-Kubiak, E., Bujko, K., Cymer, M., Wicińska, K., Gabryszuk, M. , Pierzchała, M. 2016. Effect of Inorganic Dietary Selenium Supplementation on Selenoprotein and Lipid Metabolism Gene Expression Patterns in Liver and Loin Muscle of Growing Lambs. *Biol Trace Elem Res,* 172, 336-345.

József, L. , Filep, J. G. 2003. Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med,* 35, 1018-27.

Kamada, H., Nonaka, I., Ueda, Y. , Murai, M. 2007. Selenium addition to colostrum increases immunoglobulin G absorption by newborn calves. *J Dairy Sci,* 90, 5665-70.

Kamada, H., Nonaka, I., Takenouchi, N., Amari, M. Effects of selenium supplementation on plasma progesterone concentrations in pregnant heifers. 2014. *Anim Sci J*, 85, 241–246.

Karwacka, A., Dullin, P. , Galbas, M. 2014. [The effects of selenium deficiency in animals]. *Postepy Biochem,* 60, 365-70.

Katz, L., O'Dwyer, S. , Pollock, P. 2009. Nutritional muscular dystrophy in a four-day-old Connemara foal. *Ir Vet J,* 62, 119-24.

Kessler, J. 1993. Carence en sélénium chez les ruminants: Mesures prophylactiques. *Rev Suisse Agric,* 25, 21-26.

Khalid, W., Jasim Mohammed Ali, W. 2019. Effect of injecting different levels of vitamin E and selenium in some physiological characteristics of blood and milk yield and compositions in Awassi ewes . *Euph J Agri Sci*, 11, 7-13.

Klein, R., Nagy, O., Tóthová, C. , Chovanová, F. 2020. Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. *Vet Med Int,* 2020, 5346483.

Koenig, K. M., Rode, L. M., Cohen, R. D. , Buckley, W. T. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *J Anim Sci,* 75, 817-27.

Koller, L. D. , Exon, J. H. 1986. The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man. *Can J Vet Res,* 50, 297-306.

Kommisrud E., Østerås O., Vatn T. 2005. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Acta Vet Scand,* 46, 229.

Kozat, S. 2007. Serum T3 and T4 concentrations in lambs with nutritional myodegeneration. *J Vet Intern Med,* 21, 1135-1137.

Köhrle, J. 2015. Selenium and the thyroid. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,* 22, 392-401.

Lei, X.G., Evenson, J.K., Thompson, K.M., Sunde, R.A. 1995. Glutathione-peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione-peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr* 125(6),1438–1446.

Lemly, A. D. 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicol Environ Saf,* 59, 44-56.

Levander, O. A., DeLoach, D. P., Morris, V. C. , Moser, P. B. 1983. Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. *J Nutr,* 113, 55-63.

Levene, H. 1960. Robust Tests for Equality of Variances. w: Olkin, I., Ed., *Contributions to Probability and Statistics, Stanford University Press, Palo Alto,* 278-292

Lie, J. T., Holley, K. E., Kampa, W. R. , Titus, J. L. 1971. New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Mayo Clin Proc,* 46, 319-27.

Liu, L., Wang, M., Gong, N., Tian, P. , Deng, H. 2021. Se improves GPX4 expression and SOD activity to alleviate heat-stress-induced ferroptosis-like death in goat mammary epithelial cells. *Anim Cells Syst (Seoul),* 25, 283-295.

Lopez Heras, I., Palomo, M. , Madrid, Y. 2011. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Anal Bioanal Chem,* 400, 1717-27.

Low, S. C., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W. , Berry, M. J. 2000. SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *Embo j,* 19, 6882-90.

Lu, J. , Holmgren, A. 2009. Selenoproteins. *J Biol Chem,* 284, 723-7.

Maiorino, M., Flohé, L., Roveri, A., Steinert, P., Wissing, J. B. , Ursini, F. 1999. Selenium and reproduction. *Biofactors,* 10, 251-6.

Mann, H.B. and Whitney, D.R. 1947. On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat* 18, 50-60.

Marai, I.F.M, El-Darawany, A. Ismail, E., Abdel-Hafez M. 2009. Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt (Short Communication) *Arch Anim Breed,* 52, 402-409.

Marciel, M. P., Hoffmann, P. R. 2019. Molecular Mechanisms by Which Selenoprotein K Regulates Immunity and Cancer. *Biol Trace Elem Res,* 192, 60-68.

Mariotti, M., Ridge, P. G., Zhang, Y., Lobanov, A. V., Pringle, T. H., Guigo, R., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. 2012. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One,* 7, e33066.

Mehdi, Y. , Dufrasne, I. 2016. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules,* 21, 545.

Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L. , Dufrasne, I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules,* 18, 3292-311.

Mengistu, B.M., Bitsue, H.K., Huang, K. 2021. The effects of selenium-enriched probiotics on growth performance, oocysts shedding, intestinal cecal lesion scores, antioxidant capacity, and mRNA gene expression in chickens infected with Eimeria tenella. *Biol Trace Elem Res,* 199, 278–291.

Meschy, F. 2010. Nutrition Minérale des Ruminants.Editions Quae. Versaille, *France*, 208

Michaelis, M., Gralla, O., Behrends, T., Scharpf, M., Endermann, T., Rijntjes, E., Pietschmann, N., Hollenbach, B. , Schomburg, L. 2014. Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochem Biophys Res Commun,* 443, 905-10.

Mikaelian, I., Poul, J. M. , Cabanié, P. 1996. Healing of muscle trauma after intramuscular injection of antibiotics in sheep: correlations between clinical, macroscopic and microscopic scores. *Vet Res,* 27, 97-106.

Milad, K., Kovac, G., Racz, O., Sipulova, A. , Bajova, V. 2001. Effect of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. *Vet Med (Praha*), 46, 1-5.

Minich, W. B. 2022. Selenium Metabolism and Biosynthesis of Selenoproteins in the Human Body. *Biochemistry (Mosc),* 87, S168-s102.

Mohamed, M. Y., Ibrahim, E. M. M. , Abd El-Mola, A. M. 2017. Effect of selenium yeast and/or vitamin E supplemented rations on some physiological responses of post-lambing ossimi ewes under two different housing systems. *Egypt J Nutr Health,* 20, 361-378.

Mohamed, S.S., Abdelatif, A.M., Adam, A.A.G. 2012. Effects of exposure to solar radiation on thermoregulation and semen characteristics of Sudanese Desert Rams (*Ovis Aries*). *Glob Vet,* 9 , 502-507,

Mohri, M., Ehsani, A., Norouzian, M. A., Bami, M. H. , Seifi, H. A. 2011. Parenteral selenium and vitamin E supplementation to lambs: hematology, serum biochemistry, performance, and relationship with other trace elements. *Biol Trace Elem Res,* 139, 308-16.

Mudgal, V., Garg, A. K., Dass, R. S. , Varshney, V. P. 2008. Effect of selenium and copper supplementation on blood metabolic profile in male buffalo (Bubalus bubalis) calves. *Biol Trace Elem Res,* 121, 31-8.

Muth, O. H., Oldfield, J. E., Remmert, L. F. , Schubert, J. R. 1958. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science,* 128, 1090.

Müller, C., Wingler, K. , Brigelius-Flohé, R. 2003. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem,* 384, 11-8.

Nielsen, T. K., Wolstrup, C., Schirmer, A. L. , Jensen, P. T. 1989. Mulberry heart disease in young pigs without vitamin E and selenium deficiency. *Vet Rec,* 124, 535-7.

O'Toole, D. , Raisbeck, M. F. 1995. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest,* 7, 364-73.

Oldfield, J. E. 1987. The two faces of selenium. *J Nutr,* 117, 2002-8.

Oropeza-Moe, M., Falk, M., Vollset, M., Wisløff, H., Bernhoft, A., Framstad, T. , Salbu, B. 2019. A descriptive report of the selenium distribution in tissues from pigs with mulberry heart disease (MHD). *Porc Health Manag* 5, 17.

Osame, S., Ohtani, T. , Ichijo, S. 1990. Studies on serum tocopherol and selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in lambs with white muscle disease. *Nihon Juigaku Zasshi,* 52, 705-10.

Pavlata, L., Misurova, L., Pechova, A., Husakova, T. , Dvorak, R. 2012. Direct and indirect assessment of selenium status in sheep–a comparison. *Vet Med,* 57, 219-223.

Pavlata, L., Pechova, A. , Illek, J. 2000. Direct and indirect assessment of selenium status in cattle-a comparison. *Acta Vet Brno,* 69, 281-287.

Peng, G., Tang, Z., Xiang, Y., Chen, W. 2019. Glutathione peroxidase 4 maintains a stemness phenotype, oxidative homeostasis and regulates biological processes in panc-1 cancer stem-like cells. *Oncol Rep,*. 41, 1264–1274.

Pratt, D., Kaplan, M.M.. 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New Engl J Med*, 342, 1266–1271.

Pugh, D.G. 2002. *Sheep & Goat Medicine*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 348–393.

Qin, S., Gao, J. , Huang, K. 2007. Effects of different selenium sources on tissue selenium concentrations, blood GSH-Px activities and plasma interleukin levels in finishing lambs. *Biol Trace Elem Res,* 116, 91-102.

Raisbeck, M. F. 2000. Selenosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract,* 16, 465-80.

Ramírez-Bribiesca, J. E., Tórtora, J. L., Huerta, M., Aguirre, A. , Hernández, L. M. 2001. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Rumin Res,* 41, 81-85.

R Core Team .2020. R: A language and environment for statistical computing .Computer Software Manual. Vienna, Austria.

Reczyńska, D., Witek, B., Jarczak, J., Czopowicz, M., Mickiewicz, M., Kaba, J., Zwierzchowski, L. , Bagnicka, E. 2019. The impact of organic vs. inorganic selenium on dairy goat productivity and expression of selected genes in milk somatic cells. *J Dairy Res,* 86, 48-54.

Roman, M., Jitaru, P. , Barbante, C. 2014. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics,* 6, 25-54.

Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. , Hoekstra, W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science,* 179, 588-90.

Royston, J.P. 1995. Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W Test for Normality. *Appl Stat,* 44, 547-551

Saba, F. E., Saleh, A. A. K. , Al Moafy, A. A. 2019. Effect of supplementation with different types of selenium on lactation performance and some blood parameters of Farafra and Saidi ewes and performance of their lambs. *Egypt J Sheep Goats Sci*, 14, 19-30.

Sahu, A.R., Wani, S.A., Saxena, S., Rajak, K.K., Chaudhary, D., Sahoo, A.P., Khanduri, A., Pandey, A., Mondal, P., Malla, W.A., Khan, R.I.N., Tiwari, A.K., Mishra, B., Muthuchelvan, D., Mishra, B.P., Prasad, B., Singh, R.K., Gandham, R.K. 2018.

Selection and validation of suitable reference genes for qPCR gene expression analysis in goats and sheep under *Peste des petits ruminants virus (PPRV)*, lineage IV infection. *Sci Rep,* 8, 15969.

Sakr, Y., Reinhart, K., Bloos, F., Marx, G., Russwurm, S., Bauer, M. , Brunkhorst, F. 2007. Time course and relationship between plasma selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure. *Br J Anaesth,* 98, 775-84.

Salgado, H.H., Pomar, C., Palin, M.F., Lapierre, H., Létourneau-Montminy, M.P., Cant, J.P., Remus, A. 2022. Insulin sensitivity is associated with the observed variation of de novo lipid synthesis and body composition in finishing pigs. *Sci Rep*, 26, 12, 14586.

Salman, S., Khol-Parisini, A., Schafft, H., Lahrssen-Wiederholt, M., Hulan, H.W., Dinse, D., Zentek, J. 2009. The role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function. *Anim Health Res Rev*, 10, 21–34.

Schomburg, L., Schweizer, U. 2009. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophysi Acta (BBA) Gen Subj,* 1790(11),1453–1462

Schrauzer, G. N. 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr,* 130, 1653-6.

Schrauzer, G. N. 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Adv Food Nutr Res,* 47, 73-112.

Schulze, F., Malhan, D., El Khassawna, T., Heiss,C., Seckinger, A., Hose, D., Rösen-Wolff A. 2017. A tissue-based approach to selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a sheep osteoporosis model. *BMC Genomics*, 18, 975 .

Schwarz, K., Foltz, C. M. 1957. Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc,* 79, 3292-3293.

Seffner, W., Wittig, W. , Rittenbach, P. 1967. [Investigations on Mulberry heart disease (microangiopathy) of pigs]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr (1946),* 74, 213-20.

Serra, A. B., Nakamura, K., Matsui, T., Harumoto, T. , Fujihara, T. 1994. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *Asian-Australas J Anim Sci,* 7, 83-89.

Sharp, B. A., Young, L. G. , Van Dreumel, A. A. 1972. Effect of supplemental vitamin E and selenium in high moisture corn diets on the incidence of mulberry heart disease and hepatosis dietetica in pigs. *Can J Comp Med,* 36, 393-7.

Shi, L., Ren, Y., Zhang, C., Yue, W. , Lei, F. 2018. Effects of organic selenium (Se-enriched yeast) supplementation in gestation diet on antioxidant status, hormone profile and

haemato-biochemical parameters in Taihang Black Goats. *Anim Feed Sci Technol*, 238, 57-65.

Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Shi, L., Wang, Q., Yang, R. , Lei, F. 2011. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Rumin Res,* 96, 49-52.

Shinde, P. L., Dass, R. S. , Garg, A. K. 2009a. Effect of vitamin E and selenium supplementation on haematology, blood chemistry and thyroid hormones in male buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *J Anim Feed Sci,* 18, 241-256.

Shrimali, R. K., Irons, R. D., Carlson, B. A., Sano, Y., Gladyshev, V. N., Park, J. M. , Hatfield, D. L. 2008. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. *J Biol Chem,* 283, 20181-5.

Silwal, A., Sarkozy, A., Scoto, M., Ridout, D., Schmidt, A., Laverty, A., Henriques, M., D'Argenzio, L., Main, M., Mein, R., Manzur, A. Y., Abel, F., Al-Ghamdi, F., Genetti, C. A., Ardicli, D., Haliloglu, G., Topaloglu, H., Beggs, A. H. , Muntoni, F. 2020. Selenoprotein N-related myopathy: a retrospective natural history study to guide clinical trials. *Ann Clin Transl Neurol,* 7, 2288-2296.

Smyth, J. B., Wang, J. H., Barlow, R. M., Humphreys, D. J., Robins, M. , Stodulski, J. B. 1990. Experimental acute selenium intoxication in lambs. *J Comp Pathol,* 102, 197-209.

Snarska, A., Wysocka, D., Rytel, L., Żarczyńska, K., Sobiech, P. , Gonkowski, S. 2018. The influence of selenium and vitamin E supplementation on cytological assessment of red blood cell line of bone marrow in fallow deer kept in captivity. *Pol J Vet Sci,* 21, 431-436.

Sobiech, P. , Żarczyńska, K. 2020. The influence of selenium deficiency on chosen biochemical parameters and histopathological changes in muscles of goat kids. *Pol J Vet Sci,* 23, 267-279.

Sochacka, M., Giebułtowicz, J., Remiszewska, M., Suchocki, P. , Wroczyński, P. 2014. Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. *Pharmacol Rep,* 66, 301-10.

Soliman, E. B. 2015. Dose-response of vitamin E and selenium injection on growth performance, physiological and immune responses of Ossimi Lambs. *Egypt J Sheep Goats Sci,* 10, 1-14.

Soliman, E. B., Abd El-Moty, A. K. I. , Kassab, A. Y. 2012. Combined effect of vitamin E and selenium on some productive and physiological characteristics of ewes and their lambs during suckling period. *Egypt J Sheep Goats Sci i*, 7, 31-42.

Song, Y. X., Hou, J. X., Zhang, L., Wang, J. G., Liu, X. R., Zhou, Z. Q. , Cao, B. Y. 2015. Effect of Dietary Selenomethionine Supplementation on Growth Performance, Tissue Se Concentration, and Blood Glutathione Peroxidase Activity in Kid Boer Goats. *Biol Trace Elem Res*, 167, 242-50.

Sordillo, L.M. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle.2013. *Vet Med Int*, 2013, 154045.

Sordillo, L.M., O'Boyle, N., Gandy, J.C., Corl, C.M., Hamilton, E. 2007. Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J Dairy Sci*, 90, 1186–1192.

Spyrou, G., Björnstedt, M., Kumar, S. , Holmgren, A. 1995. AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione. *FEBS Lett*, 368, 59-63.

Stewart, W. C., Bobe, G., Pirelli, G. J., Mosher, W. D. , Hall, J. A. 2012. Organic and inorganic selenium: III. Ewe and progeny performance. *J Anim Sci*, 90, 4536-43.

Sun, P., Wang, J., Liu, W., Bu, D. P., Liu, S. J. , Zhang, K. Z. 2017. Hydroxy-selenomethionine: A novel organic selenium source that improves antioxidant status and selenium concentrations in milk and plasma of mid-lactation dairy cows. *J Dairy Sci*, 100, 9602-9610.

Sunde, R. A. 1994. Intracellular Glutathione Peroxidases — Structure, Regulation, and Function. In: Burk, R. F. (ed.) *Selenium in Biology and Human Health.* Springer New York, New York, NY, 45-77.

Takamura, T. 2020. Hepatokine Selenoprotein P-Mediated Reductive Stress Causes Resistance to Intracellular Signal Transduction. *Antioxid Redox Signal*, 33, 517-524.

Thompson, R. H., McMurray, C. H. , Blanchflower, W. J. 1976. The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs. *Res Vet Sci*, 20, 229-231.

Thu, V.T., Kim, H.K., Ha, S.H., Yoo, J.Y., Park, W.S., Kim, N., Oh, G.T., Han, J. 2010. Glutathione peroxidase 1 protects mitochondria against hypoxia/reoxygenation damage in mouse hearts. *Pflügers Archiv Eur J Physiol*, 460,55–68.

Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discovery*, 8, 579–591.

Tsutsumi, R. , Saito, Y. 2020. Selenoprotein P; P for Plasma, Prognosis, Prophylaxis, and More. *Biol Pharm Bull*, 43, 366-374.

Underwood, E.J., Suttle, N.F.2004. Selenium. In The Mineral Nutrition of Livestock, 3rd ed. CABI Publishing: Wallingford, UK. 421–475.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L.1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252, 38-53.

Van Rossum, G., Drake, F. L. 2009.. *Python 3 Reference Manual*. CA CreateSpace: Scotts Valley.

Van Vleet, J. F. 1982. Comparative efficacy of five supplementation procedures to control selenium-vitamin E deficiency in swine. *Am J Vet Res*, 43, 1180-9.

Wallenberg, M., Misra, S. , Björnstedt, M. 2014. Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114, 377-86.

Weiss, W. P. , Hogan, J. S. 2005. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. *J Dairy Sci*, 88, 4366-74.

Whanger, P. D. 2000. Selenoprotein W: a review. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1846-52.

Whanger, P. D. 2009. Selenoprotein expression and function-selenoprotein W. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 1448-52.

Wilde, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. 2006. *Anim Reprod Sci*, 96, 240–249

Wintergerst, E. S., Maggini, S. , Hornig, D. H. 2007. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*, 51, 301-23.

Winther, K. H., Rayman, M. P., Bonnema, S. J. , Hegedüs, L. 2020. Selenium in thyroid disorders - essential knowledge for clinicians. *Nat Rev Endocrinol*, 16, 165-176.

Witte, S. T., Will, L. A., Olsen, C. R., Kinker, J. A. , Miller-Graber, P. 1993. Chronic selenosis in horses fed locally produced alfalfa hay. *J Am Vet Med Assoc*, 202, 406-9.

Wolffram, S. 1992. [Selenium deficiency in humans and animals--a short review]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 134, 5-11.

Xiong X., Lan D., Li J., Lin Y., Li M. 2018. Selenium supplementation during in vitro maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. *Anim Sci J*, 89, 298–306.

Yaghmaie, P., Ramin, A., Asri-Rezaei, S. , Zamani, A. 2017. Evaluation of glutathion peroxidase activity, trace minerals and weight gain following administration of selenium compounds in lambs. *Vet Res Forum*, 8, 133-137.

Yang, D. Y., Chang, C. J., Peh, H. C. , Chen, M. T. 2004. Anti-peroxidation effects of vitamin E on low density lipoprotein and milk fat globule membrane of lactating goats: in vivo versus metal ion challenge in vitro. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,* 139, 11-20.

Yu, S. S. , Du, J. L. 2017. Selenoprotein S: a therapeutic target for diabetes and macroangiopathy? *Cardiovasc Diabetol,* 16, 101.

Zarczynska, K., Sobiech, P. , Tinson, A. 2020. Influence of selenitetriglyceride supplementation on selenium blood status and selected hematological and biochemical parameters in camels (*Camelus dromedarius*). *J Elem,* 25, 1363-1373

Zhan, X., Wang, M., Zhao, R., Li, W. , Xu, Z. 2007. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Anim Feed Sci Technol,* 132, 202-211.

Zhang, Q., Chen, L., Guo, K., Zheng, L., Liu, B., Yu, W., Guo, C., Liu, Z., Chen, Y. , Tang, Z. 2013. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. *Biol Trace Elem Res,* 154, 255-61.

Zhang, Y., Cui, Y., Zhang, X., Wang, Y., Gao, J., Yu, T., Lv, X., Pan, C. 2018. Pig StAR: mRNA expression and alternative splicing in testis and Leydig cells, and association analyses with testicular morphology traits. *Theriogenology,* 15, 118, 46-56.

Zhang, S., Rocourt, C. , Cheng, W. H. 2010. Selenoproteins and the aging brain. *Mech Ageing Dev,* 131, 253-60.

Zhang, J.X., Wang, Q., Xun, W.J., Ren, Y.S., Yue, W.B., Zhang, C.X.2011. GPXs family genes in different tissues and goat testis express characteristics of different development periods study. *J Anim Husb Vet* 42(5),650–657.

Zhang, Q., Qian, Z.Y., Zhou, P.H., Zhou, X.L., Zhang, D.L., He, N., Zhang, J., Liu, Y.H., Gu, Q. 2018. Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis,* 21, 17, 165.

Zhang, L., Zhou, Zq., Li, G. 2013.The Effect of Deposition Se on the mRNA Expression Levels of GPxs in Goats from a Se-enriched County of China. *Biol Trace Elem Res* 156, 111–123 .

Zhou, J. C., Zhao, H., Li, J. G., Xia, X. J., Wang, K. N., Zhang, Y. J., Liu, Y., Zhao, Y. , Lei, X. G. 2009. Selenoprotein gene expression in thyroid and pituitary of young pigs is not affected by dietary selenium deficiency or excess. *J Nutr,* 139, 1061-6.

Ziaei, N. 2015. Effect of selenium and vitamin E supplementation on reproductive indices and biochemical metabolites in Raieni goats. *J Appl Anim Res,* 43, 426-430.

Zito, E. , Ferreiro, A. 2021. Calcium and Redox Liaison: A Key Role of Selenoprotein N in Skeletal Muscle. *Cells,* 10.

Čobanová, K., Faix, Š., Plachá, I., Mihaliková, K., Váradyová, Z., Kišidayová, S. , Grešáková, Ľ. 2017. Effects of Different Dietary Selenium Sources on Antioxidant Status and Blood Phagocytic Activity in Sheep. *Biol Trace Elem Res,* 175, 339-346.

Żarczyńska, K., Snarska, A., Rytel, L. , Sobiech, P. 2018. Effect of a single-dose parenteral selenium supplement administered to pregnant dairy cows on selenium and iron concentrations and immune status of calves. *Pol J Vet Sci,* 21, 401-403.

Żarczyńska, K., Sobiech, P., Mee, J., Illek, J. 2020. The influence of short-term selenitetriglycerides supplementation on blood selenium, and hepatic, renal, metabolic and hematological parameters in dairy cows. *Pol J Vet Sci,* 23, 637-646.

Żarczyńska, K., Sobiech, P., Snarska, A., Tobolski, D., Shekhar Pareek, C. , Bednarek, D. 2018b. Applicability of the Protein-lipid Profile and Activity of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes for Diagnosing Nutritional Muscular Dystrophy in Calves. *J Vet Res,* 62, 503-509.

Żarczyńska, K., Sobiech, P., Tobolski, D., Mee, J. F. , Illek, J. 2021. Effect of a single, oral administration of selenitetriglycerides, at two dose rates, on blood selenium status and haematological and biochemical parameters in Holstein-Friesian calves. *Ir Vet J,* 74, 11.