



LIETUVOS SVEIKATOS MOKLSŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
MEDICINOS FAKULTETAS

TVIRTINU:

Medicinos fakulteto dekanas
Algimantas Tamelis
Parašas
Data

DOVYDAS LEVINAS

**SELENO POVEIKIO BIOGENINIŲ ELEMENTŲ HOMEOSTAZEI BEI
LIPIDŲ PEROKSIDACIJAI ĮVERTINIMAS EKSPERIMENTINIŲ
PELIŲ ORGANUOSE**

Bakalauro baigiamasis darbas

Medicininės ir veterinarinės biochemijos studijų programa, valstybinis kodas 6121DX001

Gyvybės mokslų studijų krypčių grupė

Biochemijos studijų kryptis

Darbo vadovas

dr. doc. Inga Stanevičienė

Konsultantas

dr. Rima Naginienė

Kaunas, 2023

DOVYDAS LEVINAS

**SELENO POVEIKIO BIOGENINIŲ ELEMENTŲ HOMEOSTAZEI
BEI LIPIDŲ PEROKSIDACIJAI ĮVERTINIMAS
EKSPERIMENTINIŲ PELIŲ ORGANUOSE**

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS, MEDICINOS FAKULTETAS,
MEDICINOS AKADEMIJA, BIOCHEMIJOS KATEDRA

Darbo vadovas(-ė): _____ .. _____
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

Darbo konsultantas (-ė): _____ .. _____
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

Darbą atliko bakalaurantas: _____ .. _____
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

Kaunas, 2023

TURINYS

TURINYS	3
SANTRUMPOS	4
SANTRAUKA	7
SUMMARY	8
ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI	10
1 LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 Selenas ir jo svarba	11
1.2 Seleno apykaita ir seleno baltymas P	12
1.3 Geležies, cinko ir vario svarba organizmui bei kepenų vaidmuo šių metalų homeostazėje	15
1.4 Geležies, cinko ir vario funkcijos nerviniame audinyje bei jų homeostazės sutrikdymo pasekmės	18
1.5 Oksidacinis stresas ir jo žymuo malondialdehididas	20
1.6 Ląstelių antioksidantinė sistema	22
2 TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	24
2.1 Tyrimo objektas	24
2.2 Tyrimo planavimas	24
2.3 Malondialdehido koncentracijos kraujyje nustatymas	25
2.4 Audinių homogenato paruošimas	25
2.5 Malondialdehido koncentracijos organuose nustatymas	26
2.6 Laboratorinių pelių audinių mineralizavimas	26
2.7 Seleno, geležies, vario ir cinko koncentracijos nustatymas laboratorinių pelių audiniuose	27
2.8 Bendro baltymo koncentracijos nustatymas	27
2.9 Katalazės fermento aktyvumo nustatymas	28
2.10 CAT, SOD1 ir SelP genų raiškos įvertinimas laboratorinių pelių organuose	29
2.10.1 Laboratorinių pelių smegenų ir kepenų audinio suardymas	29
2.10.2 RNR išskyrimas	30
2.10.3 Kopijinės DNR sintezė	30
2.10.4 Genų raiškos pokyčių įvertinimas kiekybinės tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos ir $\Delta\Delta C_t$ metodais	31
2.11 Duomenų statistinė analizė	34
3 REZULTATAI	35
3.1 Seleno įtakos laboratorinių pelių kūno masei ir santykinio organo masės indeksui įvertinimas	35
3.2 Seleno koncentracijų pelės audiniuose įvertinimas	36
3.3 Malondialdehido koncentracijos pelės audiniuose įvertinimas	37
3.4 Geležies, vario ir cinko koncentracijų pelės audiniuose nustatymas	38
3.5 Katalazės aktyvumo pelės organuose įvertinimas	40
3.6 CAT geno raiškos pelės organuose nustatymas	41
3.7 SOD1 geno raiškos pelės organuose nustatymas	42
3.8 SELENOP geno raiškos pelės organuose nustatymas	43
4 REZULTATŲ APTARIMAS	45
5 IŠVADOS	51
6 Literatūros sąrašas	52
7 Priedai	71

SANTRUMPOS

ADF – aktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*; *ROS*)

ApoER2/LRP8 – mažo tankio lipoproteinų receptorinis baltymas 8

CAT – katalazę koduojantis genas

Cys – cisteinas

Ct - slenksitinė ciklo vertė

Cu – varis

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksinukleozido 5' trifosfatas

EDTA - etilendiamintetraacto rūgštis

Fe – geležis

GAPDH - gliceraldehido 3- fosfato dehidrogenazė

ICP-MS – induktyviai susietos plazmos masių spektrometrija

kDNR – kopijinė DNR

k. m. – kūno masė

kTL-PGR – kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

LR – laisvieji radikalai

MDA – malondialdehidas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

RNR – ribonukleorūgštis

Se – selenas

Sec – selenocisteinas

SelP/SeP – seleno baltymas

SELENOP – seleno baltymą P koduojantis genas

SeMet – selenometioninas

SOD - superoksido dismutazė

SOD1 – superoksido dismutazę koduojantis genas

Zn – cinkas

0,4 Se dozė – 0,4 mg Se/kg k. m.

SANTRAUKA

Baigiamojo darbo autorius: Levinas D.

Tema: Seleno poveikio biogeninių elementų homeostazei bei lipidų peroksidacijai įvertinimas eksperimentinių pelių organuose

Mokslinis vadovas: dr. doc. I. Stanevičienė

Atlikimo vieta: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos fakultetas, Medicinos akademija, Biochemijos katedra

Santraukos turinys: Šio darbo tikslas įvertinti seleno poveikį biogeninių elementų homeostazei bei lipidų peroksidacijai eksperimentinių pelių organuose. Tikslui įgyvendinti 4 – 6 savaičių amžiaus laboratorinės BALB/c pelės buvo 8 savaites girdomos selenometionino (0,4 mg Se/kg k. m.) tirpalu. Tyrimams naudotas pelių kraujas, kepenys ir smegenys. Lipidų peroksidacijos žymens malondialdehido kiekis vertintas spektrofotometriiniu metodu. Seleno, geležies, vario ir cinko koncentracijos pelių audiniuose nustatytos induktyviai susietos plazmos masių spektrometrijos metodu. Fermentų katalazės CAT, superoksido dismutazės SOD1 ir seleno baltymo P SELENOP genų raiška smegenyse ir kepenyse įvertinta kiekybinės tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos ir $\Delta\Delta C_t$ metodais.

Nustatyta, kad 8 savaičių trukmės selenometionino tirpalo vartojimas *per os* statistiškai reikšmingai sumažino laboratorinių pelių kūno masės prieaugį 4-ą ir 6-ą eksperimento savaitę bei santykinį smegenų masės indeksą, lyginant su kontrole. Praėjus 8 savaitėms po ilgalaikio pelių girdymo selenometionino tirpalu, statistiškai reikšmingai 1155 proc. padidėjo Se kiekis kraujyje. Daug Se nustatyta ir tirtuose organuose: kepenyse, lyginant su smegenimis, buvo sukauptas didesnis Se kiekis. Tačiau, lyginant su kontrole, Se kiekis kepenyse padidėjo 1443 proc., o smegenyse – 4118 procentais. Selenometioninas turėjo reikšmingos įtakos geležies, cinko ir vario homeostazei po ilgalaikio 0,4 Se dozės vartojimo. Kraujyje Fe kiekis sumažėjo 29,6 proc., o Cu kiekis – 40,4 proc. Tuo tarpu kepenyse Fe ir Zn kiekiai atitinkamai padidėjo 129 ir 61 procentais. Smegenyse statistiškai reikšmingai padidėjo visų tirtų elementų kiekiai: 42,3 proc. – Fe, 46 proc. – Zn, 68,6 proc. – Cu. Ilgalaikis organinio seleno vartojimas statistiškai reikšmingai didino lipidų peroksidaciją pelių kraujyje (1,38 karto) ir smegenyse (1,27 karto), tačiau mažino kepenyse (1,27 kartų), lyginant su kontrole. Po ilgalaikio pelių girdymo selenometionino tirpalu, statistiškai reikšmingai 29 proc. padidėjo SOD1 ir 37 proc. sumažėjo CAT geno raiška bei 30 proc. katalazės aktyvumas smegenyse, kai tuo tarpu kepenyse, priešingai, CAT geno raiška padidėjo 166 procentais, tačiau fermento aktyvumas sumažėjo 20 procentų. Tuo tarpu seleno homeostazėje dalyvaujančio seleno baltymo P SELENOP geno raiškos padidėjimas siekė net 19792 proc., o smegenyse – 143 proc., lyginant su kontrole.

SUMMARY

Author of bachelor thesis Levinas D.

Title Evaluation of the selenium effect on the biogenic elements homeostasis and lipid peroxidation in the experimental mice organs

Scientific supervisor: PhD I. Stanevičienė

Work was performed at: Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Medical Academy, Department of Biochemistry

Summary: This study examines selenium effects on homeostasis of biogenic elements and lipid peroxidation in laboratory mice organs. 4-6 weeks old BALB/c mice received selenomethionine (Se, 0.4 mg/kg body weight) supplemented in tap water for 8 weeks to achieve the present study objectives. Mice blood, liver, brain and kidney were collected to evaluate the research results. MDA concentration as index of lipid peroxidation was determined by spectrophotometric method. Concentration of Se, Fe, Cu and Zn in tissues were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry method. Catalase CAT, superoxide dismutase SOD1 and selenoprotein P SELENOP genes expression in brain and liver were determined by quantitative RT-PCR and $\Delta\Delta C_t$ methods.

The results demonstrated that *per os* SeMet supplementation for 8 weeks statistically significantly decreased laboratory mice body weight gain on the 4th and 6th weeks, as well as relative brain mass index compared to the control group. After 8 weeks of SeMet treatment, Se concentration in blood statistically significantly increased by 1155 %. High Se accumulation in mice organs was found: higher Se accumulation was identified in liver compared to brain. However, compared to the control group, concentration of Se in liver increased by 1443 % and in brain by 4118 %. Long-term selenomethionine treatment showed significant influence on iron, zinc and copper homeostasis. Fe concentration in blood decreased by 29.6 %, Cu concentration decreased by 40.4 %. Whereas Fe and Zn concentrations in liver increased by 129 % and 61 % respectively. The elements concentrations in brain resulted in statistically significant increase: Fe by 42.3 %, Zn by 46 % and Cu by 68.6 %. Long-term selenomethionine treatment demonstrated statistically significant increase of lipid peroxidation level in blood by 1.38 times and by 1.27 times in brain, however decreased by 1.27 times in liver as compared to the control. Selenomethionine treatment also exposed statistically significant increase of SOD1 gene expression in brain by 29%, however CAT gene expression decreased by 37 %, and catalase activity decreased by 30 %. Whereas, in contrast, CAT gene expression in liver increased by 166 %, however enzymatic activity of catalase decreased by 20 %. Meanwhile, the increase in SELENOP gene expression of the selenoprotein P, which is involved in selenium homeostasis, was as high as 19792 % in liver and 143 % in the brain compared to the control.

IVADAS

Selenas (Se) yra organizmų funkcionavimui būtinas bioelementas [1]. Jo kiekis gamtoje ir žmogaus organizme yra labai įvairus ir priklauso nuo geografinio regiono bei mitybos. Nepaisant to, jog žmogaus organizme yra labai nedidelis Se kiekis, fiziologiškai jis yra labai svarbus. Šio elemento teigiamas poveikis organizmui siejamas su jo dalyvavimu seleno baltymų, kurie pasižymi antioksidantiniu poveikiu, sintezėje [2]. Ypač svarbų vaidmenį Se atlieka palaikant normalią smegenų veiklą. Dėl to svarbu gauti optimalų Se kiekį su maistu ar papildais. Ilgalaikis seleno trūkumas žmogaus organizme sukelia ligas. Trūkstant šio elemento, sutrinka nervų, širdies ir kraujagyslių, endokrininės, imuninės ir kitų sistemų veikla, didėja vėžio atsiradimo rizika [3]. Kita vertus, per gausus Se vartojimas taip pat gali neigiamai paveikti organizmą. Riba tarp nepakankamo Se kiekio ir jo pertekliaus yra gana siaura ir tikslų jos nustatymą apsunkina tai, jog yra įvairių cheminių šio elemento formų. Toksinį poveikį organizmui gali daryti tiek organinės, tiek ir neorganinės seleno formos [4]. Per didelis suvartojamo Se kiekis gali generuoti aktyvias deguonies formas, kurios sutrikdo ląstelių redokso būklę [5][6], dėl to sutrinka pusiausvyra tarp ląstelių antioksidantinės apsaugos ir laisvųjų radikalų ar aktyvių deguonies formų susidarymo. Minėtomis sąlygomis ląstelės patiria oksidacinį stresą [7], pažeidžiami įvairūs audiniai, ląstelių struktūros ir jas sudarančios makromolekulės. Laisvieji radikalai gali tiesiogiai paveikti lipidus, sukeldami jų peroksidaciją [8]. Todėl pagal lipidų peroksidacijos galutinio produkto – malondialdehido kiekį bei antioksidantinės sistemos komponentų aktyvumo ar genų raiškos pokyčius galima įvertinti audinių ląstelių patiriamą oksidacinio streso lygį ir jų gebėjimą šį stresą sumažinti.

Darbo aktualumas: Tiek organinis, tiek neorganinis Se yra naudojamas kaip maisto papildas žmonėms ir gyvūnams. Šiuo mikroelementu ypač domimasi dėl jo vaidmens įvairių ligų, ypač neurodegeneracinių bei onkologinių, gydyme bei profilaktikoje. Efektyviam ir saugiam Se vartojimui tiek profilaktikos, tiek gydymo tikslais mokslinės literatūros duomenų vis dar nepakanka ir dėl dvejopo Se poveikio jie yra gana prieštaringi. Nors Se yra nepakeičiamas antioksidantinių savybių turinčių seleno baltymų sintezės procese, priklausomai nuo dozės, būdamas selenometionino sudėtyje ar neorganinio Se formoje, jis gali veikti toksiškai bei pasižymėti prooksidantiniu aktyvumu. Yra atlikta gana daug tyrimų, nagrinėjančių Se apsauginį poveikį įvairiems gyvūnų modeliams, tačiau nėra iki galo nustatyta Se koncentracijos riba, kada selenometionino sudėtyje esančio Se antioksidantinį poveikį keičia prooksidantinis jo veikimas. Siekiant atsakyti į šį klausimą, šiame darbe buvo vertintas ilgalaikis organinio Se (0,4 mg Se/kg k. m.) poveikis oksidacinio streso lygiui laboratorinių pelių audiniuose pagal malondialdehido kiekio ir antioksidantinių fermentų genų raiškos pokyčius. Taip pat įvertintas Se pertekliaus poveikis normaliai smegenų ir viso organizmo veiklai būtinų biogeninių elementų (geležies, vario, cinko) homeostazei, taip bent iš dalies užpildant mokslinės literatūros duomenų trūkumo spragą.

DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

Šio bakalauro darbo **tikslas** – įvertinti seleno poveikį biogeninių elementų homeostazei bei lipidų peroksidacijai eksperimentinių pelių organuose.

Uždaviniai:

1. Įvertinti ilgalaikį organinio seleno poveikį laboratorinių pelių kūno masės ir smegenų, kepenų bei inkstų masės pokyčiams.
2. Nustatyti seleno koncentracijas laboratorinių pelių, paveiktų organiniu seleno, kraujyje, smegenyse bei kepenyse.
3. Nustatyti geležies, vario ir cinko koncentracijas laboratorinių pelių, paveiktų organiniu seleno, kraujyje, smegenyse bei kepenyse.
4. Įvertinti ilgalaikį organinio seleno poveikį lipidų peroksidacijos žymens malondialdehido susidarymui laboratorinių pelių kraujyje, smegenyse bei kepenyse.
5. Įvertinti ilgalaikį organinio seleno poveikį seleno baltymo P, superoksido dismutazės, katalazės genų raiškai ir aktyvumui laboratorinių pelių smegenyse ir kepenyse.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Selenas ir jo svarba

Seleną 1817 m. Švedijos mieste Gripsholme atrado švedų chemikas Jacob Berzelius, dirbęs chemijos gamykloje, gaminančioje sieros ir azoto rūgštį [9]. Susidomėjimas biologiniu seleno vaidmeniu išaugo šeštajame dešimtmetyje, nustatčius šio elemento toksinį poveikį, pasireiškusį žiurkės širdies raumens distrofija ir ūmine kepenų nekroze [10]. 1973 m. buvo ištirtas šio elemento biocheminis vaidmuo ir nustatyta, kad seleno yra fermento glutationo peroksidazės aktyviajame centre. Po 17 metų paaiškėjo, kad yra ir daugiau fermentų ar baltymų, turinčių seleno, o tai paskatino intensyviau šio elemento poveikio žmogaus ir gyvūnų organizmams tyrimus [9].

Selenas yra 16-tai periodinės cheminių elementų lentelės grupei priklausantis nemetalas [11]. Aplinkoje jis egzistuoja elementinėje formoje (Se^0) bei selenidų (Se^{2-}), selenatų (SeO_4^{2-}) ir selenitų (SeO_3^{2-}) pavidalu [12]. Žmogaus organizme esantis Se daugiausiai gaunamas su maistu arba papildais. Maisto produktuose Se gali būti tiek organinis (pvz., selenometioninas), tiek ir neorganinis (pvz., selenitas (IV) arba selenatas (VI)) [13]. Seleno kiekis tiek gyvūninės, tiek augalinės kilmės maiste priklauso nuo jo kiekio dirvožemyje bei nuo augalų gebėjimo kaupti ir išsaugoti šį mikroelementą (augalai biosintezės reakcijose neorganinį Se verčia organiniu Se) [14]. Seleno kiekis gamtoje ir žmogaus organizme yra labai įvairus ir priklausomai nuo gyvenamojo geografinio regiono. Daugelyje Europos Sąjungos šalių, tarp jų ir Lietuvoje, tiek dirvožemyje, tiek maisto produktuose Se kiekiai yra per maži, ir tai yra viena iš Se trūkumo organizme priežasčių [15].

Mikroelementas Se yra gyvybiškai svarbus, nepaisant to, jog žmogaus organizme yra nedidelis jo kiekis [16]. Selenui būdingos katalizinė, struktūrinė, reguliacinė bei antioksidantinė funkcijos, kurios lemia įvairių hormonų, fermentų bei vitaminų veikimą, užtikrinantį darnų biocheminių bei fiziologinių procesų vyksmą žmogaus ir gyvūnų organizme. Yra duomenų, jog Se gali būti svarbus onkologinių susirgimų prevencijos veiksnys [17–19]. Tačiau taip pat buvo pastebėta, kad padidėjęs Se kaupimasis organizme gali turėti ir toksišką poveikį [20]. Apsinuodijusiems seleno, išsivystė sunki anemija, plaukų slinkimas ir aklumas [21]. Svarbu tai, kad riba tarp nepakankamo seleno kiekio ir jo pertekliaus yra gana nedidelė [22]. Todėl tiek per didelis, tiek per mažas suvartojamo Se kiekis sukelia neigiamas pasekmes žmogaus ir gyvūnų organizmams.

Rekomenduojama Se paros norma priklauso nuo geografinio regiono, rasės, mitybos, amžiaus ir kitų veiksnių. Vyresnio amžiaus žmonių organizmuose Se įsisavinimas prastėja [23]. Žmogui su maistu ar papildais reikalingas per parą gauti Se kiekis svyruoja nuo 35 iki 70 μg . Remiantis naujausiais

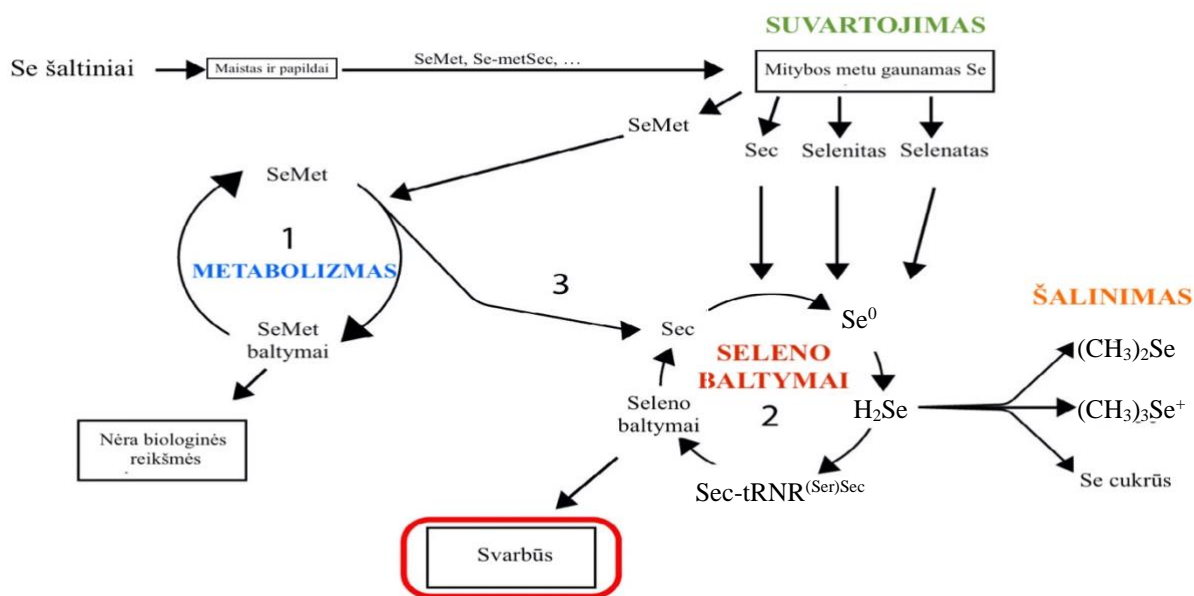
duomenimis, Se paros norma yra 55 μg [24]. Yra duomenų, jog neigiamas mikroelemento poveikis suaugusio žmogaus organizme nėra pastebimas netgi didinant paros dozę iki 400 μg [25], tačiau didesnė nei 700 μg dozė yra toksiška [24]. Vis dėlto, gyvūnai, ypač graužikai (pelės ir žiurkės), yra jautresni daug mažesnėms Se dozėms nei žmogus [26]. Organizmui gaunant mažiau nei 20 μg Se per dieną, didėja rizika susirgti ligomis, kurios siejamos su Se trūkumu organizme. Seleno nepakankamumas yra susijęs su padidėjusia širdies ir kraujagyslių, uždegiminių ir autoimuninių, neurodegeneracinių ligų, onkologinių susirgimų vystymosi rizika bei Kešano liga, kurios metu pastebima širdies raumens degeneracija [27].

1.2 Seleno apykaita ir seleno baltymas P

Su maistu ar papildais gaunamų seleno junginių cheminė prigimtis turi įtakos Se įsisavinimui organizme. Selenas, seleno dioksidas ir seleno sulfidas yra sunkiai įsisavinami, o selenitai, selenatai ir Se turinčios aminorūgštys ar jų dariniai yra lengvai pasisavinami [28]. Seleno junginiai daugiausiai absorbuojami dvylikapirštėje žarnoje ir kitose plonojo žarnyno dalyse [29]. Neorganiniai (selenitas, selenatas) ir organiniai (Se turinčios aminorūgštys) Se junginiai absorbuojami 70-95 proc. efektyvumu, tačiau skirtingais pernašos mechanizmais. Selenatas į enterocitą patenka per nuo $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ priklausomą nešiklį sąnašos būdu arba per nuo OH^- priklausomą nešiklį priešnašos būdu, selenitas – nuo Na^+ nepriklausomos pasyvios pernašos būdu, o Se turinčios aminorūgštys – per specialius nuo Na^+ priklausomus aminorūgščių nešiklius (panašiai kaip sieros turinčios aminorūgštys) [30]. Tolesnis Se junginių judėjimas iš enterocito į kraują nėra pilnai išaiškintas [31]. Selenato jonai ir SeMet į kraujotaką patenka daugiausia nepakitę, o selenitas aktyviai metabolizuojamas ląstelėse [32]. Nedideli Sec ir selenocistino kiekiai taip pat patenka į kraujotaką. Neorganiniai ir organiniai Se junginiai dažniausiai yra metabolizuojami į bendrą tarpinį produktą – vandenilio selenidą (HSe^-). Patekęs į kepenis vandenilio selenidas, katalizuojant selenofosfato sintetazei, verčiamas selenofosfatu, panaudojant jį seleno baltymų sintezei [31].

Žmogaus ląstelėse sintetunami trijų tipų Se turintys baltymai, kurių santykinis kiekis priklauso nuo su maistu suvartojamo Se formos (1 pav.). Pirmasis tipas – tai selenometionino turintys baltymai. SeMet sintetinamas augaluose ir kai kuriuose grybuose, todėl su maistu patenka į žmogaus organizmą. Selenometioniną atpažįsta metioninui specifinė aminoacil-tRNR sintetazė ir prijungia jį prie transportinės RNR. SeMet transliacijos metu gali būti įjungiamas į polipeptidinę grandinę vietoje proteogeninės aminorūgšties metionino. Nors dėl to susintetinama daugiau SeMet turinčių baltymų, tai nesukelia akivaizdaus biologinio poveikio. Gali būti, kad SeMet turintys baltymai tarnauja kaip Se

atsarga, todėl esant jo trūkumui, dalis jų yra mobilizuojama naujų seleno baltymų sintezei [31,35] ir taip užtikrinamas normalus organizmo funkcionavimas. Antrajam tipui priklauso seleno baltymai, į kurių polipeptidinę grandinę Sec yra įtraukiamas griežtai apibrėžtose vietose specifinio mechanizmo pagalba. Galiausiai, trečiasis tipas apima nepilnai apibūdintus Se turinčius baltymus, nustatytus eksperimentiškai naudojant radioaktyvų Se. Tikslus šių baltymų vaidmuo Se apykaitoje nėra žinomas [37,38].



1 pav. *Seleno apykaita organizme*

adaptuota pagal [209]

Iš organizmo Se pašalinamas su iškvėpiamu oru kaip lakus dimetilselenidas, susidaręs metilinant Se [33], o šlapime – kaip tirpus trimetilseleno jonas. Vartojant per daug Se, padidėja ir Se šalinimas. Lakus dimetilselenidas iškvėpiamam orui suteikia tipišką nemalonų kvapą, būdingą apsinuodijus seleno. Paprastai šlapime taip pat yra seleno cukrų (1-beta-metilseleno-N-acetil-D-galaktozamino ir jo pirmtako glutathiono-seleno-N-acetil-D-galaktozamino), kurie yra pašalinami [33]. Tačiau taip pat yra duomenų, kad seleno cukrūs dalyvauja Se reabsorbcijoje iš pirminio šlapimo [34], tačiau šią hipotezę reikia tirti toliau.

Seleno biologinę svarbą lemia ne pats mikroelementas, o klasė baltymų, savo struktūroje turinčių seleno. Tai seleno baltymai, kurių polipeptidinėje grandinėje yra aminorūgštis selenocisteinas [35,36]. Žmogaus selenoproteomą koduoja 25 genai. Seleno baltymams priklauso fermentų glutathiono peroksidazių, tioredoksino reduktazių, jodtironino dejonidazių šeimos baltymai ir nefermentiniai baltymai SelP, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelR, SelT, SelV, SelW. Jų funkcijos žmogaus organizme yra itin įvairios. Daliai seleno baltymų (pvz., glutathiono peroksidazei, tioredoksino reduktazei, SelP) būdingas antioksidantinis aktyvumas, todėl jie dalyvauja ląstelių antioksidantinėje

gynyboje bei palaiko ląstelių redokso homeostazę. Jie sintetinami kepenyse ir dalyvauja gynyboje nuo oksidacinio streso, dalyvaujant oksidacijos-redukcijos reakcijose, neutralizuojančiose ADF [36,37]. Seleno baltymai gali pagerinti imuninį atsaką dėl savo priešuždegiminių, chemoterapinių ir antivirusinių savybių [36] jie taip pat palaiko skydliaukės hormonų ir kalcio homeostazę, dalyvauja ląstelių proliferacijos ir apoptozės reguliavimo procesuose, yra svarbūs smegenų ir raumenų vystymuisi ir funkcionavimui [38], taip pat būtini normaliai reprodukcinės sistemos veiklai [39][40]. Yra duomenų, siejančių širdies ir kraujagyslių, endokrininės, imuninės ir nervų sistemos ligas su pakitusia seleno baltymų apykaita [36].

Seleno baltymas P (SelP), esantis 5q31 chromosomoje ir koduojamas SELENOP geno, yra tarpląstelinis glikoproteinas, sintetinamas daugiausia kepenyse ir išskiriamas į kraujo plazmą. Tai daug funkcijų atliekantis baltymas. Pagrindinė šio baltymo funkcija susijusi su jo dalyvavimu Se pernašoje ir jo tiekime iš šio organo į kitus audinius, kas padeda palaikyti tinkamą Se kiekį audiniuose [41,42]. Kitas svarbus jo vaidmuo – tai dalyvavimas antioksidantiniuose procesuose. Manoma, kad jis pasižymi glutationo peroksidazei būdingu aktyvumu, peroksinitrito šalinimo ir metalų surišimo aktyvumu [41,42]. Yra nustatyta, kad pelės smegenyse vyksta 24 seleno baltymus koduojančių genų raiška. Sep15, SelM, SelK, SelP, GPx4 and SelW seleno baltymus koduojančių genų raiškos lygiai smegenyse yra didesni nei kitų seleno baltymų [43]. SELENOP raiška buvo nustatyta neuronuose, astrocituose ir ependiminėse ląstelėse, kurios yra atsakingos už smegenų skysčio gamybą [44,45]. Nepaisant SelP atradimo 1973 m., pastaruoju metu šis baltymas tapo ypatingu tyrimų objektu dėl jo, kaip įvairių ligų prognostinio žymens panaudojimo galimybių. Įrodyta, kad turinčių antsvorio ar nutukusių pacientų organizme SelP koncentracija yra didesnė [46], ypač esant visceraliniam nutukimui [47,48],[49,50]. Padidėjęs kepenų SelP kiekis siejamas su sumažėjusia gliukozės tolerancija ir padidėjusiu gliukozės kiekiu nevalgius [51,52]. SELENOP raiškos sumažėjimas sukelia seleno baltymų trūkumą ir įvairius oksidacinio streso sutrikimus, o padidėjimas siejamas su atsiradusiu atsparumu insulinui, kuris gali sukelti II tipo cukrinį diabetą [53,54]. Jei su maistu Se gaunama nepakankamai (ir papildai nėra vartojami), negali vykti efektyvi SelP sintezė. Dėl šios priežasties gaunamo Se kiekis ir seleno baltymų raiškos ar aktyvumo pokyčiai yra susiję su daugelio ligų vystymusi.

1.3 Geležies, cinko ir vario svarba organizmui bei kepenų vaidmuo šių metalų homeostazėje

Geležis, varis ir cinkas yra būtinieji mikroelementai, gyvybiškai svarbūs daugeliui organizmų, taip pat ir žmogui. Kita vertus, esant šių elementų trūkumui arba pertekliui, pasireiškia jų neigiamas poveikis organizmui. Todėl geležies, vario ir cinko homeostazė yra griežtai kontroliuojama viso kūno, audinių, ląstelių ir tarpląsteliniam lygmenyse daugelio mechanizmų pagalba, kurie apima šių metalų pasisavinimą, saugojimą, išskyrimą iš ląstelių bei panaudojimą [55]. Šiuose homeostazės reguliacijos mechanizmuose svarbų vaidmenį atlieka įvairūs baltyminiai receptoriai, nešikliai, transkripcijos veiksniai. Kepenys vaidina pagrindinį ir lemiamą vaidmenį šių metalų homeostazės palaikyme. Jos atlieka metalų kaupimo funkciją bei reguliacinę funkciją, kadangi sintetina daugelį baltymų ar reguliacinių molekulių, dalyvaujančių šių elementų apykaitoje. Todėl kepenų būklė turi įtakos metalų homeostazės palaikymui. Kita vertus, metalų lygio disbalansas taip pat daro įtaką normaliai kepenų veiklai. Yra nustatyta, kad, pvz., esant cinko trūkumui, paūmėja kepenų fibrozė ir steatozė kartu su įvairiais medžiagų apykaitos sutrikimais, tame tarpe atsparumu insulinui, dislipidemija, geležies pertekliumi, hepatine encefalopatija [56–59].

Geležis yra pereinamasis metalas, dalyvaujantis oksidacijos-redukcijos reakcijose, todėl egzistuoja kaip oksiduota (Fe^{2+}) ar redukuota (Fe^{3+}) geležis. Žmogaus organizme geležis gali įeiti į baltymų sudėtį būdama prostetinės grupės – hemo komponentu (pvz., hemoglobinas, mioglobinas, citochromo baltymai, katalazė, azoto oksido sintetazė), būdama geležies sieros sancaupų sudėtyje (pvz., kvėpavimo kompleksai I-III, kofermentas Q10, DNR praimazė) arba veikdama kaip geležies savo sudėtyje neturinčių baltymų kofaktorius. Todėl geležis yra svarbi deguonies pernašoje ir kaupime, mitochondrijų kvėpavime, DNR replikacijoje, antioksidantinėje apsaugoje, ląstelių proliferacijoje ir diferenciacijoje, ksenobiotikų metabolizme, steroidų sintezėje ir kituose procesuose [60]. Kita vertus, geležis taip pat gali būti žalinga ir sąlygoti laisvųjų radikalų susidarymą Fentono reakcijoje, kurie gali pažeisti DNR, baltymus ir lipidus [61]. 70 kg sveriančio žmogaus kūne yra 3500 – 4000 mg geležies. Didžioji jos dalis (apie 65 proc.) yra eritrocitų hemoglobine, apie 10 proc. yra mioglobine, citochromuose ir įvairiuose geležies turinčiuose fermentuose. Likusioji dalis geležies yra retikuloendotelinės sistemos (RES) makrofaguose, hepatocituose feritino pavidalu bei kaulų čiulpuose [62,63].

Maiste esanti geležis absorbuojama dvylikapirštėje žarnoje. Ji gali pasilikti enterocituose arba patekusi į kraujotaką ir susijungusi su kraujo plazmos baltymu transferinu (Tf) gali būti pernešama į audinius [64]. Daugiausiai transferino sintetinama kepenyse, mažiau – smegenyse, inkstuose, sėklidėse. Geležies pertekliaus sąlygomis, geležies kiekis serume paprastai yra didesnis nei transferino geležies

surišimo pajėgumas, todėl padidėja geležies, nesusijusios su transferinu, kiekis, kuris turi didesnę reaktyvumą. Geležis gali patekti į ląsteles dviem pagrindiniais būdais: 1) kaip transferino-geležies kompleksas (angl. *transferrin-bound iron; TBI*) endocitozės būdu per transferino receptorius (TfR); 2) su transferinu nesusijusi geležis (angl. *nontransferrin-bound iron; NTBI*) per divalenčių metalų jonų nešiklį (angl. *divalent metal ionic transporter; DMT*) [65]. Kepenys atlieka dvejopą vaidmenį geležies apykaitoje. Jos atlieka reguliacinę funkciją, kadangi sintetina hormoną hepcidiną, kontroliuojantį geležies išsiskyrimą iš enterocitų ir makrofagų į kraujotaką bei leidžiantį tiksliai reguliuoti ir palaikyti fiziologinį geležies lygį kraujo plazmoje. Taip pat kepenys atlieka geležies saugojimo funkciją, kadangi įsivaina šį elementą iš kraujotakoje esančių TBI kompleksų, taip pat su transferinu nesusijusių geležį bei geležį iš hemoglobino-haptoglobino ir hemo-hemopeksino kompleksų [66]. Hepatocitai, kaip ir dvylikapirštės žarnos enterocitai ir RES makrofagai, savo plazminėje membranoje be transferino receptorių, kurie padeda geležiai patekti į ląstelės vidų, dar turi ir kitą geležies nešiklį – feroportiną (Fpn1), kuris yra vienintelis nešiklis, leidžiantis iš ląstelės išeiti neheminei geležiai [67]. Geležis kaupiama hepatocituose baltymo feritino pavidalu (apie 95 proc.), kurio viena molekulė geba sujungti 4500 geležies atomų. Nors geležies atsargų feritino pavidalu yra daugiausiai kepenyse, tokiu pavidalu ji kaupiama ir smegenyse, blužnyje, kaulų čiulpuose. Tačiau kai atsiranda geležies perteklius, daugiau geležies imama kaupti hemosiderino pavidalu. Esant nuolatiniam geležies pertekliui, susikaupia dideli feritino ir hemosiderino kiekiai. Sumažėjus geležies kiekiui, suaktyvėja lizosominis feritino ir hemosiderino skaidymas, lizosomose susidaro didelė Fe^{2+} koncentracija. Fiziologinėmis sąlygomis ląstelėse susidaręs vandenilio peroksidas gali prasiskverbti pro membranas ir patekti į lizosomas, kur, jei yra didelė Fe^{2+} koncentracija, jis bus metabolizuojamas Fentono reakcijos metu ir susidarys dideli kiekiai hidroksilo radikalų [68]. Šie radikalai, patekę į citoplazmą, gali sąlygoti kepenų ląstelių pažeidimus ir nekrozę. Todėl, esant nuolatiniam geležies pertekliui, ilgainiui gali išsivystyti kepenų, kurios yra pagrindinė geležies saugykla, cirozė arba kepenų ląstelių karcinoma [69]. Ląstelės lygmenyje geležies homeostazę reguliuoja geležies kiekį reguliuojantys baltymai 1 ir 2 (IRP1 ir IRP2). IRP jungiasi prie geležies atsako elementų (IRE), esančių mRNR netransliuojamose srityse, tokiu būdu keičiant DMT1, feritino, Fpn1 ir TfR1 raišką [70,71].

Cinkas egzistuoja kaip divalentis katijonas (Zn^{2+}), kuriam fiziologinėmis sąlygomis nėra būdingas redokso aktyvumas, o tai paaiškina jo biologinę svarbą daugybėje biologinių procesų [72]. Apie 85-90 proc. organizme esančio cinko įeina į daugiau kaip 300 metalofermentų sudėtį, todėl jis atlieka struktūrinę ir katalizinę funkcijas, o taip pat veikia kaip viduląstelinis ir tarpląstelinis signalinių kelių komponentas [73]. Cinkas yra svarbus normaliam organizmo augimui, baltymų metabolizmui, ląstelės membranų vientisumui, DNR reparacijai, mitoziniam ląstelių dalijimuisi, kolageno sintezei, imuninei sistemai. Jis taip pat būtinas genų raiškos reguliacijai, kadangi yra transkripcijos veiksmų

struktūrinių motyvų – „cinko pirštelių“ sudėtyje, kurie yra svarbūs sąveikai su specifinėmis DNR sekomis. Žmogaus organizme yra apie 2 g cinko. Apie 60 proc. viso organizmo cinko yra raumenyse, 20-30 proc. – kauluose, 8 proc. – odoje ir plaukuose, apie 5 proc. – kepenyse, 2 proc. – žarnyne ir kasoje, 1,6 proc. – centrinėje nervų sistemoje, o likę 2–3 proc. – kituose audiniuose [74]. Kraujo serume cinkas sudaro tik ~0,1 proc. viso organizmo cinko, iš kurio ~ 80 proc. yra susijungęs su albuminu, o ~20 proc. yra susiję su α_2 -makroglobulinu [75].

Žinduoliuose yra nustatyta daugiau nei 30 baltymų, reikalingų sisteminei ir ląstelinei cinko homeostazei palaikyti. Kepenys yra pagrindinis už cinko homeostazės palaikymą atsakingas organas [76,77]. Zn homeostazę reguliuoja baltymai metalotioneinai (MT) ir dviejų tipų nešikliai: cinko nešikliai (angl. *zinc transporters; ZnT*) bei cinką importuojantys baltymai ZIP (angl. *Zrt-/Irt-like protein*). Taip pat optimalaus Zn kiekio pataikymui svarbus ir prie metalo atsako elemento (MRE) besijungiantis transkripcijos veiksnys Mtf [78,79]. Nustatyta, kad Mtf1 yra pagrindinis tarpląstelinis cinko kiekio reguliatorius, sukeliantis ZnT1 ir metalotioneinų transkripcijos pokyčius, reaguojant į padidėjusį cinko kiekį ir kitus streso dirgiklius, tokius kaip oksidacinis stresas ir hipoksija [80–82].

Varis dėl gebėjimo egzistuoti Cu^+ ir Cu^{2+} formomis dalyvauja oksidacijos-redukcijos reakcijose. Jis, kaip kofaktorius dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose, tame tarpe mitochondrijų oksidaciniame fosforiliniame, tirozino ir neuromediatorių metabolizme, redokso homeostazėje (pvz., įeina į antioksidantinio fermento superoksido dismutazės sudėtį) ir tarpląstelinio užpildo remodeliavime [83,84]. Žmogaus organizme yra apie 110 mg vario: apie 10 mg – kepenyse, apie 9 mg – smegenyse, 6 mg – kraujyje, griaučiuose ir kaulų čiulpuose – 46 mg, griaučių raumenyse – 26 mg.

Su maistu gaunamas varis absorbuojamas dvylikapirštėje žarnoje per Cu pernašos baltymą 1 (Ctr1) [85]. Patekęs į kraujotaką jis pernešamas sujungtas su albuminu, α_2 -makroglobulinais – ceruloplazminu ar transkupreinu [85–87]. Daugiau nei 90 proc. plazmoje esančio vario yra neatskirama ceruloplazmino dalis. Tarpląstelinį varį taip pat gali prijungti metalotioneinai ir glutationas. Kepenyse šis metalas yra prijungiamas prie apoceruloplazmino, kad susidarytų ceruloplazminas ir šiame organe sukauptas didžiausias Cu kiekis [88,89]. Cu perteklius pašalinamas su išmatomis, išsiskiriant su tulžimi (pagrindinė endogeninio Cu pašalinimo forma), arba kaip neabsorbuoti metalo jonai. Vario-ceruloplazmino kompleksas iš kepenų gali patekti į kraujotakos sistemą ir būti pernešamas į periferinius audinius. Patekęs į ląsteles, varis Cu šaperonų pagalba yra nukreipiamas į specifinius baltymus, arba prijungiamas prie metalotioneinų saugojimui [90]. Pagrindiniai Cu šaperonai yra COX17 (jis atiduoda Cu citochromo c oksigenazei), CCS (jis perkelia Cu į superoksido dismutazę 1) ir ATOX1 (jis tiekia varį Cu-ATPazėms (ATP7A ir ATP7B)) [85,91,92].

1.4 Geležies, cinko ir vario funkcijos nerviniame audinyje bei jų homeostazės sutrikdymo pasekmės

Žmogaus smegenyse iš mikroelementų daugiausiai yra geležies, kiek mažiau cinko ir vario [92–95]. Smegenyse geležis dalyvauja daugybėje procesų. Ji reikalinga kaip kofaktorius fermentams, dalyvaujantiems neurosiuntiklių sintezėje, taip pat atlieka pagrindinį vaidmenį centrinėje nervų sistemoje tinkamai mielinizuojant neuronų aksonus [96], yra svarbi sinapsių plastiškumui [97] ir neuronų energinės būklės reguliacijai. Tyrimai su gyvūnų modeliais taip pat pabrėžia svarbų geležies vaidmenį nervų sistemos vystymesi. Nustatyta, jog esant geležies trūkimui ankstyvaisiais vaisiaus vystymosi etapais, išsivysto ūmus smegenų veiklos sutrikimas su ilgalaikiais neigiamais padariniais net gi po geležies trūkumo pašalinimo [98]. Cinkas yra antrasis pagal gausumą smegenyse esantis mikroelementas po geležies, būtinas normaliai smegenų veiklai [99]. Šis elementas, kaip minėta anksčiau, yra daugelio fermentų ir metalo baltymų kofaktorius, jis stabilizuoja transkripcijos veiksnius, taip pat dalyvauja apsaugant smegenis nuo oksidacinio streso ir uždegimo [100,101]. Cinkas atlieka svarbų vaidmenį sinapsių plastiškume, neurogenezės reguliavime, neuronų migracijoje ir diferenciacijoje, nervinio impulso sklidimo moduliavime [102,103]. Varies yra trečiasis labiausiai paplitęs mikroelementas smegenyse [104]. Jis yra fermentų kofaktorius, tarpininkaujantis neuromediatorių sintezei ir reikalingas antioksidantinei apsaugai, taip pat svarbus neuronų mielinizacijoje, sinapsių veikimui [105]. Todėl vario homeostazė yra būtina normaliai CNS veiklai. Pavyzdžiui, Menkes liga, kuriai būdingas vario trūkumas, yra susijusi su demielinizacija ir neurodegeneracija [106]. Taigi sisteminis Cu lygis turi būti palaikomas siaurame diapazone, siekiant užtikrinti normalius biocheminius procesus. Taigi, geležies, vario ir cinko homeostazės palaikymas tiek visame organizme, tiek ir smegenyse yra būtinas normaliai viso organizmo, tiek smegenų fiziologijai. Priešingu atveju, vario, cinko ir geležies homeostazės išderinimas yra susijęs su patofiziologija. Yra duomenų, jog šių elementų kiekio pusiausvyros sutrikdymas gali sukelti daugelio neurodegeneracinių sutrikimų atsiradimą ir (arba) progresavimą [107–110].

Cu, Zn ir Fe vaidina svarbiausią vaidmenį neurodegeneracijoje, nes šie metalai gali turėti įtakos baltymų struktūrai (neteisingam susilankstymui) ir oksidacinio streso atsiradimui [111]. Smegenys yra ypač jautrios laisvųjų radikalų pažeidimams ir oksidaciniam stresui dėl didelio polinesočiųjų riebalų rūgščių buvimo jose. Šios riebalų rūgštys įeina į sudėtinių lipidų, kurie yra neuronų membranų komponentai, sudėtį [112]. Atsiranda vis daugiau įrodymų, kad sutrikdyta vario homeostazė Alzheimerio liga sergantiems pacientams sukelia oksidacinį stresą ir neurodegeneraciją [113], ko pasekoje sutrinka atmintis. Didelis vario kiekis smegenyse ir jo redoksinis aktyvumas reikalauja griežtai kontroliuoti Cu homeostazę, kad būtų išvengta oksidacinio centrinės nervų sistemos pažeidimo dėl

nekontroliuojamų vario sukeltų Haberio-Veiso ir Fentono tipo reakcijų. Vario įtraukimas į metalotioneinių sudėtį yra vienas iš ląstelės gynybos mechanizmų, skirtų apsaugoti ląstelių struktūras nuo Cu toksiškumo ir užkirsti kelią oksidacinei žalai, pavyzdžių [114]. Cinko trūkumas arba perteklius veikia neurotoksiškai ir dalyvauja neurologinių ligų, tokių kaip amiotrofinė lateralinė sklerozė, depresija, šizofrenija, Parkinsono liga ir Alzheimerio liga, patogenezėje [115–117]. Cinko ir vario trūkumas ar perteklius smegenų vystymosi metu apibūdinami kaip autizmo pobūdžio sutrikimų rizikos veiksniai [118–120]. Naujausiuose tyrimuose geležies pertekliaus toksiškumo reiškiniai buvo pastebėti sergant Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligomis, epilepsija ir insultu bei trauminiu smegenų sužalojimu [121,122].

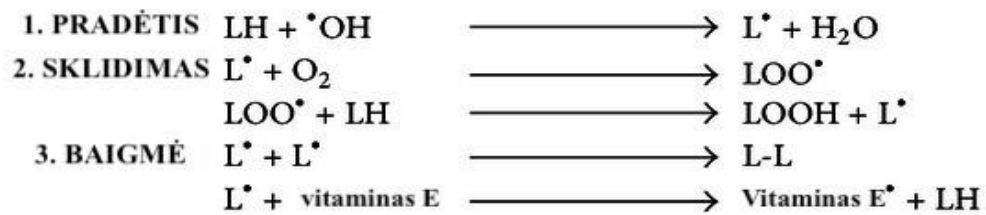
Atsižvelgiant į tai, kad mikroelementų lygio atkūrimas ar manipuliavimas smegenyse yra viena iš naujų gydymo strategijų neurodegeneracinių ir kitų ligų atvejais [123], atsiranda informacijos trūkumas, nes neaišku, kokia yra fiziologinė konkretaus metalo koncentracija smegenyse. Mokslinėje literatūroje pateikiama gana prieštaringa informacija apie tai, kokias mikroelementų geležies, cinko ir vario koncentracijas reikėtų laikyti fiziologinėmis žmogaus smegenyse. Elementų koncentracijų nustatymas ne tik žmogaus organizme, bet ir gyvūnų organuose ir audiniuose taip pat yra svarbus, nes suteikia tam tikros informacijos apie fiziologines ir patologines gyvūnų būkles. Elementų kiekio normos reikšmės kiekviename organe ir audinyje reikalingos kaip atskaitos duomenys eksperimentams su gyvūnais. Deja, bet šių metalų lygio įvertinimas eksperimentinių gyvūnų modeliuose apsiriboja labai nedaugeliu gyvūnų rūšių, dažniausiai tyrimams naudojant peles ir žiurkes. Kita vertus, palyginus mokslinėje literatūroje pateikiamus tyrimų rezultatus kartais parodomi dideli nustatytų mikroelementų koncentracijų skirtumai smegenyse. Šie skirtumai gali būti susiję su skirtingais audinių paruošimo metodais, nestandartizuotais matavimų protokolais ir skirtingos lyties, amžiaus ar mitybos gyvūnų naudojimu. Pavyzdžiui, nors vieno tyrimo metu nustatyta, kad Wistar žiurkių smegenyse cinko koncentracija yra $32,93 \pm 0,12$ mg/kg [124], kito tyrimo rezultatai parodė, kad toje pačioje smegenų srityje cinko koncentracija yra $15,00 \pm 5,50$ mg/kg [125].

Ir nors duomenų apie fiziologines biogeninių elementų koncentracijas žmogaus ir gyvūnų smegenyse dar galima rasti, tačiau beveik nėra duomenų apie tai, kaip seleno trūkumas ir ypač perteklius gali paveikti tam tikrų mikroelementų, tame tarpe cinko, vario, geležies homeostazę. Kaip neseniai apžvelgė Yildiz ir kt. [126,127] Se gali išderinti Zn homeostazę, dėl kurios gali sutrikti metalotioneinių sistema, dėl kurios gali atsirasti oksidacinių DNR pažeidimų arba tai gali turėti įtakos vėžio vystymuisi [126,127]. Taip pat yra nustatyta, kad nepakankamai Se ar Se perteklių gavusių BALB/c pelių hipokampe ir žievėje padidėjo geležies kiekiai [128]. Stanevičienė su bendraautoriais [129] parodė, jog laboratorinėms pelių, 8 savaites girdytų neorganiniu Na_2SeO_3 tirpalu (0,2 mg Se/kg ir 0,4 mg Se/kg kūno masės) smegenyse susikaupė palyginti nedidelis Se kiekis, lyginant su kepenimis bei inkstais,

tačiau abi naudotos seleno dozės sutrikdė geležies homeostazę ir padidino geležies kaupimąsi tirtuose organuose. Vis tik šiai seleno trūkumo ar pertekliaus poveikio kitų elementų homeostazei spragai užpildyti reikalingi gausesni tyrimai.

1.5 Oksidacinis stresas ir jo žymuo malondialdehidas

Ląstelėse, vykstant medžiagų apykaitai, susidaro aktyvios deguonies formos (ADF) bei laisvieji radikalai (LR), nuo kurių poveikio jos geba apsisaugoti evoliucijos eigoje išvystytą antioksidantinę apsaugos mechanizmų pagalbą. Organizme fiziologinėmis sąlygomis ADF (superoksido radikalai ($O_2^{\cdot-}$)), vandenilio peroksidas (H_2O_2), hidroksilo radikalai ($\cdot OH$) ir kiti) susidaro kaip šalutiniai deguonies apykaitos produktai [130,131]. Nuo jų susidarymo gali priklausyti tokie procesai, kaip baltymų fosforilinimas, transkripcijos veiksnių aktyvinimas, apoptozė, imunitetas ar ląstelių diferenciacija [132]. Nepaisant to, aplinkos veiksniai (pvz., UV, jonizuojanti spinduliuotė, teršalai, sunkieji metalai) ir ksenobiotikai taip pat gali labai padidinti ADF susidarymą. Todėl dėl aplinkos sukkelto neigiamo poveikio ir ląstelių disfunkcijos, ADF lygis gali smarkiai padidėti ir padaryti žalą organizmo ląstelėms. Tuomet ląstelėse susidaro tokios sąlygos, kai ADF gamyba ir kaupimasis viršija antioksidantinės sistemos pajėgumą juos neutralizuoti ir tuomet ląstelė patiria oksidacinį stresą. ADF perteklius tampa žalingu, kadangi ADF ir LR pažeidžia ląstelių struktūras, jų makromolekules – baltymus, lipidus ir nukleorūgštis [133]. LR gali atakuoti nukleorūgščių azotines bazines, aminorūgščių šoninius radikalus ar nesočiųjų riebalų rūgščių dvigubuosius ryšius. Ypatingai jautrios oksidacinio streso poveikiui yra smegenys, nes jose yra daug polinesočiųjų riebalų rūgščių, joms reikalingas didelis deguonies kiekis, jose yra gana didelė geležies koncentracija bei mažas antioksidantų kiekis. ADF sukelia membranos lipidiniame dvisluoksnyje esančių nesočiųjų riebalų rūgščių, turinčių dvigubąjį C=C ryšį, oksidaciją [134]. Lipidų peroksidacija (LPO) vyksta trimis etapais: pradėtimi, sklidimu ir baigme (2 pav.). LPO metu, prooksidantas hidroksilo radikalas atima H iš polinesočiosios riebalų rūgšties ir susidaro lipidinis radikalas L^{\cdot} . Sklidimo etapo metu šis radikalas reaguoja su O_2 ir susidaro lipidinis peroksidiradikalas (LOO^{\cdot}), kuris toliau atima H iš kitos riebalų rūgšties, paversdamas ją lipidiniu radikalu L^{\cdot} , o pats tuomet virsta lipidiniu hidroperoksidu (LOOH). Tolimesnė reakcijų grandinė tęsiama tol, kol neįvyksta baigmės reakcija. Reakcijos baigmės etape, antioksidantai, pavyzdžiui, vitaminas E atiduoda vandenilį LOO^{\cdot} , pats virsdamas vitamino E radikalu, kuris reaguoja su kitu LOO^{\cdot} taip susidarant neradikaliniams produktams [135].



2 pav. *Grandininė lipidų peroksidacijos reakcija*

adaptuota pagal [210]

Yra atlikta daugybė tyrimų, įrodančių oksidacinio streso poveikį įvairių ligų (pvz., neurologinių, onkologinių, širdies ir kraujagyslių ligų, cukrinio diabeto, medžiagų apykaitos sutrikimų, uždegiminių ligų) atsiradimui ir (arba) progresavimui bei senėjimo patogenezei [136]. Oksidacinio streso sukelti pokyčiai smegenyse gali būti siejami su įvairiais psichikos sutrikimais [137].

Oksidacinio streso sukeltos lipidų peroksidacijos metu susidaro įvairūs oksiduoti junginiai. Pagrindiniai pirminiai LPO produktai yra lipidų hidroperoksidai, kuriems būdingas didelis toksiškumas. Jie yra nestabilūs, todėl iš jų susidaro įvairūs aldehydai, kurie yra antriniai LPO produktai. Tai malondialdehidai (MDA), heksanalis, propanalis, 4-hidroksinonenalis (4-HNE) [138,139]. Todėl LR lygis ir daroma žala ląstelei gali būti įvertinta netiesiogiai kaip žymenis naudojant LPO produktus, pvz., vieną jų – MDA. Kita vertus, antioksidantinių fermentų, pvz., glutationo peroksidazės, superoksido dismutazės, katalazės aktyvumo ar genų raiškos pokyčiai taip pat atspindi oksidacinio streso sąlygas, o netiesiogiai ir ADF bei LR susidarymo lygį, ląstelėse [140].

MDA – tai maža, bet reaktyvi molekulė, kuri yra vienas dažniausiai naudojamų omega-3 ir omega-6 riebalų rūgščių peroksidacijos žymenų, atspindinčių bendrą LPO ir ląstelių membranų pažeidimo lygį [8]. Oksidacinio streso metu MDA apykaitos produktas acetaldehidai yra paverčiamas malondialdehido ir acetaldehido aduktais. Šie MDA aduktai yra žalingi, kadangi skatina vidumolekulinių arba tarpmolekulinių skersinių ryšių susidarymą tarp baltymų/DNR [138]. Tai gali pakeisti šių biomolekulių struktūras bei biochemines savybes. Tokie pažeidimai gali kauptis senstant ir sergant įvairiomis lėtinėmis ligomis [141]. Daugelio tyrimų, atliktų su lėtinėmis ligomis sergančiais žmonėmis ar įvairiais gyvūnų modeliais, rezultatai parodė padidėjusį LPO produktų kiekį [138,139]. Taip pat nustatyta, jog trūkstam antioksidantų, padidėja MDA lygis gyvūnų audiniuose [142]. Laboratorinis MDA aptikimas ir kiekybinis įvertinimas pagrįstas jo gebėjimu kondensuotis su tiobarbitūro rūgštimi, kad susidarytų intensyvios raudonos spalvos fluorescuojantis chromogeno aduktas, kuris nustatomas spektrofotometrijos metodu [135].

1.6 Ląstelių antioksidantinė sistema

Siekiant užkirsti kelią ADF sukeltai oksidacinei žalai arba ją sumažinti, žmogus ir kiti organizmai naudojami antioksidantine gynybos sistema, galinčia sustabdyti ADF ir LR bei jų antrinių metabolitų susidarymą ar paversti juos mažiau toksiškais junginiais. Organizmo antioksidantinė sistema susideda iš nefermentinių antioksidantų, kurie gali būti egzogeniniai, gaunami su maistu (pvz., vitaminai A, C ir E) ir endogeniniai, sintetinami organizme (pvz., redukuotas glutationas, kofermentas Q, feritinas, šlapimo rūgštis) bei fermentinių antioksidantų (pvz., superoksido dismutazės (SOD), katalazės (CAT), glutationo peroksidazės (GPx), glutationo reduktazės (GR)) [143]. Fermentai SOD, CAT ir GPx sudaro pirmąją gynybinę liniją, apsaugančią ląsteles nuo LR atakos. SOD dėka superoksido radikalas paverčiamas vandenilio peroksidu (H_2O_2) ir molekulinio deguonimi. Susikaupęs H_2O_2 yra toksiškas kūno audiniams ar ląstelėms. Esant Fe^{2+} , Fentono reakcijos metu jis paverčiamas kenksmingu hidroksilo radikalu [144]. Katalazė, kurios gausu peroksisomose, bei glutationo peroksidazė, kurios yra citozolyje ir mitochondrijose, suskaido H_2O_2 ir sumažina LR daromą žalą [145].

Superoksido dismutazė yra pirmasis ADF neutralizavime dalyvaujantis fermentas ir galingiausias antioksidantas ląstelėje. Jis katalizuoja dviejų superoksido anijono molekulių dismutaciją į H_2O_2 ir O_2 , todėl žalingas superoksido anijonas tampa mažiau pavojingu. SOD yra metalofermentas, kurio veikimui reikalingas metalo kofaktorius. Kofaktoriumi gali būti geležis (Fe), cinkas (Zn), varis (Cu) ar manganas (Mn) [144,146]. Fe-SOD dažniausiai randama prokariotuose ir kai kurių augalų chloroplastuose, Mn-SOD – prokariotuose ir eukariotų mitochondrijose, o Cu/Zn-SOD vyrauja eukariotų citozolyje, bet taip pat randama chloroplastuose ir peroksisomose [145]. Žmonėms ir kitiems žinduoliams būdingos trys SOD formos: SOD1 yra citoplazmoje, SOD2 – mitochondrijose, o SOD3 – tarpląstelinėje terpėje. SOD1 yra dimeras, o SOD2 ir SOD3 yra tetramerai. SOD1 ir SOD3 aktyviuosiuose centruose yra Cu ir Zn, SOD2 turi Mn. Genai yra atitinkamai 21, 6 ir 4 chromosomose (21q22.1, 6q25.3 ir 4p15.3-p15.1) [145]. Mokslininkai pastebėjo ryšį tarp SOD trūkumo ir įvairių patologijų. Pavyzdžiui, Zn neturinti SOD1 buvo susijusi su šeiminės amiotrofinės lateralinės sklerozės išsivystymu [147,148]. Dayal nurodė, kad SOD trūkumas skatino smegenų kraujagyslių hipertrofiją ir kraujagyslių disfunkciją esant hiperhomocisteinemijai [149].

Katalazė – tai fermentas, SOD katalizuojamos reakcijos metu susidariusį H_2O_2 suskaidantis į vandenį ir molekulinį deguonį. Tai tetramerinis holofermentas, kiekviename subvienete turintis po vieną hemą. Du iš šių subvienetų taip pat gali prijungti po vieną NADPH molekulę. Fermento veikimui kaip kofaktorius reikalinga Fe arba Mn [150,151]. Žmogaus CAT genas yra 11 chromosomoje (11p13). Katalazei būdingas dvejopas aktyvumas: katalitinis (H_2O_2 suskaido į H_2O ir O_2) ir peroksidinis (oksiduoja mažos molekulinės masės alkoholius, esant mažoms H_2O_2 koncentracijoms). Tai labai

efektyvus fermentas, kuris gali per vieną sekundę suskaidyti milijonus vandenilio peroksido molekulių. CAT veikimas vyksta dviem etapais: hemo Fe^{+3} redukuoja vieną H_2O_2 molekulę į vandenį, susidarant $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ oksiferilui, turinčiam porfirino katijono radikalą. Šis tarpinis reakcijos junginys tuomet oksiduoja antrąją H_2O_2 molekulę, susidarant H_2O ir O_2 [151]. Fermentas daugiausia randamas peroksisomose, bet jo nėra žinduolių ląstelių mitochondrijose [152]. Todėl H_2O_2 skaido dar kitas fermentas – glutationo peroksidazė, randama mitochondrijose ir citozolyje. Esant nedidelėms H_2O_2 koncentracijoms, ši molekulė gali reguliuoti kai kuriuos fiziologinius procesus, tokius kaip signalo perdavimas ląstelių proliferacijos metu, ląstelių apoptozė, trombocitų aktyvinimas bei normalios redokso pusiausvyros palaikymas [153], tačiau didelės H_2O_2 koncentracijos yra labai žalingos ląstelėms [143]. Įdomu tai, kad keletas tyrimų rezultatų parodė ryšį tarp katalazės ir žmogaus vėžinių susirgimų, tačiau gauti rezultatai yra prieštaringi: nuo CAT aktyvumo sumažėjimo krūties vėžio, burnos ir kasos karcinomos atvejais [154,155] iki CAT kiekio ir aktyvumo padidėjimo [156] piktybinės mezoteliomos, gaubtinės ir tiesiosios žarnos karcinomos atvejais [157].

2 TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimas buvo atliekamas siekiant nustatyti seleno poveikį laboratorinių pelių audiniams. Tyrimui pasirinkta organinė seleno forma – selenometioninas. Bandymai atlikti su 4-6 savaičių amžiaus baltosiomis laboratorinėmis BALB/c pelėmis, sveriančiomis 20 – 25 gramus. Tyrimai atlikti su 24 patelėmis. Tyrimo objektas buvo pelių kraujas, smegenys ir kepenys.

Pelės buvo atvežtos iš LSMU Veterinarijos akademijos vivariumo bei 7 dienas laikomos karantino sąlygomis. Gyvūnų laikymui buvo sudarytos optimalios sąlygos: santykinė oro drėgmė 55 ± 10 proc., patalpų temperatūra $\sim 20^{\circ}\text{C}$, santykinis šviesos režimas diena/naktis – 12/12. Pelės buvo šeriamos visaverčiu maistu ir girdomos vandentiekio geriamuoju vandeniu *ad libitum*. Visi eksperimentai atlikti remiantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymu, gavus bioetikos centro leidimą darbui su gyvūnais Nr. BEC-MVB(B)-367.

2.2 Tyrimo planavimas

Tyrimą sudarė du etapai. Pirmojo etapo metu buvo vertinama Se, Fe, Zn ir Cu koncentracijos ir lipidų peroksidacijos žymens malondialdehido koncentracija pelių kraujyje ir organuose. Antrojo etapo metu buvo vertinamas fermento katalazės aktyvumas bei CAT, SOD1 ir SelP genų raiška pelių kepenyse ir smegenyse.

Atsitiktiniu būdu parinkus peles, buvo sudarytos dvi grupės: kontrolinė ir eksperimentinė. Kiekviena grupė sudarė po 6 peles. Pelės buvo sužymėtos geltonos spalvos pikrino rūgštimi, kuri, reaguodama su aminorūgštimis, sudaro pikratus, dėl to spalva ant gyvūno kailiuko neišblukusi išlieka ilgą laiką.

Kontrolinės grupės pelės girdomos geriamuoju vandentiekio vandeniu.

Seleno poveikio įvertinimui pasirinkta organinė Se forma – selenometioninas ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$; Sigma–Aldrich, Vokietija). Seleno koncentracija pasirinkta remiantis literatūros duomenimis, anksčiau LSMU Biochemijos katedros ir Neuromokslų instituto mokslininkų grupės darytų Se poveikio pelėms eksperimentų rezultatais bei atsižvelgiant į Tarptautinės Mokslinių Tyrimų Tarybos reikalavimus dėl minimalios Se dozės pelėms (0,1 mg Se/ kg kūno masės). Tyrimui pasirinkta 0,4 mg Se/kg k. m. dozė [158]. Eksperimentinės grupės pelės selenometionino tirpalu buvo girdomos 8 savaites. Poveikio trukmė pasirinkta taip pat remiantis literatūros duomenimis bei atsižvelgiant į tai, kad sublétinio poveikio

įvertinimui paprastai rekomenduojama eksperimento trukmė yra iki 3 mėnesių. Kas antrą dieną buvo matuojamas išgertų tirpalų tūris, o tirpalai keičiami naujais. Vieną kartą per savaitę pelės buvo sveriamos, jų svoris registruojamas žurnale.

Praėjus 8 savaitėms, pelėms buvo atlikta stuburo smegenų dislokacija ir dekapitacija. Į mėgintuvėlius su heparinu surinktas kraujas ir išimti organai – smegenys, kepenys, inkstai. Smegenys ir kepenys pasvertos ir sudėtos į ependorfinius mėgintuvėlius, kurie laikyti šaldiklyje -80°C temperatūroje. Inkstai tik pasverti santykinio inkstų masės indekso įvertinimui.

2.3 Malondialdehido koncentracijos kraujyje nustatymas

Naudoti reagentai:

- tiobarbitūro rūgštis (TBR), „Serva“, Vokietija.
- trichloracto rūgštis (TchA), Lietuva;

Malondialdehido koncentracija kraujyje buvo nustatyta pagal Stalnaja ir bendraautorių metodiką [159]. Pelės kraujas surinktas į ependorfinį mėgintuvėlį su heparinu (60 µl). Stikliniuose mėgintuvėliuose paruošiamas mišinys, kuris sudarytas iš: 2 ml dejonizuoto vandens, 100 µl kraujo ir 1 ml 10 proc. TchA. Mišinys išmaišomas ir pridedama 2 ml 0,5 proc. TBR. Mėginiai inkubuojami verdančio vandens vonelėje 30 min. Po to atšaldomi ledo vonelėje 10 min. Mėgintuvėlių turinys perpilamas į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 3000×g pagreičiu 15 min. (Beckman J2-21, JAV) centrifuga. Nusiurbtas supernatanto sluoksnius supilamas į kvarcinę kiuvetę ir spektrofotometru (Perkin Elmer, LAMBDA 25 UV/Vis, JAV) išmatuojama šviesos sugertis (bangos ilgis 540 nm). Malondialdehido koncentracija kraujyje (µmol/l) apskaičiuojama pagal formulę:

$$C \text{ } \mu\text{mol/g} = A \times 1250$$

A – supernatanto sugerties reikšmė ties 540 nm banga, o 1250 – koeficientas.

2.4 Audinių homogenato paruošimas

Naudoti reagentai:

- kalio chloridas (KCl), „Merck“, Vokietija.

Atšildyti organai pasverti ir perkelti į plastikinius mėgintuvėlius. Pridėjus 9 kartus didesnę tūrį (lyginant su organo svoriu) šalto 1,15 proc. kalio chlorido tirpalo, viskas homogenizuojama audinių smulkintuvu (T 10 basic Ultra-turrax, IKA, Vokietija), taip gaunamas 10 proc. homogenatas.

2.5 Malondialdehido koncentracijos organuose nustatymas

Naudoti reagentai:

- tiobarbitūro rūgštis (TBR), „Serva“, Vokietija;
- fosforo rūgštis (H₃PO₄), „Merck“, Vokietija;
- n-butanolis, „Sigma-Aldrich“, Vokietija.

Malondialdehido koncentracija laboratorinių pelių organuose (smegenyse ir kepenyse) buvo nustatyta remiantis Uchiyama ir bendraautorių metodika, naudojant tiobarbitūro rūgštį [160]. Metodas pagrįstas malondialdehido reakcija su tiobarbitūro rūgštimi, kurios metu susidaro raudonos spalvos MDA-TBR₂ aduktai [161]. Stikliniuose mėgintuvėliuose paruošiamas tirpalas, kuris sudarytas iš: 0,5 ml paruošto audinių homogenato, 3 ml 1 proc. H₃PO₄ ir 1 ml 0,6 proc. TBR vandeninio tirpalo. Mišinys išmaišomas stikline lazdele ir inkubuojamas verdančio vandens vonelėje 45 min. Po 45 min. tiriamieji mėginiai 10 min. atšaldomi ledo vonelėje ir į kiekvieną iš jų įpilama 4 ml n-butanolio, stipriai išmaišoma. Mėginiai centrifuguojami 8000×g pagreičiu 10 min. (Beckman J2-21, JAV) centrifuga. Po centrifugavimo viršutinis centrifugato sluoksnis nusiurbiamas ir supilamas į kvarcinę kiuvetę ir spektrofotometru (Perkin Elmer, LAMBDA 25 UV/Vis, JAV) išmatuojama supernatanto šviesos sugertis, kai bangos ilgiai yra 535 nm ir 520 nm. Skirtumai, gauti tarp šviesos sugerties dydžių, esant 535 nm ir 520 nm bangos ilgiams yra TBR reikšmė, kurios pagalba yra apskaičiuojama malondialdehido koncentracija (nmol/g) pagal formulę:

$$C \text{ nmol/g} = \frac{\Delta O.V. \times 100000}{113}$$

O.V. - optinių vienetų skirtumas (λ 535 nm - λ 520 nm), 100000/113 – koeficientas.

2.6 Laboratorinių pelių audinių mineralizavimas

Naudoti reagentai:

- vandenilio peroksidas (H₂O₂), „Thermo Fisher Scientific“, Jungtinė Karalystė;
- azoto rūgštis (HNO₃), „Seastar chemicals“, Kanada.

Pradiniame cheminių elementų koncentracijos nustatymo etape organuose ir kraujyje, pirmiausia atliekama jų mineralizacija. Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami po 100 mg organo ir atitinkamai kraujo. Pasverta organo dalis ar kraujo kiekis dedami į švarius ir išdžiovintus kvarcinius indus. Organų ar kraujo perkėlimas į kvarcinius indus atliekamas traukos spintoje, norint išvengti bandinio užteršimo. Į kvarcines kiuvetes pilama: 1 ml 69 proc. HNO₃, 1 ml 32 proc. H₂O₂, 100 mg organo arba kraujo ir 5 ml H₂O. Kvarcinės kiuvetės užkemšamos tefloniniais kamščiais ir talpinamos į mineralizatorių (Anton Paar Multiwave 3000, Austrija). Mineralizatoriuje pagal pasirinktą reikiamą programą, palaipsniui didėjant slėgiui ir temperatūrai, mineralizuojami mėginiai su organu ar krauju. Po mineralizavimo mėginiai perkeliama į sterilius mėgintuvėlius ir laikomi šaldytuve atitinkamoje temperatūroje nuo -4 iki -8 °C.

2.7 Seleno, geležies, vario ir cinko koncentracijos nustatymas laboratorinių pelių audiniuose

Seleno, geležies, vario ir cinko koncentracijos laboratorinių pelių kraujyje, smegenyse ir kepenyse nustatytos taikant induktyviai susietos plazmos masių spektrometrijos (ICP-MS) metodą. ICP-MS naudojama mažų ir labai mažų koncentracijų elementų nustatymui mėginyje. Šis metodas pagrįstas nustatomų elementų jonų masės identifikavimu. Atominiai elementai, judėdami per plazmos šaltinį, tampa jonizuotais, o jonai yra išskirstomi pagal jų mases. Seleno, geležies, vario ir cinko koncentracijoms mėginiuose nustatyti buvo naudojamas Perkin Elmer NexION 300D ICP-MS. Rezultatai, gauti tiriant kraują, pateikiami µg/l, o organuose – perskaičiuoti į µg/g.

2.8 Bendro baltymo koncentracijos nustatymas

Bendro baltymo koncentracijos nustatymui buvo naudotas ultravioletinės spektroskopijos Warburg-Christian metodas. Metodas pagrįstas 260 nm ir 280 nm bangos ilgių šviesos absorbcija. Baltymuose esančios aminorūgštys triptofanas ir tirozinas sugeria 280 nm bangos ilgio šviesą, o nukleorūgštys – 260 nm. Bendrai baltymo koncentracijai (C) nustatyti naudojamas tiriamasis mėginys, sudarytas iš 40 µl homogenizacinės frakcijos („HF“), 50 kartų atskiestos dejonizuotu H₂O. Paruoštas mėginys supilamas į kvarcinę kiuvetę ir išmatuojama šviesos sugertis spektrofotometru (Perkin Elmer, LAMBDA 25 UV, JAV). Baltymo koncentracija išreiškiama mg/ml.

2.9 Katalazės fermento aktyvumo nustatymas

Naudoti reagentai:

- Tris-HCl buferis, „Serva“, Vokietija;
- amonio molibdatas, „Sigma-Aldrich“, Scnelldorf, Vokietija;
- vandenilio peroksidas (H₂O₂), „Merck“, Vokietija.

Fermento katalazės aktyvumas organuose nustatytas spektrofotometriiniu metodu pagal patobulintą Rachmanovos metodiką, pateiktą [162]. Metodas pagrįstas fermento katalazės gebėjimu skaidyti substratą – vandenilio peroksidą. Fermento aktyvumas vertinamas pagal amonio molibdato su nesuskaidytu vandenilio peroksidu geltonos spalvoto kompleksinio junginio susidarymą, kurio kiekis vertinamas spektrofotometriškai (Perkin Elmer, LAMBDA 25 UV/Vis, JAV), esant 410 nm bangos ilgiui.

Bandymui naudoti tirpalai:

- Buferio-substrato mišinys (B-S): 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) ir 30 ml 0,08 proc. vandenilio peroksido (H₂O₂);
- 4,5 proc. amonio molibdato tirpalas.

Katalazės aktyvumo nustatymas atliktas pagal 1 lentelėje pateiktą reakcijos schemą.

1 lentelė *Katalazės aktyvumo nustatymo schema*

Reagentai	Kontrolinio mėginio sudėtis (K)	Tiriamąjo mėginio sudėtis (T)	Pastabos
B-S mišinys	2 ml	2 ml	Inkubuojama 10 min. 37°C
HF*	-	100 µl	Inkubuojama 3 min. 37°C
Amonio molibdatas	2 ml	2 ml	-
HF*	100 µl	-	-

HF* - homogenizacinė frakcija

Tiriamąjo/kontrolinio mėginio turinys supilamas į stiklinę kiuvetę ir matuojama šviesos sugertis, esant 410 nm bangos ilgiui. Lyginamosios kiuvetės turinį sudaro: 1 ml B-S, 3 ml H₂O, 100 µl HF (homogenizacinė frakcija).

Katalazės aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{(E_K - E_B) \times 12 \times 10^3 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}$$

A – katalazės aktyvumas (U/ml) (U – tai katalazės kiekis, katalizuojantis 1 μmol H_2O_2 virtimą produktu per 1 minutę); E_K – kontrolinio mėginio šviesos sugertis; E_B – tiriamojo mėginio šviesos sugertis; 12×10^3 – praskiedimo faktorius; $4,1 \times 10^6$ – perskaičiavimo koeficientas į μmol ; $22,2 \times 10^6$ – H_2O_2 moliarinės ekstinkcijos koeficientas; 3 – inkubavimo laikas (3 min).

Katalazės aktyvumas perskaičiuojamas iš U/ml į U/mg baltymo pagal formulę:

$$A \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{A}{C}$$

C – bendro baltymo koncentracija.

2.10 CAT, SOD1 ir SelP genų raiškos įvertinimas laboratorinių pelių organuose

2.10.1 Laboratorinių pelių smegenų ir kepenų audinio suardymas

Mėgintuvėliai su laboratorinių pelių kepenimis bei smegenimis patalpinami į indą su skystu azotu. Audinių suardymui naudojama grūstuvė ir grūstuvėlis, kurie yra atšaldomi, įpylus skysto azoto. Tiriamieji audiniai išimami iš mėgintuvėlių ir sutrinami grūstuvėliu. Audiniams neleidžiama atšilti (užtikrinamos kuo šaltesnės sąlygos). Sutrinto audinio milteliai suberiami į skystame azote atšaldytus 1,5 ml mėgintuvėlius. Taip paruošti ir sukoduoti audinių mėginiai laikomi šaldiklyje -80°C temperatūroje iki RNR išskyrimo dienos.

2.10.2 RNR išskyrimas

Naudoti reagentai ir medžiagos:

- „GeneJET RNA purification kit“ rinkinys, „Thermo Scientific“, JAV, kurį sudaro proteinazė K, lizės buferis, koncentruoti plovimo buferiai (plovimo buferis 1 ir plovimo buferis 2), vanduo be nukleazių;
- 96 proc. etanolis (C₂H₅OH) „Thermo Scientific“, JAV.

RNR iš ląstelių išskiriama, naudojant „GeneJET RNA purification kit“, (Thermo Fisher Scientific, JAV) ir remiantis gamintojo patvirtintu protokolu. Skystame azote suardytų kepenų ir smegenų audinio mėginiai užpilami 300 µl lizės buferiu (su β-merkaptioetanoliumi), apsaugančiu RNR nuo degradacijos ir homogenizuojami 3 min. (MS2 MiniShaker, IKA, Vokietija) maišykle. Į audinių homogenatą įpilama 600 µl proteinazės K tirpalo (10 µl proteinazės K, 60 kartų atskiestos TE buferiu). Proteinazės K tirpalas pasigaminamas iš: tris HCl, EDTA, dejonizuoto vandens ir proteinazės K. Mėginiai gerai išmaišomi ir inkubuojami 10 min. 50°C temperatūroje reguliuojamos temperatūros maišytuve (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Vokietija). Po inkubavimo tiriamoji medžiaga centrifuguojama 12000×g pagreičiu 15 min. (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Vokietija) centrifuga.

Į centrifuginį 1,5 ml mėgintuvėlį nusiurbiamas viršutinis centrifugato sluoksnius, į kurį pilama 450 µl 96 proc. etanolio ir pipetuojant išmaišoma. Gauta suspensija užnešama į RNR gryninimo kolonėlę ir centrifuguojama 12000×g pagreičiu 1 min. Kolonėlė praplaunama komplekte esančiais plovimo buferiais ir perkeliama į 1,5 ml mikrocentrifuginį mėgintuvėlį. Išgryninta RNR išskiriama, įpilant 100 µl vandens be nukleazių ir centrifuguojant 12000×g pagreičiu 1 min. RNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometru (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, JAV). Šviesos sugertis matuojama, esant 230, 260 ir 280 nm bangos ilgiams ir nustatomi RNR grynumo (švarumo) (A₂₆₀/280 ir A₂₆₀/230) santykiai. Išskirta RNR laikoma šaldiklyje -80°C temperatūroje.

2.10.3 Kopijinės DNR sintezė

Naudoti reagentai ir medžiagos:

- „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ rinkinys, „Thermo Fisher Scientific“, JAV, kurį sudaro: 10×RT buferis; RNAazės slopiklis; 10×RT heksameriniai pradmenys; 25×dNTP mišinys; MultiScribe™ atvirkštinė transkriptazė.

Kopijinė DNR (kDNR) susintetinta, naudojantis „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) ir remiantis gamintojo rekomendacijomis. Reakcijos mišinys gaminamas mėgintuvėlyje, įpylus 10 µl (500 ng) išgrynintos RNR ir reakcijos mišiniui reikalingus reagentus (2 lentelė). Reakcija vykdoma termocikleriu (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, JAV) pagal programą: 95°C 10 min; 95°C 15 sek; 60°C 30 sek; 72°C 30 sek.

2 lentelė **Kopijinės DNR sintezei naudojamų reakcijos mišinio komponentų ir jų tūriai vienai reakcijai**

Reagentas	Tūris
10× RT buferis	2 µl
10× RT heksameriniai pradmenys	2 µl
25× dNTP mišinys	0,8 µl
MultiScribe™ atvirkštinė transkriptazė	1 µl
RNAazės slopiklis	1 µl
Vanduo be nukleazų	3,2 µl
Viso:	10 µl

2.10.4 Genų raiškos pokyčių įvertinimas kiekybinės tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos ir $\Delta\Delta C_t$ metodais

Naudoti reagentai ir medžiagos:

- vanduo be nukleazų, „Thermo Scientific“, JAV;
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x), „Thermo Scientific“, JAV;
- pradmenys (tiesioginiai ir atvirkštiniai), „Thermo Scientific“, JAV.

CAT, SOD1 ir SELENOP genų raiškos pokyčiai laboratorinių pelių smegenyse ir kepenyse įvertinti kiekybinės tikro laiko PGR (kTL-PGR) su SYBR Green dažų metodu ir išanalizuoti $\Delta\Delta C_t$ metodu. Kaip kontrolė rezultatų normalizavimui buvo pasirinktas referentinis gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) genas, kurio raiška visuose tiriamuosiuose mėginiuose nekinta.

kTL-PGR metodo atlikimui ruošiama 96 šulinėlių plokštelė (MicroAmp Optical, Applied Biosystems, JAV). Plokštelė užpildoma reakcijos mišiniu (3 lentelė). Kiekvienam mėginiui atlikta po 3 techninius pakartojimus. Vienos reakcijos tūris – 12 µl.

3 lentelė *kTL-PGR reakcijos mišinio komponentai ir jų tūriai vienai reakcijai*

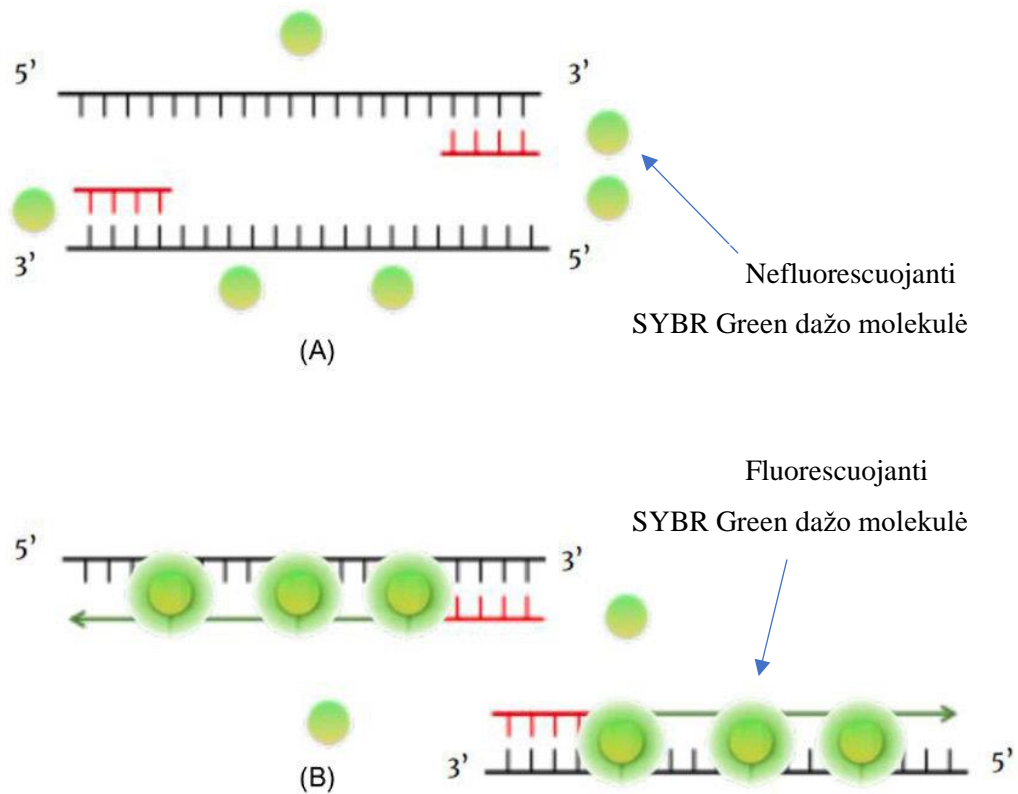
Reagentas	Tūris
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	6 μ l
Pradmenys (tiesioginiai ir atvirkštiniai)	1 μ l
5 ng/ μ l kDNR	3 μ l
Vanduo be nukleazių	2 μ l
Viso:	12 μ l

Užpildyta plokštelė uždengiama plastikine lipnia plėvele, apsaugančia mėginius nuo garavimo, nucentrifuguojama 1000×g pagreičiu 30 sek. (Centrifuge 5430, Eppendorf, Vokietija) centrifuga ir patalpinama į tikro laiko termociklerį (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, JAV). kTL-PGR atliekama pagal programą, kuri pateikta 4 lentelėje.

4 lentelė *kTL-PGR vykdymo programa*

Etapas	Temperatūra (°C)	Trukmė	Ciklų kiekis
DNR denatūracija	95	10 min	1
		15 sek	40
Pradmenų prisijungimas	60	30 sek	Tęstinis
DNR sintezė	72	30 sek	
Lydimosi kreivė	95	15 sek	
	60	1 min	
	95	30 sek	
	60	15 sek	

Kiekybinės tikro laiko PGR metu pagausintos kopijinės DNR kiekis stebimas atsižvelgiant į reakcijai naudoto SYBR Green I dažo fluorescencijos emisiją. SYBR Green I dažo molekulės geba jungtis prie dvigrandės DNR molekulės mažojo griovelio. Prisijungusios prie DNR, dažo molekulės ima fluorescuoti. Kuo daugiau dvigrandžių amplikonų yra susintetinama, tuo intensyvesnė SYBR Green I dažo fluorescencija [163]. SYBR Green dažo veikimo mechanizmas pateikiamas 3 paveiksle.



3 pav. *SYBR Green* dažo veikimo principas, A– DNR molekulė yra denaturavusi, dažo molekulės yra laisvos ir nefluorescuojančios, nes negeba jungtis prie viengrandės DNR molekulės; B– *SYBR Green* dažo molekulės prisijungia prie dvigrandės DNR molekulės ir fluorescuoja
adaptuota pagal [211]

Atlikus kiekybinę tikro laiko PGR, duomenys analizuojami $\Delta\Delta C_t$ metodu. Metodas leidžia apskaičiuoti santykinės genų raiškos pokytį (angl. *Fold change*), kuris nusako kiekio tarp galutinės ir pradinės verčių pokytį. Analizė atliekama, naudojant C_t (angl. *Cycle threshold*) reikšmes, žyminčias ciklo numerį eksponentinėje fazėje, po kurio yra amplifikuotas toks kiekis kopijinės DNR fragmentų, kurių fluorescencijos intensyvumas viršija slenkstinę ribą (angl. *Threshold*) [164]. Slenkstinės ribos viršijimas nusako, jog reakcija įvyko.

Santykinės genų raiškos pokytis apskaičiuojamas taikant formules:

$$1) \Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{tiriamojo geno}) - \Delta C_t (\text{referentinio geno}) = (C_t D - C_t B) - (C_t C - C_t A)$$

$C_t D$ – tiriamojo geno slenkstinio ciklo vertė tiriamajame mėginyje; $C_t B$ – referentinio geno slenkstinio ciklo vertė tiriamajame mėginyje; $C_t C$ – tiriamojo geno slenkstinio ciklo vertė lyginamajame (kontroliniame) mėginyje; $C_t A$ – referentinio geno slenkstinio ciklo vertė lyginamajame (kontroliniame) mėginyje.

$$2) n = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

n – genų raiškos pokytis kartais.

Galutinis rezultatas pateikiamas kaip tiriamojo geno raiškos pokytis tiriamajame mėginyje, lyginant su kontroliniu mėginiu, normalizuotu pagal referentinį geną. Santykinė referentinio geno raiška visada lygi 1 [165].

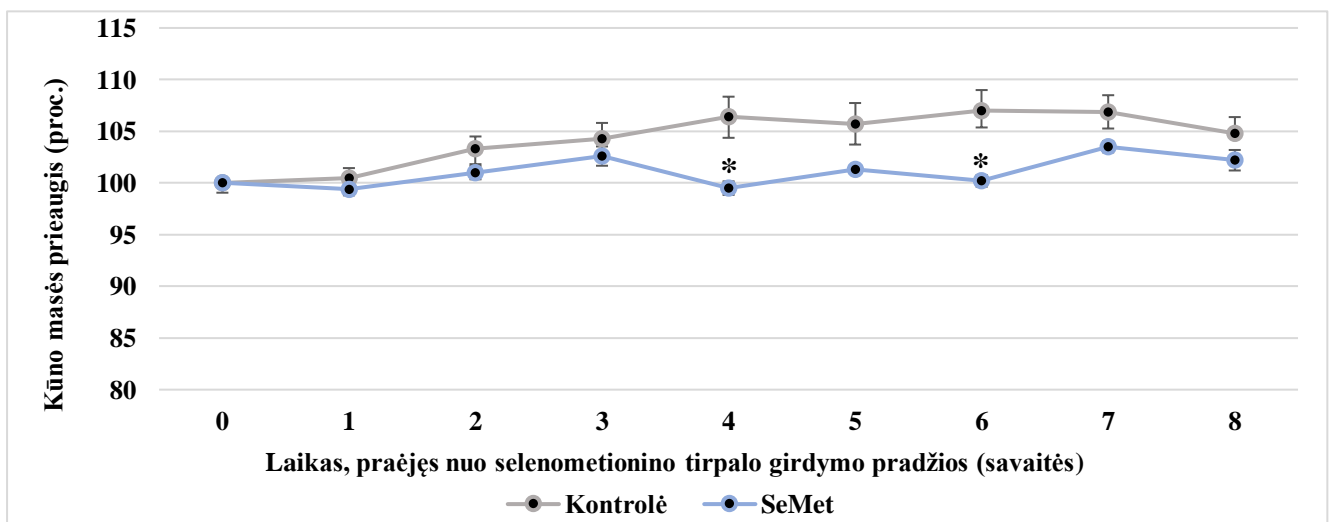
2.11 Duomenų statistinė analizė

Duomenys statistiškai įvertinti, naudojant IBM SPSS Statistics (27.0.1.0 versija) kompiuterinę programą. Rezultatai pateikti vidurkis \pm SEM (standartinė vidurkio paklaida). Statistinis patikimumas buvo nustatytas, naudojant Kruskal-Wallis testo kriterijų. Grafinė rezultatų analizė atlikta MS Excell (2022 m.) kompiuterine programa.

3 REZULTATAI

3.1 Seleno įtakos laboratorinių pelių kūno masei ir santykinio organo masės indeksui įvertinimas

Norint įvertinti bendrą sisteminių *per os* vartojamo selenometionino tirpalo (0,4 mg Se/kg kūno masės) poveikį laboratorinių pelių kūno masei ir santykiniam organo masės indeksui, tyrimo metu vieną kartą per savaitę buvo vertinta kiekvienos pelės kūno masė, o po 8 savaitių įvertinta smegenų, kepenų ir inkstų masė. Toksikologiniuose tyrimuose kūno masė ir santykinė organo masė yra svarbūs ir reikšmingi toksiškumo vertinimo kriterijai, kurie atspindi bendrą organizmo būklę [166]. Įvertinus kontrolinių pelių kūno masės kitimus, nustatyta, kad pirmosiomis keturiomis eksperimento savaitėmis jų masė tolygiai didėjo, penktąją savaitę augimas nežymiai sulėtėjo, o vėliau išliko panašiam lygyje iki eksperimento pabaigos (4 pav.). Išanalizavus eksperimentinės grupės pelių kūno masės prieaugio rezultatus pastebėta, kad selenometioninu veikiamų pelių masė viso eksperimento metu buvo mažesnė nei kontrolinių pelių. Iki ketvirtosios savaitės pabaigos pelių kūno masės prieaugis statistiškai reikšmingai sumažėjo 6,9 proc., o iki šeštosios savaitės pabaigos pelių kūno masės prieaugis sumažėjo



4 pav. *Kontrolinių ir selenometioninu paveiktų laboratorinių pelių kūno masės prieaugis per 8 savaitių laikotarpį*

Vidutinis kūno masės prieaugis grupėse išreikštas procentine dalimi, o grupių pelių pradinė masė prilyginta 100 proc. Kiekvieną grupę sudarė po 12 pelių.

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

6,8 proc. ($p < 0,05$), lyginant su kontrolinių pelių kūno masės prieaugiu. Įvertinus galutinį pelių kūno masės prieaugį paaiškėjo, kad po 8 savaičių 0,4 SeMet doze girdytų pelių masės prieaugis, lyginant su pradine mase, padidėjo 2,20 proc., o kontrolinės grupės pelių – 4,80 proc., todėl galime teigti, jog selenometionino tirpalu girdytų pelių augimas buvo tik nežymiai lėtesnis, lyginant su kontrolinių pelių augimu ir šis 2,6 proc. skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (4 pav.).

Nustatytas santykinis BALB/c pelių organų (smegenų, kepenų ir inkstų) masės indeksas po 8 savaites trukusio veikimo selenometioninu (5 lentelė). Tyrime naudota Se dozė statistiškai reikšmingai 7,50 proc. sumažino santykinį smegenų masės indeksą, lyginant su kontrole. Tuo tarpu dėl ilgalaikio selenometionino vartojimo *per os* kepenų ir inkstų masės indeksai taip pat sumažėjo, tačiau lyginant su kontrole, šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi (5 lentelė).

5 lentelė. Santykiniai organų masės indeksai kontrolinės ir selenometioninu paveiktų laboratorinių pelių grupėse

Pelių grupė	Santykinis organo masės indeksas (organo masė g / kūno masė g)		
	Kepenys	Smegenys	Inkstai
Kontrolė	0,0388±0,000959	0,0187±0,000366	0,0133±0,000711
0,4 mg Se/kg k. m.	0,0368±0,000913	0,0173±0,000368 *	0,0120±0,000247

Lentelėje pateikiamas reikšmių vidurkis ± SEM. Kiekvieną grupę sudarė po 12 pelių.

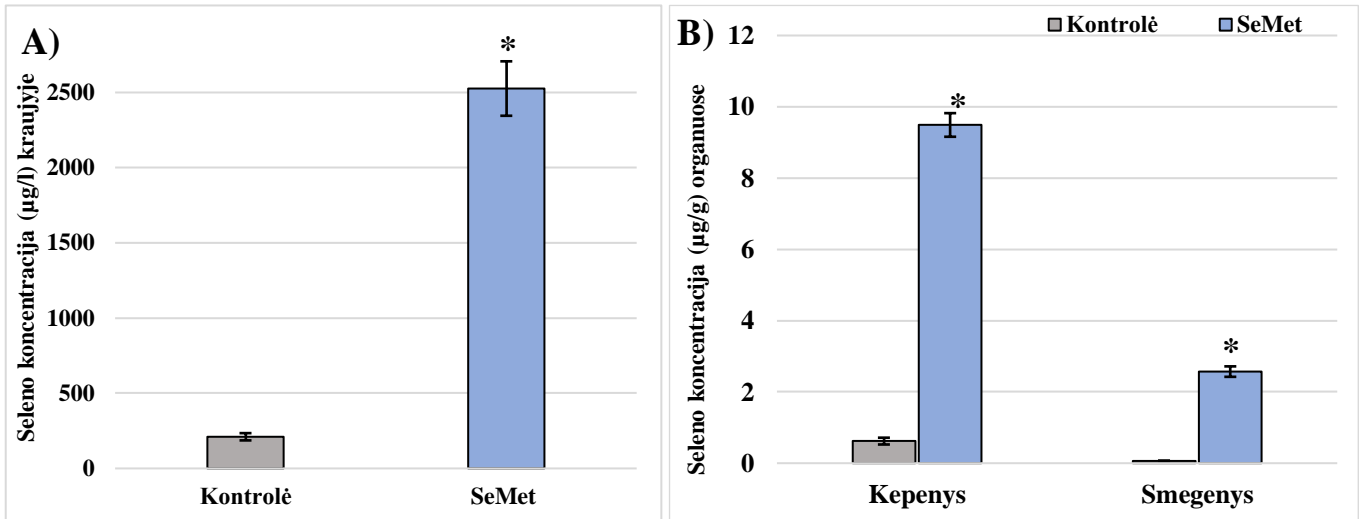
*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.2 Seleno koncentracijų pelės audiniuose įvertinimas

Šiame darbe nustatėme Se koncentracijas kontrolinės bei eksperimentinės grupės pelių kraujyje, smegenyse ir kepenyse po 8 savaites trukusio jų girdymo selenometionino tirpalu (0,4 mg Se/kg k. m.) (5 pav.). 5 paveikslo A dalyje pateikiama Se koncentracija pelių kraujyje. Gauti rezultatai parodė, kad kontrolinės grupės pelių kraujyje Se koncentracija siekė $210,51 \pm 24,14 \mu\text{g/l}$. Po ilgalaikio Se poveikio, šio elemento koncentracija kraujyje statistiškai reikšmingai padidėjo 1155 proc. ($2642,14 \pm 196,01 \mu\text{g/l}$), lyginant su kontrole. Šis Se kiekis 12 kartų viršijo kontrolės lygį (5 pav. A).

5 paveikslo B dalyje pateikiamos Se koncentracijos kontrolinių ir 0,4 mg SeMet paveiktų pelių organuose. Kontrolinės grupės pelių kepenyse Se koncentracija siekė $0,615 \pm 0,095 \mu\text{g/g}$. Tuo tarpu 0,4 mg SeMet doze girdytų pelių kepenys sukaupė $9,49 \pm 0,33 \mu\text{g/g}$ seleno t.y. 1443 proc. arba 15 kartų ($p < 0,05$) daugiau, nei kontrolinių pelių kepenys (5 pav. B). Kontrolinių pelių smegenyse vidutinis Se kiekis

siekė $0,061 \pm 0,012 \mu\text{g/g}$. Tačiau dėl ilgalaikio selenometionino tirpalo vartojimo šis Se lygis buvo viršytas daugiau nei 42 kartus ($p < 0,05$). Se paveiktų pelių smegenyse Se koncentracija buvo net 4118 proc. didesnė ir siekė $2,57 \pm 0,147 \mu\text{g/g}$, lyginant su kontrole.



5 pav. Seleno koncentracija kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių kraujyje (A) ir organuose (B)

SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino ($0,4 \text{ mg Se/kg kūno masės}$) tirpalu.

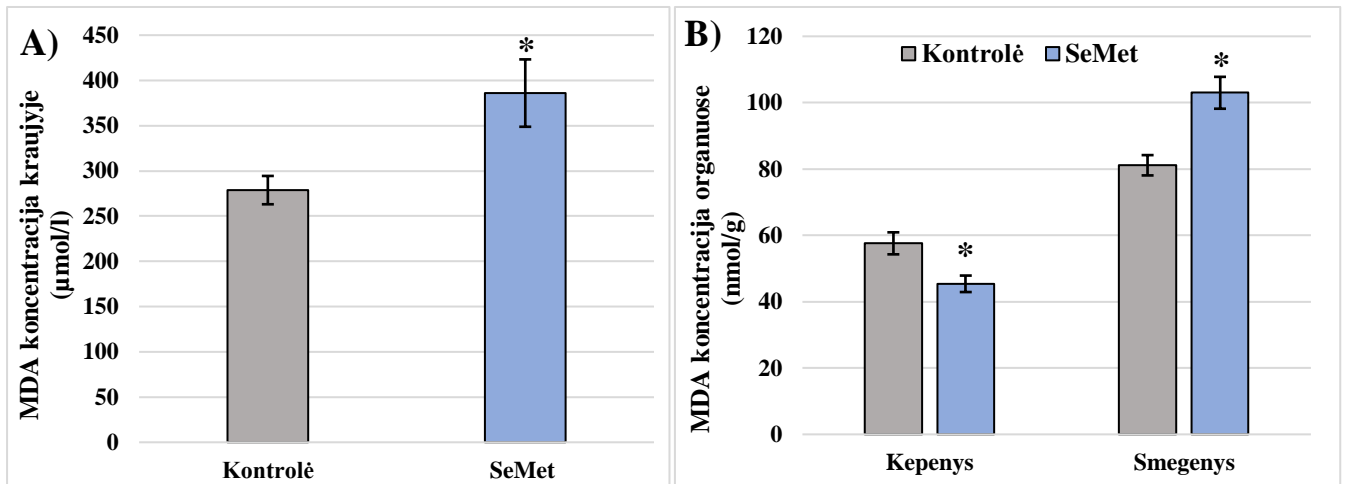
Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; $n = 6$;

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.3 Malondialdehido koncentracijos pelės audiniuose įvertinimas

Norėdami išsiaiškinti, ar sukaupti dideli Se kiekiai audiniuose pasižymi prooksidantiniu poveikiu ir sukelia ląstelių oksidacinį stresą, įvertinome polinesočiųjų riebalų rūgščių peroksidacijos lygį pagal galutinio produkto – malondialdehido susidarymą tiriamuosiuose audiniuose. Gauti MDA rezultatai pelių kraujyje ir organuose po 8 savaites trukusio ilgalaikio selenometionino tirpalo girdymo pateikti 6 paveiksle. MDA susidarymo pelių, veiktų $0,4 \text{ mg SeMet}$ doze, kraujyje rezultatai parodė statistiškai reikšmingą 38 proc. ($386,00 \pm 37,23 \mu\text{mol/l}$) MDA koncentracijos padidėjimą, lyginant su kontroline grupe ($287,74 \pm 15,64 \mu\text{mol/l}$) (6 pav., A). Ši naudota Se dozė taip pat padidino smegenų MDA lygį, kadangi MDA koncentracija siekė $102,98 \pm 4,8 \text{ nmol/g}$. Lyginant su kontrole ($81,13 \pm 3,06 \text{ nmol/g}$), tai sudarė statistiškai reikšmingą 27 proc. MDA kiekio padidėjimą. Nustatius pelių kepenų MDA kiekį pastebėta, kad šis rodiklis eksperimentinėje grupėje, priešingai, statistiškai reikšmingai sumažėjo. Šis

sumažėjimas sudarė 21 proc. ($45,39 \pm 2,48$ nmol/g). lyginant su kontrole ($57,59 \pm 3,32$ nmol/g) (6 pav., B).



6 pav. *Malondialdehido koncentracija kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių kraujyje (A) ir organuose (B)*

SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6;

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

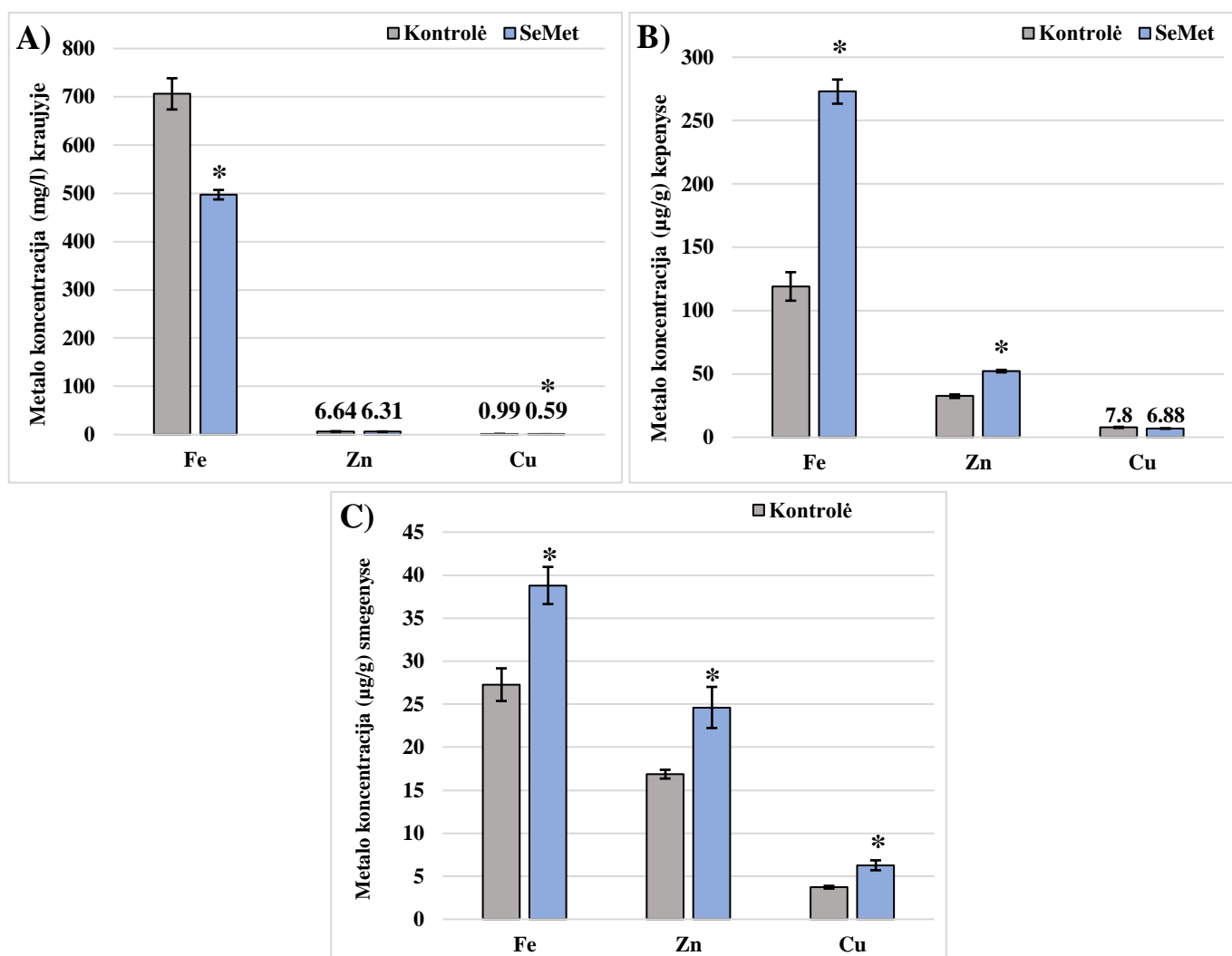
3.4 Geležies, vario ir cinko koncentracijų pelės audiniuose nustatymas

Duomenų apie fiziologines biogeninių elementų koncentracijas žmogaus ir gyvūnų audiniuose galima rasti, tačiau beveik nėra duomenų apie tai, kaip Se gali paveikti kitų elementų homeostazę. Mes pasirinkome įvertinti Se poveikį pagrindinių smegenų mikroelementų – geležies, vario ir cinko, kurie yra ir kai kurių antioksidantinės sistemos fermentų kofaktoriai, homeostazei.

Fe, Cu ir Zn koncentracijos laboratorinių pelių kraujyje pateikiamos 7 paveikslo A dalyje. Kontrolinės grupės pelių kraujyje Fe koncentracija buvo $706,097 \pm 32,35$ mg/l. Pelių, girdytų selenometionino tirpalu, kraujyje nustatytas statistiškai reikšmingas 30 proc. Fe kiekio ($497,12 \pm 9,85$ mg/l) sumažėjimas, lyginant su kontrole. Zn kiekis selenometioninu paveiktų pelių kraujyje išliko beveik kontrolės lygyje ($6,64 \pm 0,29$ mg/l). Nežymus šio elemento kiekio sumažėjimas ($6,31 \pm 0,22$ mg/l), lyginant su kontrole, tesudarė tik 5 proc. ir nebuvo statistiškai reikšmingas. Kontrolinės grupės pelių kraujyje Cu koncentracija buvo $0,99 \pm 0,064$ mg/l. Pelių, girdytų selenometioninu, kraujyje nustatytas 40 proc. Cu kiekio ($0,59 \pm 0,026$ mg/l) statistiškai reikšmingas padidėjimas, lyginant su kontrole.

7 paveikslo B dalyje pateikti pelių kepenų Fe, Cu ir Zn koncentracijų rezultatai. Nustatyta, kad pelių, girdytų selenometioninu, kepenyse, Fe koncentracija siekė $272,89 \pm 9,52 \mu\text{g/g}$ ir buvo 2,3 karto didesnė, lyginant su kontrole ($119,068 \pm 11,26 \mu\text{g/g}$). Taigi, nustatytas didelis Fe kaupimasis kepenyse, sudarantis 129 proc. statistiškai reikšmingą šio elemento kiekio padidėjimą, lyginant su kontrole. Selenometioninu girdytų pelių kepenyse Cu koncentracija buvo $6,88 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$. Šis 9,6 proc. Cu lygio sumažėjimas, lyginant su kontrole ($7,80 \pm 0,42 \mu\text{g/g}$), nebuvo statistiškai reikšmingas. Kontrolinės grupės pelių kepenyse Zn koncentracija buvo $32,45 \pm 1,40 \mu\text{g/g}$, tuo tarpu pelių, girdytų selenometionino tirpalu, kepenyse ji siekė $52,21 \pm 0,99 \mu\text{g/g}$. Šie rezultatai parodė 61 proc. ($p < 0,05$) Zn kiekio padidėjimą SeMet paveiktų pelių kepenyse, lyginant su kontrole.

Mikroelementų Fe, Cu ir Zn koncentracijų rezultatai pelių smegenyse pateikiami 7 paveikslo C dalyje. Fe koncentracija pelių, girdytų selenometionino tirpalu, smegenyse siekė $38,80 \pm 2,16 \mu\text{g/g}$ ir buvo 1,4 karto didesnė, lyginant su kontroline grupe ($27,27 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$). Tai buvo statistiškai reikšmingas 42 proc. padidėjimas. Cu koncentracija ($6,27 \pm 0,58 \mu\text{g/g}$) pelių smegenyse po ilgalaikio selenometionino tirpalo vartojimo statistiškai reikšmingai padidėjo 68 proc. lyginant su kontroline grupe ($3,72 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$). Zn koncentracija pelių, girdytų selenometionino tirpalu, smegenyse statistiškai reikšmingai padidėjo. Nustatyta, kad šio metalo koncentracija smegenyse buvo $24,62 \pm 2,39 \mu\text{g/g}$, o tai parodė 46 proc. padidėjimą, lyginant su kontroline grupe ($16,86 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$).



7 pav. *Geležies, cinko ir vario koncentracijos kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių kraujyje (A), kepenyse (B) ir smegenyse (C)*

SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

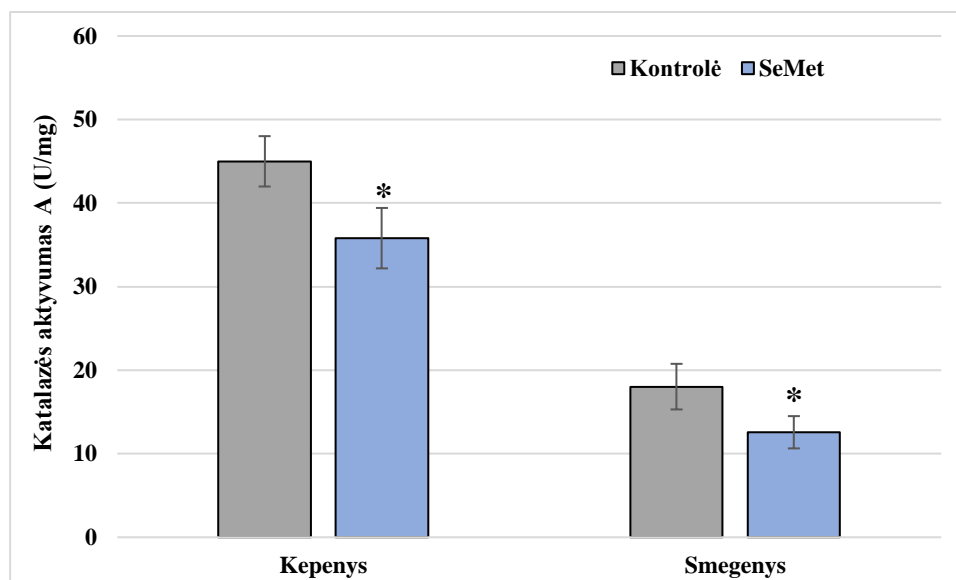
Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6;

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.5 Katalazės aktyvumo pelės organuose įvertinimas

Siekiant įvertinti, kaip ilgalaikis Se vartojimas *per os* veikia ląstelių antioksidantinę sistemą, buvo atliktas fermento katalazės aktyvumo laboratorinių pelių organuose nustatymas po 8 savaičių trukmės pelių girdymo selenometionino tirpalu. Se poveikio katalazės aktyvumui rezultatai pateikiami 8 paveiksle. Gauti rezultatai parodė, kad 0,4 Se doze paveiktų pelių kepenyse katalazės aktyvumas siekė $35,89 \pm 3,62$ U/mg baltymo, lyginant su kontroline grupe ($45 \pm 3,014$ U/mg baltymo) t.y. statistiškai

reikšmingai sumažėjo 20 procentų. Kontrolinės grupės pelių smegenyse katalazės aktyvumas buvo $18,03 \pm 2,73$ U/mg. Tuo tarpu pelių, girdytų selenometionino tirpalu, smegenyse šio fermento aktyvumas statistiškai reikšmingai sumažėjo 30 proc., lyginant su kontrole ($12,57 \pm 1,93$ U/mg).



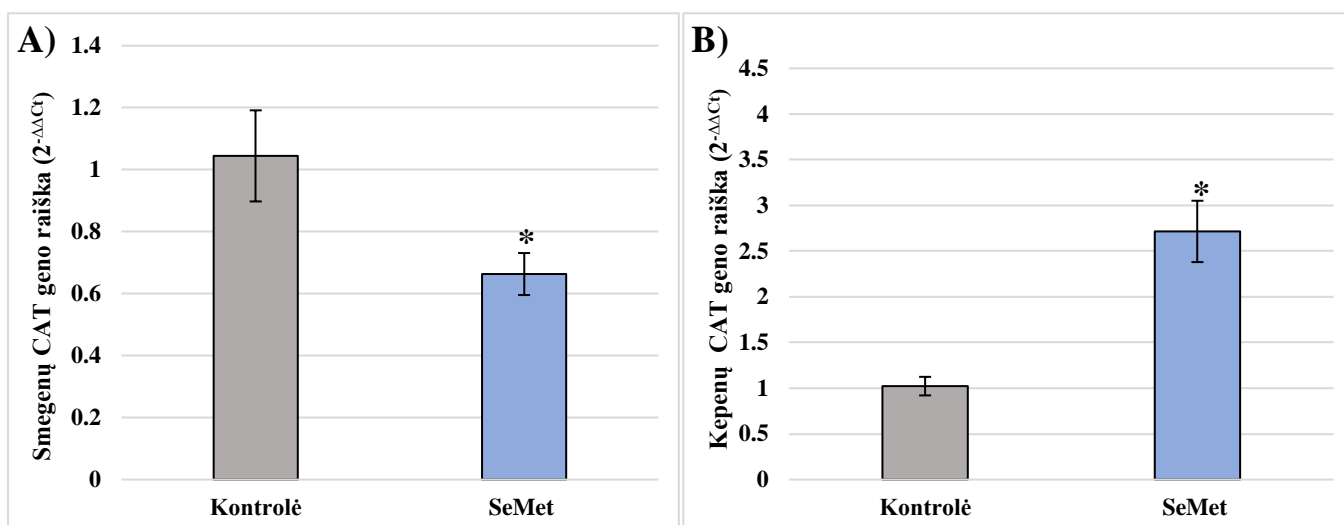
8 pav. *Katalazės aktyvumas kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių organuose*
SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6;

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.6 CAT geno raiškos pelės organuose nustatymas

Paskutiniame tyrimo etape buvo atlikta pasirinktųjų genų raiškos analizė. Jų raiška buvo lyginama su su referentiniu gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) genu, kurio raiška, nepriklausomai nuo audinio tipo išlieka pastovi. Vienas iš tiriamųjų buvo antioksidantinio fermento katalazės CAT genas. Palyginus CAT geno raišką kontrolinių ir 0,4 mg SeMet doze paveiktų pelių organuose, pastebėti statistiškai reikšmingi skirtumai. CAT geno raiška pelių smegenyse (9 pav., A), girdytų selenometionino tirpalu, statistiškai reikšmingai sumažėjo 37 proc. ($0,66 \pm 0,0563$), lyginant su kontrole ($1,044 \pm 0,147$). CAT geno raiška kepenyse padidėjo net 166 proc. ($2,72 \pm 0,315$), lyginant su kontrole ($1,0225 \pm 0,102$) (9 pav., B).



9 pav. *CAT* geno raiška kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių smegenyse (A) ir kepenyse (B)

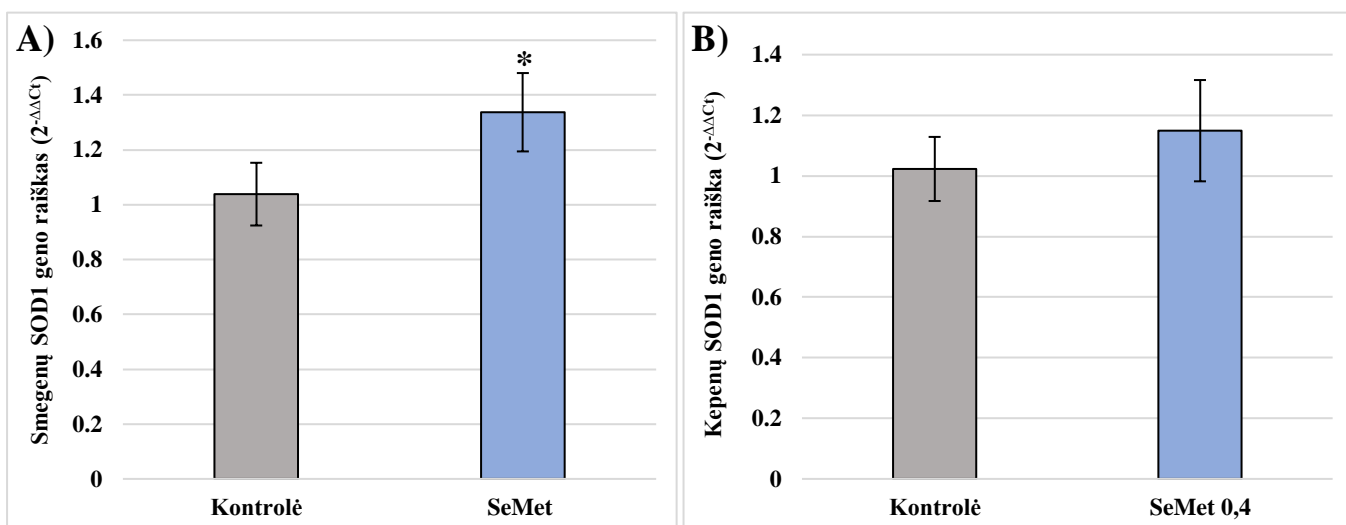
SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6.

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.7 SOD1 geno raiškos pelės organuose nustatymas

Taip pat buvo atlikta pelių kepenų ir smegenų antioksidantinės sistemos fermento superoksido dismutazės SOD1 geno raiškos analizė (10 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad SOD1 geno raiška pelių, 8 savaites veiktų selenometioninu, smegenyse, statistiškai reikšmingai padidėjo 29 proc. ($1,34 \pm 0,106$), lyginant su kontroline grupe ($1,0387 \pm 0,114$) (10 pav., A). SOD1 geno raiška kepenyse padidėjo ($p > 0,05$), 12 proc. ($1,15 \pm 0,167$), lyginant su kontroline grupe ($1,0227 \pm 0,106$), tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (10 pav., B),



10 pav. *SOD1* geno raiška raiška kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių smegenyse (A) ir kepenyse (B)

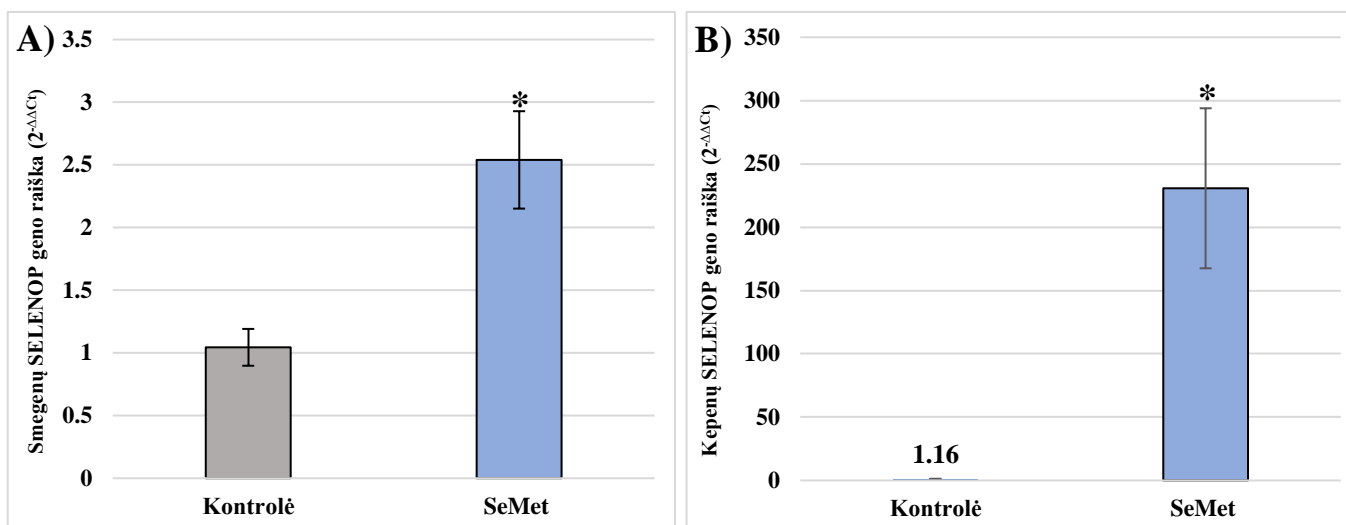
SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6.

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

3.8 SELENOP geno raiškos pelės organuose nustatymas

Tiek antioksidantinės sistemos fermentas superoksido dismutazė, tiek ir katalazė nėra tiesiogiai susiję su seleno kaip kofaktoriais. Todėl vienas iš mūsų uždavinių buvo įvertinti geno raišką baltymo, kuris būtų tiesiogiai susijęs su seleno. Tam tikslui buvo pasirinktas su Se pernaša, kaupimu susijęs ir antioksidantinėmis savybėmis pasižymintis seleno baltymas P. Jį koduojančio geno SELENOP raiškos rezultatai pateikti 11 paveiksle. Palyginus SeIP geno raišką kontrolinių ir 8 savaites 0,4 SeMet doze veiktų pelių organuose, pastebėtas statistiškai reikšmingas geno raiškos padidėjimas. SeIP geno raiška pelių, girdytų selenometioninu, smegenyse statistiškai reikšmingai padidėjo 143 proc. ($2,54 \pm 0,273$), lyginant su kontroline grupe ($1,0445 \pm 0,147$). (11 pav., A). Tuo tarpu kepenų SeIP geno raiška, lyginant su kontrole, statistiškai reikšmingai padidėjo net 19792 proc., t.y. 198 kartus ($230,75 \pm 48,25$) (11 pav., B).



11 pav. *SELENOP* geno raiška kontrolinių ir selenometioninu paveiktų pelių smegenyse (A) ir kepenyse (B)

SeMet – pelių grupė, 8 savaites girdyta selenometionino (0,4 mg Se/kg kūno masės) tirpalu.

Grafike pateikiamas reikšmių vidurkis \pm SEM; n = 6.

*- statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontroline grupe; $p < 0,05$.

4 REZULTATŲ APTARIMAS

Eksperimentiniuose tyrimuose naudota seleno dozė buvo pasirinkta atsižvelgiant į literatūros duomenis bei remiantis anksčiau LSMU Biochemijos katedros ir Neuromokslų instituto mokslininkų grupės darytų Se poveikio pelėms tyrimų rezultatais, kuomet buvo vertintas neorganinio Se – natrio selenito poveikis. Tyrime pasirinktas Se kiekis, kurį laboratorinės pelės gaudavo kasdien su geriamuoju vandeniu selenometionino pavidalu, buvo 4 kartus (0,4 mg Se/ kg kūno masės) didesnis už laboratorinėms pelėms rekomenduojamą gauti Se kiekį (0,1 mg Se/ kg kūno masės) per parą [167]. Mus domino Se pertekliaus vartojimo pasekmės, kadangi literatūroje nurodoma, jog eksperimentiniuose tyrimuose Se terapinis ir antioksidantinis poveikiai dažniausiai yra susiję su papildomu nei rekomenduojama Se kiekio vartojimu, kuris yra kelis kartus didesnis už dozę, reikalingą klinikiniam Se trūkumo požymiams išvengti [168]. Rekomenduojama Se paros dozė tiek vyrams, tiek moterims yra 55 µg arba (0,7 µmol). Atsižvelgiant į seleno sukeltus neigiamus poveikius, žmonių organizmui yra nustatytas maksimalus 400 µg paros Se kiekis [39]. Remiantis literatūroje pateikiamais duomenimis apie geresnę organinių Se formų įsisavinimą ir mažesnę toksiškumą, lyginant su neorganinio Se formomis, pasirinkta organinio Se forma – selenometioninas. Eksperimentinės grupės pelės selenometionino tirpalu buvo girdomos 8 savaites sublétiniam Se poveikiui įvertinti. Poveikio trukmė pasirinkta taip pat remiantis literatūros duomenimis bei atsižvelgiant į tai, kad sublétinio poveikio įvertinimui paprastai rekomenduojama eksperimento trukmė yra iki 3 mėnesių. Pasirinkome Se patekimo į organizmą būdą *per os*, kadangi ir į žmogaus organizmą Se patenka su maistu ar papildų pavidalu. Papildų vartojimas dažnai trunka mėnesiais, o ne savaitėmis, todėl nusprendėme įvertinti kelių mėnesių trukmės Se poveikį.

Selenas yra būtinasis mikroelementas žmogaus ir gyvūnų įvairių sistemų, ypač nervų, imuninės, reprodukcinės, širdies ir kraujagyslių, normaliam funkcionavimui. Kadangi selenas daro įtaką visam organizmui, pirmiausiai įvertinome bendrą sisteminį selenometionino poveikį pagal pelės kūno masės pokyčius 8 savaitių bėgyje bei santykinį organo masės indeksą (organo masės bei kūno masės santykį), kuris yra tikslesnis rodiklis nei organo masė. Toksikologiniuose tyrimuose kūno masė ir santykinė organo masė yra svarbūs ir reikšmingi toksiškumo vertinimo kriterijai [166]. Pakankamas Se suvartojimas yra labai svarbus fiziologiniams procesams: augimui, imuninės sistemos ir smegenų normalios veiklos palaikymui [169] bei įvairioms organizmo biocheminėms funkcijoms [170]. Se trūkumas siejamas su kaulinio audinio apykaitos sutrikimais [171] ar skydliaukės hormonų reguliacijos sutrikimais [172]. Tyrimo metu visos BALB/c pelės išgyveno iki eksperimento pabaigos. Gauti rezultatai teigiamo, augimą skatinančio Se poveikio, kasdien vartojant organinį seleną selenometionino tirpalo pavidalu *per os*, laboratorinių pelių augimui 2 mėnesius trukusio eksperimento eigoje, neparodė. Viso eksperimento metu selenometionino tirpalu girdytos pelės augo lėčiau nei kontrolinės grupės pelės

su nedideliu statistiškai reikšmingu kūno masės sumažėjimu 4-ą ir 6-ą tyrimo savaitėmis. Eksperimento pabaigoje galutinis kūno masės prieaugis pelių, girdytų selenometionino tirpalu, siekė 2,20 proc., tuo tarpu kontrolinės pelės priaugo svorio šiek tiek daugiau (4,80 proc.), lyginant su pradine kūno mase, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Literatūroje rasti duomenų apie Se pertekliaus poveikį laboratorinių pelių kūno masės augimui, naudojant panašų eksperimentinį modelį, nepavyko. Tačiau mūsų rezultatus iš dalies patvirtino tyrimo su žiurkėmis rezultatai, parodę, kad su 1 g pašaro gaunant 5 μg neorganinio Se, jų kūno masės augimas sulėtėjo jau nuo 10 eksperimento dienos ir tęsėsi iki eksperimento pabaigos (28 d.), lyginant su žiurkėmis, gaunančiomis gerokai mažesnius Se kiekius (0,08, 0,24, 0,8 μg Se/1 g pašaro) [20]. Kita vertus, viso kūno masės pokyčiai atsispindi ir sumažėjusiuose santykinuose organų masės indeksuose. Skirtumai tarp tiriamųjų ir kontrolinių pelių organų masės indeksų buvo minimalūs kepenyse ir inkstuose, o statistiškai reikšmingas sumažėjimas nustatytas tik smegenyse. Šiuos rezultatus patvirtinančių kitų mokslininkų rezultatų, veikiant laboratorinius gyvūnus panašiomis Se dozėmis ir organine Se forma, rasti nepavyko. Tuo tarpu, priešingai, apie pelių kepenų ir inkstų masės indeksų padidėjimą naudojant 0,4 mg Se/kg kūno masės ir kitas dozes, nurodo Zhang su bendraautoriais [173].

Tolimesniame tyrimų etape buvo nustatytos Se koncentracijos BALB/c pelių kraujyje, kepenyse bei smegenyse. Gauti rezultatai parodė, kad vartojant seleną *per os* iš virškinamojo trakto jis patenka į kitus audinius ir didžiausias Se kiekis (lyginant su kontroline grupe) per 8 savaites sukaupiamas smegenyse, o mažesnis kiekis kepenyse. Nustatėme, jog ilgalaikis selenometionino vartojimas daugiau nei 12,6 karto padidino Se koncentraciją kraujyje, tuo tarpu kepenyse Se koncentracija padidėjo apie 15,4 karto ir daugiau nei 42 kartus smegenyse. Palyginome šiuos rezultatus su anksčiau paskelbto tyrimo rezultatais, kai pelės buvo veikiamos ta pačia Se doze (0,4 mg Se/ kg k.m.), tačiau kita t.y. neorganinio Se forma – natrio selenitu. Paaiškėjo, kad Se kiekis kraujyje buvo beveik 3 kartus didesnis tuomet, kai laboratorinės pelės buvo girdomos selenometionino tirpalu, lyginat su natrio selenito tirpalą gėrusiomis pelėmis [129]. Taip pat mūsų gauti rezultatai parodė, kad kontrolinės grupės pelės kepenyse sukauptas Se kiekis siekė $0,615 \pm 0,095 \mu\text{g/g}$ audinio. Kiek mažesnę Se kiekį ($0,44 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$) kontrolinių pelių kepenyse nurodo ir kiti autoriai [174]. Tuo tarpu peles girdant 8 savaites 0,4 mg SeMet doze, jų kepenyse sukaupta Se koncentracija buvo $9,49 \pm 0,33 \mu\text{g/g}$. Palyginus rezultatus su anksčiau mokslininkų grupės daryto tyrimo rezultatais, pastebėjome, kad pelių, girdytų ta pačia natrio selenito doze (0,4 mg Se/ kg k.m), kepenyse sukaupta Se koncentracija buvo $2,11 \pm 0,045 \mu\text{g/g}$ [129] t.y. 4,5 karto mažesnė. Nustačius Se kiekį pelių smegenyse, paaiškėjo, kad smegenys sukaupia 10 kartų mažiau Se nei kepenys. Tačiau ilgalaikis selenometionino tirpalo vartojimas daugiau nei 42,2 kartus padidino Se kiekį ($2,57 \pm 0,147 \mu\text{g/g}$) smegenyse, lyginant su kontrole. Tuo tarpu peles girdant tą patį laikotarpį 0,4 mg natrio selenito doze, smegenyse sukaupta Se koncentracija buvo tik 2,5 karto didesnė,

lyginant su kontrole [129]. Todėl apibendrinus mūsų gautus Se koncentracijų pelių audiniuose rezultatus, galime teigti, kad organinio seleno įsisavinimas organizme yra žymiai efektyvesnis, lyginant su neorganiniu Se. Kai kurie autoriai taip pat teigia, kad geriausiai organizme absorbuojamas yra organinis selenas: selenometioninas, selenocisteinas, nors dauguma seleno formų yra absorbuojamos gana efektyviai [175]. Mūsų atlikto tyrimo duomenys apie sukauptus Se kiekius smegenyse ir kepenyse po ilgalaikio selenometionino vartojimo papildė kitų autorių rezultatus. N. Akahoshi su bendraautoriais [176] parodė, kad po 6 savaičių trukmės eksperimentinių pelių šėrimo SeMet papildytu pašaru (20 mg SeMet/kg pašaro), nustatytas Se kiekio padidėjimas tiek kepenyse, tiek ir smegenyse. Daugiausiai Se buvo sukaupta kepenyse (~9 µg/g), tačiau ir smegenyse Se kiekis labai padidėjo (~2,5 µg/g). Kita vertus, reikia pabrėžti tai, kad atlikti palyginamąją Se koncentracijų analizę remiantis mokslinės literatūros duomenimis yra gana sudėtinga, kadangi duomenų nėra daug ir jie yra gana prieštaringi, o įtakos taip pat turi skirtumai tarp eksperimentinių gyvūnų modelių.

Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog kepenys reguliuoja viso organizmo Se kiekį, sintetindamos seleno baltymus, kuriuos sekretuodamos į kitus audinius palaiko normalią Se koncentraciją tiek visame organizme, tiek kiekviename audinyje/organe [177]. Yra nemažai mokslininkų atliktų tyrimų, kurių rezultatai parodė Se kaupimąsi įvairių organizmų, tame tarpe ir graužikų, kepenyse bei padidėjusią šio elemento koncentraciją kraujyje [178],[179],[173],[180]. Tai patvirtino ir mūsų tyrimo rezultatai, parodę daug kartų padidėjusią seleno baltymo P SELENOP geno raišką kepenyse. Mokslinėje literatūroje pabrėžiama, kad kai organizme Se yra pakankamai ir dar papildomai patenka jo perteklius, kepenys padidina Se pertekliaus šalinimą iš organizmo, leisdamos tik nežymiai padidėti jo kiekiui kituose organuose [177]. Tačiau mūsų gauti tyrimo rezultatai tam prieštarauja, kadangi rodo, jog ne tik kepenys, bet ir smegenys sukauptė didelius Se kiekius, lyginant su kontrole. Ir nors pagal mokslinės literatūros duomenis, daugiausiai seleno baltymo P sintetina kepenų ląstelės, vis tik seleno baltymą P koduojančio geno SELENOP raiška taip pat padidėja ir smegenyse [181]. Mūsų gauti rezultatai tam neprieštarauja. Tai rodo, jog kepenys nepajėgia išlaikyti Se pusiausvyros organizme po selenometionino pertekliaus gavimo, todėl smegenys pačios bando palaikyti šio elemento homeostazę, kadangi SelP yra svarbiausias seleno baltymas Se kiekio reguliavimui nerviniame audinyje [182]. Z-H. Zhang ir G-L Song [43] nustatė, kad pelės smegenyse vyksta 24 seleno baltymus koduojančių genų raiška. Sep15, SelM, SelK, SelP, GPx4 and SelW seleno baltymus koduojančių genų raiškos lygiai smegenyse yra didesni nei kitų seleno baltymų, o SELENOP geno raiška yra aktyvi daugiau nei 90 proc. smegenų sričių. Yra duomenų, kad Se kiekiai smegenyse ir smegenų skystyje nepriklauso nuo Se kiekio kraujyje, kadangi smegenys yra prioritetinis organas, nuolat saugomas nuo šio mikroelemento trūkumo [183] Tačiau esant Se pertekliui ir siekiant išvengti Se

sukeliamo toksiškumo, jo patekimą į nervinį audinį turėtų griežtai reguliuoja hematoencefalinis barjeras [184].

Se kiekio padidėjimas smegenyse galbūt galėtų būti vertinamas kaip teigiamas rezultatas, atspindintis smegenų gebėjimą sukaupti tam tikrą Se kaip antioksidanto kiekį. Tačiau norėdami įsitikinti, ar sukauptas pakankamai didelis Se kiekis smegenyse ir kituose tiriamuosiuose audiniuose neturi įtakos oksidacinio streso atsiradimui ląstelėse, įvertinome SeMet poveikį MDA, svarbaus lipidų peroksidacijos žymens susidarymui bei antioksidantinės sistemos pirmosios gynybinės linijos fermentų – superoksido dismutazės SOD ir katalazės CAT genų raiškai. MDA yra vienas galutinių polinesočiųjų riebalų rūgščių peroksidacijos produktų [8]. Jis parodo laisvųjų radikalų atakos laipsnį bei lipidų peroksidacijos lygį organizmo ląstelėse. Tyrimo metu gauti rezultatai parodė, kad pasirinkta Se dozė buvo pakankamai didelė, jog vartojama 8 savaites, padidintų ADF susidarymą smegenyse ir aktyvintų lipidų peroksidaciją šiame organe. Literatūroje yra pakankamai duomenų, jog didelės Se dozės gali veikti toksiškai bei padidinti ADF susidarymą [185,186]. Selenas gali neigiamai paveikti ląstelių redokso būklę ir sukelti ląstelių apoptozę, tiesiogiai oksiduodamas baltymų tiolio grupes ir glutathiono cisteino liekanas bei netiesiogiai sintetindamas ADF [187]. Ląstelėse susikaupiant didesniems Se kiekiams, jis reaguoja su GSH, susidarant labai aktyviam selenopersulfidui ($GSSe^-$) [188], kuris reaguoja su nauja GSH molekule susidarant superoksido anijonui. Seleno kaip prooksidanto poveikis dažniausiai pasireiškia neorganinio seleno formoje, tuo tarpu selenometioninas ir selenocisteinas, ypač jų L-izoformos, yra žinomos kaip mažiau toksiški seleno turintys junginiai [189]. Gautų tyrimų rezultatų nepakanka teigti, kad pelių smegenyse pasireiškiantis prooksidantinis Se poveikis yra tiesioginis. Manome, jog jis gali būti susijęs ir su kitų elementų homeostazės išderinimu. Mūsų gauti duomenys parodė, kad esant Se poveikiui, gerokai padidėja geležies, vario ir cinko koncentracijos pelių smegenyse. Tiek cinkas, tiek varis yra daugelio fermentinių reakcijų kofaktoriai. Jie reikalingi ir superoksido dismutazei (Cu/Zn-SOD) [190], kuri yra svarbus endogeninis antioksidantinis fermentas, katalizuojantis dviejų superoksido anijono molekulių dismutaciją į vandenilio peroksidą (H_2O_2) ir molekulinį deguonį, todėl žalingas superoksido anijonas tampa mažiau pavojingas. Yra duomenų, jog vario ir cinko homeostazės sutrikdymas ir perteklinė aktyvių deguonies formų gamyba gali sukelti DNR pažeidimus, baltymų modifikacijas ir galbūt vėžio vystymąsi [190]. Nors vario trūkumas gali sumažinti Cu/Zn-SOD aktyvumą ir pabloginti antioksidantinę apsaugą [191], esant dideliame vario kiekiui, jis taip pat gali turėti toksinį poveikį, ypač kepenyse, kur jis yra saugomas [192]. Nustatyta, kad cirkuliuojančio vario perteklius, palyginti su cinku, labiau padidina lipidų peroksidaciją ir išekvoja redukuoto glutathiono atsargas žiurkių kepenyse [193]. Cinkas yra redoksui inertiškas metalas, jis veikia kaip antioksidantas stabilizuodamas membranų struktūrą, apsaugodamas baltymo sulfhidrilines grupes ir padidindamas metalotioneinų raišką [194]. Cinko koncentracijos reguliavimas taip pat labai svarbus palaikant normalią neuronų tinklo sąveiką.

Kita vertus, šis mikroelementas vaidina svarbų vaidmenį tiek smegenų fiziologijoje, tiek ir patofiziologijoje [195]. Cinkas veikia kaip prooksidantas, kai ląstelėse yra šio mikroelemento trūkumas ar perteklius, galintis sukelti ląstelių oksidacinį stresą [194]. Tuomet jis tampa priešuždegiminiu bei proapoptotiniu veiksmiu. Maža cinko koncentracija sąlygoja oksidacinio streso susidarymą bei gali nulemti ląstelės apoptozę [196]. Cinko perteklius taip pat sukelia vario trūkumą, o tai susiję su daugeliu neigiamų padarinių, tame tarpe ir sumažėjusia superoksido dismutazės, reikalingos antioksidacinei gynybai [196,197], raiška. Mūsų atlikto tyrimo metu buvo nustatytas tiek Zn, tiek ir Cu koncentracijų smegenyse padidėjimas, o taip pat padidėjusi SOD1 geno raiška. SOD1 geno raiškos padidėjimas leidžia manyti, kad ADF susidarymas nerviniame audinyje išties yra padidėjęs. Svarbu pabrėžti ir numanomą geležies vaidmenį Se prooksidantinio veikimo mechanizme. Veikiant superoksido dismutazei, susidaręs H_2O_2 , nors ir nėra radikalas, tačiau gali oksiduoti baltymų -SH grupes ar metalų jonus, veikiančius kaip kofaktoriai, Fe-S centrus ir atpalaiduoti geležį. Mūsų tyrimo rezultatai kaip tik ir parodė Fe kiekio padidėjimą tiek smegenyse, tiek ir kepenyse. Ląstelėje esant šių metalų jonų, H_2O_2 gali būti paverstas hidroksilo radikalų vykstant Fentono arba Haberio ir Veiso reakcijoms, kuris gali pažeisti baltymus, DNR bei lipidus [198],[199], taip pat gali slopinti bet kurio antioksidantinio fermento sintezę ar sutrikdyti jos reguliavimą [200], nepaisant to, kad pačio geno raiška gali būti padidėjusi. Tą parodė ir mūsų tyrimo rezultatai. Panašu, jog katalazė, kaip substratą naudodama SOD reakcijos metu susidariusį H_2O_2 , nukenksmina tik dalį šių molekulių. Tiek smegenyse, tiek kepenyse šio fermento aktyvumas, lyginant su kontrole, yra slopinamas, tad tai gali būti ADF poveikio baltymams, tame tarpe ir fermentui katalazei, pasekmė. ADF poveikis gali būti trejopas: oksiduojamos aminorūgščių liekanos, pažeidžiami peptidiniai ryšiai ar agreguojami patys baltymai [201]. Yra duomenų, jog katalazės aktyvumą slopina įvairūs junginiai, tame tarpe ir natūralus substratas H_2O_2 (esant didesnei nei 0,1 mol koncentracijai) [202]. MDA perteklius taip pat gali turėti neigiamos įtakos fermento aktyvumui [135]. Taigi, galėjo būti daugybė priežasčių, galėjusių sąlygoti katalazės aktyvumo slopinimą mūsų tirtuose organuose. Smegenų katalazės aktyvumo sumažėjimą būtų galima paaiškinti sumažėjusia ir CAT geno raiška. Sumažėjusi CAT geno raiška dar nereiškia, kad nervinio audinio ląstelės nepatiria oksidacinio streso, nes, jose, priešingai, MDA lygis buvo padidėjęs, o tai rodo esant oksidacinio streso sąlygas. Tai leidžia manyti, kad smegenyse susidariusi Se koncentracija buvo tokia, jog galėjo pasireikšti kitų seleno baltymų, pvz., glutationo peroksidazės antioksidantinis veikimas, kadangi šio fermento, esančio citozolyje ir mitochondrijose, kaip ir katalazės, esančios peroksisomose, substratas yra H_2O_2 . Ypač aktyvią GPx1 geno raišką parodė mūsų atlikti, bet šiame darbe nepateikti rezultatai. Gali būti, kad žala, kurią sukelia geležis, skatindama ADF gamybą smegenyse, taip pat lemia mažesnis šio organo ADF toleravimas ir atkūrimo pajėgumas, palyginti su kitais organais ar ląstelėmis [203], pavyzdžiui eritrocitais ir kepenimis [204], kuriose, remiantis mūsų tyrimo duomenimis, buvo padidėjusi tiek SOD1, tiek CAT genų raiška

ir 198 kartus aktyvesnė, lyginant su kontrole, SELENOP geno raiška. Manoma, kad SeIP baltymas, be dalyvavimo Se homeostazės palaikyme organizme, pasižymi glutationo peroksidazei būdingu ir metalų surišimo aktyvumais [41,42]. Nors antioksidantinės sistemos fermentų genų raiškos tyrimai kraujyje nebuvo atlikti, gali būti, kad labai aktyvi eritrocitų katalazė ir geležies bei vario kiekių, lyginant su kontrole, sumažėjimas, galėjo lemti ir oksidacinio streso lygio sumažėjimą kraujyje, esant ilgalaikiam selenometionino poveikiui. Tuo tarpu pelėms 8 savaites vartojant selenometioniną, geležies homeostazės sutrikdymas smegenyse, kuomet geležies lygis padidėjo 1,4 karto, galėjo veikti neurotoksiškai. Neurotoksiškumo mechanizmai gali būti labai įvairūs [205]. Geležies kaupimasis gali būti susijęs su kraujo ir smegenų hematoencefalinio barjero pralaidumo padidėjimu, uždegimo atsiradimu, geležies persiskirstymu smegenyse ir geležies homeostazės pokyčiais dėl geležies nešiklių DMT1 ir feroportino pakitimų [206,207]. Neuronuose geležies perteklius gali sukelti apoptozę, o glijos ląstelėse jis gali padidinti priešuždegiminių citokinų (naviko nekrozės faktoriaus α , interleukino-6) išsiskyrimą, sukeldamas neurouždegimą ir neurodegeneracinius pokyčius [208]. Galimai šie neurodegeneraciniai pokyčiai gali būti susiję ir su mūsų tyrimo metu nustatytu smegenų masės indekso sumažėjimu.

Apibendrinus gautus rezultatus, galima teigti, kad mūsų tyrimuose naudota Se dozė (0,4 mg Se/ kg kūno masės), kurios poveikis tęsėsi 2 mėnesius, darė įtaką tiek smegenims, tiek kepenims. Smegenyse Se veikė kaip prooksidantas ir šį jo poveikį galimai sustiprino padidėję mikroelementų Fe, Cu ir Zn kiekiai bei sumažėjusi CAT geno raiška, todėl smegenys nepajėgė apsisaugoti nuo perteklinio Se neigiamo poveikio. Tuo tarpu lipidų peroksidacijos lygio sumažėjimas kepenyse, aktyvi SOD ir CAT genų ir ypač seleno baltymo P SELENOP geno raiška leidžia manyti, kad šio organo antioksidantinė gynyba neleido ląstelėms patirti oksidacinio streso sąlygų, nepaisant Fe ir Zn homeostazės išderinimo. Nors viena svarbiausių kepenų funkcijų organizme yra žalingų junginių ar ADF nuklenksminimas siekiant apsaugoti ne tik save, bet ir kitus audinius nuo jų sukeliama toksiško poveikio, gali būti, kad kepenų apsauginių sistemų pajėgumai smegenų atžvilgiu buvo nepakankami ar per ilgesnį laiką išseikvoti. Ateityje reikalingi išsamesni ląstelių antioksidantinės sistemos tyrimai, padėsiantys rasti atsakymus į daugybę iškilusių ir likusių neatsakytų klausimų.

5 IŠVADOS

1. 8 savaičių trukmės laboratorinių BALB/c pelių girdymas selenometionino (0,4 Se dozė - 0,4 mg Se/kg k. m.) tirpalu statistiškai reikšmingai sumažino jų kūno masės prieaugį 4-ą ir 6-ą eksperimento savaitę bei smegenų masę, lyginant su kontrole.
2. Kontrolinių pelių kepenyse, lyginant su smegenimis, yra sukaupiamas didesnis Se kiekis. Po ilgalaikio selenometionino tirpalo vartojimo, Se kiekis kraujyje padidėjo 12 kartų, kepenyse – 15 kartų, o smegenyse – 42 kartus.
3. Selenometioninas turėjo reikšmingos įtakos geležies, cinko ir vario homeostazei: kraujyje Fe ir Cu kiekiai sumažėjo, tuo tarpu kepenyse Fe ir Zn, o smegenyse visų tirtų elementų kiekiai padidėjo po 8 savaičių trukmės 0,4 Se dozės vartojimo.
4. Esant ilgalaikiam organinio seleno poveikiui, statistiškai reikšmingai padidėjo lipidų peroksidacijos žymens – malondialdehido kiekis kraujyje ir smegenyse, tačiau sumažėjo kepenyse, lyginant su kontrole.
5. Po ilgalaikio pelių girdymo selenometionino tirpalu, statistiškai reikšmingai padidėjo SOD1 geno bei sumažėjo CAT geno raiška ir katalazės aktyvumas smegenyse, kai tuo tarpu kepenyse, priešingai, CAT geno raiška padidėjo, tačiau fermento aktyvumas sumažėjo; taip pat abiejuose organuose padidėjo Se homeostazėje dalyvaujančio seleno baltymo P SELENOP geno raiška.

6 LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kieliszek M. Selenium–fascinating microelement, properties and sources in food. Vol. 24, *Molecules*. MDPI AG; 2019.
2. Steinbrenner H, Speckmann B, Klotz LO. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2016 Apr 1;595:113–9.
3. Natasha, Shahid M, Niazi NK, Khalid S, Murtaza B, Bibi I, et al. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environmental Pollution*. 2018 Mar;234:915–34.
4. Hu T, Liang Y, Zhao G, Wu W, Li H, Guo Y. Selenium biofortification and antioxidant activity in *Cordyceps militaris* supplied with selenate, selenite, or selenomethionine. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Feb 31;187(2):553–61.
5. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Selenium and redox signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2017 Mar;617:48–59.
6. Brodin O, Eksborg S, Wallenberg M, Asker-Hagelberg C, Larsen EH, Mohlkert D, et al. Pharmacokinetics and toxicity of sodium selenite in the treatment of patients with carcinoma in a phase I clinical trial: The SECAR study. *Nutrients*. 2015 Jun 19;7(6):4978–94.
7. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
8. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Vol. 2014, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Landes Bioscience; 2014.
9. Kieliszek M, Błazejak S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*. 2013 May;29(5):713–8.
10. Duntas LH, Benvenga S. Selenium: an element for life. *Endocrine*. 2015 Apr 18;48(3):756–75.
11. Kieliszek M, Błazejak S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. Vol. 21, *Molecules*. MDPI AG; 2016.

12. Hu T, Liang Y, Zhao G, Wu W, Li H, Guo Y. Selenium biofortification and antioxidant activity in cordyceps militaris supplied with selenate, selenite, or selenomethionine. *Biol Trace Elem Res.* 2019 Feb 31;187(2):553–61.
13. Kieliszek M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. Vol. 24, *Molecules.* MDPI AG; 2019.
14. Bodnar M, Szczygłowska M, Konieczka P, Namiesnik J. Methods of selenium supplementation: bioavailability and determination of selenium compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Jan 2;56(1):36–55.
15. Stoffaneller R, Morse NL. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. Vol. 7, *Nutrients.* MDPI AG; 2015. p. 1494–537.
16. Sobolev O, Gutyj B, Petryshak R, Pivtorak J, Kovalskyi Y, Naumyuk A, et al. Biological role of selenium in the organism of animals and humans. *Ukr J Ecol.* 2018;8(1):654–65.
17. Frączek A, Pasternak K. Selenium in medicine and treatment. *Journal of Elemntology.* 2012 Sep 24;(1/2013).
18. Kieliszek M, Błażejczak S, Kurek E. Binding and conversion of selenium in *Candida utilis* ATCC 9950 yeasts in bioreactor culture. *Molecules.* 2017 Feb 25;22(3):352.
19. Murdolo G, Bartolini D, Tortoioli C, Piroddi M, Torquato P, Galli F. Selenium and cancer stem cells. In 2017. p. 235–57.
20. Raines AM, Sunde RA. Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics.* 2011 Jan 12;12.
21. Lyons MP, Papazyan TT, Surai PF. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature -review-. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2007 Jun 27;20(7):1135–55.
22. Kipp AP, Strohm D, Brigelius-Flohé R, Schomburg L, Bechthold A, Leschik-Bonnet E, et al. Revised reference values for selenium intake. *J Trace Elem Med Biol.* 2015 Oct;32:195–9.
23. Duntas LH, Benvenga S. Selenium: an element for life. Vol. 48, *Endocrine.* Humana Press Inc.; 2015. p. 756–75.

24. Kieliszek M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. *molecules*. 2019 Apr 3;24(7):1298.
25. Ungvári É, Monori I, Megyeri A, Csiki Z, Prokisch J, Sztrik A, et al. Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 2014;64:298–306.
26. Raines AM, Sunde RA. Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics*. 2011 Dec 12;12(1):26.
27. Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life*. 2014 Apr;66(4):229–39.
28. Wolfram S. Mechanisms of intestinal absorption of selenium. *Med Klin (Munich)*. 1995 Jan 15;90 Suppl 1:1–5.
29. Ha HY, Alfulajj N, Berry MJ, Seale LA. From selenium absorption to selenoprotein degradation. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Nov 21;192(1):26–37.
30. Kato T, Read R, Rozga J, Burk RF. Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Physiol.* 1992 May 1;262(5):G854–8.
31. Minich WB. Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body. *Biochemistry (Moscow)*. 2022 Jan 31;87(S1):S168–77.
32. Ferreira RLU, Sena-Evangelista KCM, de Azevedo EP, Pinheiro FI, Cobucci RN, Pedrosa LFC. Selenium in human health and gut microflora: bioavailability of selenocompounds and relationship with diseases. *Front Nutr*. 2021 Jun 4;8.
33. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu Rev Nutr*. 2015 Jul 17;35(1):109–34.
34. Suzuki KT, Somekawa L, Suzuki N. Distribution and reuse of ⁷⁶Se-selenosugar in selenium-deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Oct;216(2):303–8.
35. Pitts MW, Byrns CN, Ogawa-Wong AN, Kremer P, Berry MJ. Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Dec 1;161(3):231–45.

36. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis G. Selenium-dependent antioxidant enzymes: actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants*. 2018 May 14;7(5):66.
37. Stefan N, Häring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Mar 22;9(3):144–52.
38. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008 Mar 28;13(2):102–8.
39. Kieliszek M, Bano I, Zare H. A comprehensive review on selenium and its effects on human health and distribution in Middle Eastern countries. *Biol Trace Elem Res*. 2022 Mar 21;200(3):971–87.
40. Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life*. 2014 Apr;66(4):229–39.
41. Pitts MW, Byrns CN, Ogawa-Wong AN, Kremer P, Berry MJ. Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Dec 1;161(3):231–45.
42. Mita Y, Nakayama K, Inari S, Nishito Y, Yoshioka Y, Sakai N, et al. Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat Commun*. 2017 Dec 21;8(1):1658.
43. Zhang ZH, Song GL. Roles of selenoproteins in brain function and the potential mechanism of selenium in Alzheimer’s disease. *Front Neurosci*. 2021 Mar 8;15.
44. Renko K, Werner M, Renner-Müller I, Cooper TG, Yeung CH, Hollenbach B, et al. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in *Sepp*-knockout mice. *Biochem. J*. 2008 Feb 1;409(3):741–9.
45. Pitts MW, Byrns CN, Ogawa-Wong AN, Kremer P, Berry MJ. Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Dec 1;161(3):231–45.
46. Chen M, Liu B, Wilkinson D, Hutchison AT, Thompson CH, Wittert GA, et al. Selenoprotein P is elevated in individuals with obesity, but is not independently associated with insulin resistance. *Obes Res Clin Pract*. 2017 Mar;11(2):227–32.

47. Choi HY, Hwang SY, Lee CH, Hong HC, Yang SJ, Yoo HJ, et al. Increased Selenoprotein P levels in subjects with visceral obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab J*. 2013;37(1):63.
48. Baran A, Nowowiejska J, Krahel JA, Kaminski TW, Maciaszek M, Flisiak I. Higher serum selenoprotein p level as a novel inductor of metabolic complications in psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 1;21(13):1–15.
49. Ishikura K, Misu H, Kumazaki M, Takayama H, Matsuzawa-Nagata N, Tajima N, et al. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia*. 2014 Sep 3;57(9):1968–76.
50. Tsutsumi R, Saito Y. Selenoprotein P; P for plasma, prognosis, prophylaxis, and more. *Biol Pharm Bull*. 2020 Mar 1;43(3):366–74.
51. Saito Y. Selenium Transport Mechanism via Selenoprotein P—its physiological role and related diseases. *Front Nutr*. 2021 May 28;8.
52. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu Rev Nutr*. 2015 Jul 17;35(1):109–34.
53. Takamura T. Hepatokine Selenoprotein P-mediated reductive stress causes resistance to intracellular signal transduction. *Antioxid Redox Signal*. 2020 Sep 1;33(7):517–24.
54. Ogawa-Wong AN, Berry MJ, Seale LA. Selenium and metabolic disorders: an emphasis on type 2 diabetes risk. *Nutrients*. 2016 Feb 6;8(2):80.
55. Gammella E, Correnti M, Cairo G, Recalcati S. Iron availability in tissue microenvironment: the key role of ferroportin. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 15;22(6):2986.
56. Himoto T, Masaki T. Associations between zinc deficiency and metabolic abnormalities in patients with chronic liver disease. *Nutrients*. 2018 Jan 14;10(1):88.
57. Barbara M, Mindikoglu AL. The role of zinc in the prevention and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabol Open*. 2021 Sep;11:100105.

58. Kozeniecki M, Ludke R, Kerner J, Patterson B. Micronutrients in liver disease: roles, risk factors for deficiency, and recommendations for supplementation. *Nutr Clin Pract*. 2020 Feb;35(1):50–62.
59. Wu J, Meng QH. Current understanding of the metabolism of micronutrients in chronic alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2020 Aug 21;26(31):4567–78.
60. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol. Cell*. 2019 Dec;1866(12):118535.
61. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial. Int* 2017 Apr;21:S6–20.
62. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J*. 2011 Mar 15;434(3):365–81.
63. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha ÁF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. 2011 Apr;64(4):281–6.
64. Spiers JG, Tan LS, Anderson ST, Hill AF, Lavidis NA, Chen HJC. Hepatic homeostasis of metal ions following acute repeated stress exposure in rats. *Antioxidants*. 2021 Dec 29;11(1):85.
65. Mancardi D, Mezzanotte M, Arrigo E, Barinotti A, Roetto A. iron overload, oxidative stress, and ferroptosis in the failing heart and liver. *Antioxidants*. 2021 Nov 24;10(12):1864.
66. Spiers JG, Tan LS, Anderson ST, Hill AF, Lavidis NA, Chen HJC. Hepatic homeostasis of metal ions following acute repeated stress exposure in rats. *Antioxidants*. 2021 Dec 29;11(1):85.
67. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 17;22(12):6493.
68. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* (1979). 1988 Apr 29;240(4852):640–2.
69. Pietrangelo A. Mechanisms of iron hepatotoxicity. *J Hepatol*. 2016 Jul;65(1):226–7.
70. Yiannikourides A, Latunde-Dada G. A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders. *Medicines*. 2019 Aug 5;6(3):85.

71. Mancardi D, Mezzanotte M, Arrigo E, Barinotti A, Roetto A. Iron overload, oxidative stress, and ferroptosis in the failing heart and liver. *Antioxidants*. 2021 Nov 24;10(12):1864.
72. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev*. 2015 Jul;95(3):749–84.
73. Kageyama A, Terakawa J, Ito J, Kashiwazaki N. Roles of zinc signaling in mammalian reproduction. *Metallomics Research*. 2022;2(1):rev-64-rev-73.
74. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev*. 2015 Jul;95(3):749–84.
75. Reyes JG. Zinc transport in mammalian cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 1996 Feb 1;270(2):C401–10.
76. Bloom A, Bloom S, Silva H, Nicoll AJ, Sawhney R. Zinc supplementation and its benefits in the management of chronic liver disease: An in-depth literature review. *Ann Hepatol*. 2021 Nov;25:100549.
77. Mohammad MK, Zhou Z, Cave M, Barve A, McClain CJ. Zinc and liver disease. *Nutrition in clinical practice*. 2012 Feb 2;27(1):8–20.
78. Chasapis CT, Ntoupa PSA, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch Toxicol*. 2020 May 12;94(5):1443–60.
79. Hojyo S, Fukada T. Roles of zinc signaling in the immune system. *J Immunol Res*. 2016;2016:1–21.
80. Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol. Cell*. 2012 Sep;1823(9):1416–25.
81. Qu W, Waalkes MP. Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Feb;282(3):267–74.

82. Dubé A, Harrisson JF, Saint-Gelais G, Séguin C. Hypoxia acts through multiple signaling pathways to induce metallothionein transactivation by the metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1). *Biochem. Cell Biol.* 2011 Dec;89(6):562–77.
83. Lutsenko S, Bhattacharjee A, Hubbard AL. Copper handling machinery of the brain. *Metallomics.* 2010;2(9):596.
84. An Y, Li S, Huang X, Chen X, Shan H, Zhang M. The role of copper homeostasis in brain disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 10;23(22):13850.
85. Linder MC. Copper homeostasis in mammals, with emphasis on secretion and excretion. A Review. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 13;21(14):4932.
86. Moriya M, Ho YH, Grana A, Nguyen L, Alvarez A, Jamil R, et al. Copper is taken up efficiently from albumin and α_2 -macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2008 Sep;295(3):C708–21.
87. Ramos D, Mar D, Ishida M, Vargas R, Gaité M, Montgomery A, et al. Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PLoS One.* 2016 Mar 2;11(3):e0149516.
88. Peña MMO, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 1999 Jul 1;129(7):1251–60.
89. Thiele DJ. Integrating Trace Element Metabolism from the Cell to the Whole Organism. *J Nutr.* 2003 May 1;133(5):1579S-1580S.
90. Boyd SD, Ullrich MS, Skopp A, Winkler DD. Copper sources for sod1 activation. *antioxidants.* 2020 Jun 7;9(6):500.
91. Hatori Y, Lutsenko S. The role of copper chaperone Atox1 in coupling redox homeostasis to intracellular copper distribution. *Antioxidants.* 2016 Jul 27;5(3):25.
92. Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jul;463(2):134–48.

93. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Isumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):749–84.
94. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Anatomical region differences and age-related changes in copper, zinc, and manganese levels in the human brain. *Biol Trace Elem Res.* 2014 Nov 15;161(2):190–201.
95. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Iron levels in the human brain: A post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem Med Biol.* 2014 Jan;28(1):13–7.
96. Kwik-Urbe CL, Gietzen D, German JB, Golub MS, Keen CL. Chronic marginal iron intakes during early development in mice result in persistent changes in dopamine metabolism and myelin composition. *J Nutr.* 2000 Nov 1;130(11):2821–30.
97. Kennedy BC, Dimova JG, Siddappa AJM, Tran P v., Gewirtz JC, Georgieff MK. Prenatal choline supplementation ameliorates the long-term neurobehavioral effects of fetal-neonatal iron deficiency in rats. *J Nutr.* 2014 Nov 1;144(11):1858–65.
98. Georgieff MK. The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochem Soc Trans.* 2008 Dec 1;36(6):1267–71.
99. DiGirolamo AM, Ramirez-Zea M. Role of zinc in maternal and child mental health. *Am J Clin Nutr.* 2009 Mar 1;89(3):940S-945S.
100. Bredholt M, Frederiksen JL. Zinc in multiple sclerosis. *ASN Neuro.* 2016 Jun 9;8(3):175909141665151.
101. Prasad AS. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol.* 2008 May;43(5):370–7.
102. Levenson CW, Morris D. Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. *Adv Nutr.* 2011 Mar 1;2(2):96–100.
103. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011 Oct 10;16(7):1123–34.

104. Kardos J, Héja L, Simon Á, Jablonkai I, Kovács R, Jemnitz K. Copper signalling: causes and consequences. *Cell Commun. Signal.*. 2018 Dec 22;16(1):71.
105. An Y, Li S, Huang X, Chen X, Shan H, Zhang M. The role of copper homeostasis in brain disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 10;23(22):13850.
106. Kodama H, Fujisawa C. Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics.* 2009;1(1):42–52.
107. Ndayisaba A, Kaindlstorfer C, Wenning GK. Iron in neurodegeneration – cause or consequence? *Front Neurosci.* 2019 Mar 1;13.
108. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010 Dec 22;345(1–2):91–104.
109. Zheng W, Monnot AD. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2012 Feb;133(2):177–88.
110. Kozłowski H, Janicka-Kłos A, Brasun J, Gaggelli E, Valensin D, Valensin G. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coord Chem Rev.* 2009 Nov;253(21–22):2665–85.
111. Kozłowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord Chem Rev.* 2012 Oct;256(19–20):2129–41.
112. Ozcelik D, Uzun H. Copper intoxication; antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Biol Trace Elem Res.* 2009 Jan 12;127(1):45–52.
113. Rossi L, Squitti R, Calabrese L, Rotilio G, Rossini PM. Alteration of peripheral markers of copper homeostasis in Alzheimer's disease patients: implications in aetiology and therapy. *J Nutr Health Aging.* 2007;11(5):408–17.
114. Sturniolo GC, Mestriner C, Irato P, Albergoni V, Longo G, D'Inca R. Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 1999 Feb;94(2):334–8.

115. Narayanan SE, Rehuman NA, Harilal S, Vincent A, Rajamma RG, Behl T, et al. Molecular mechanism of zinc neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020 Dec 9;27(35):43542–52.
116. Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr.* 2013 Mar 1;4(2):176–90.
117. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol.* 2006 May;20(1):3–18.
118. Bjorklund G. The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2013;73(2):225–36.
119. Yasuda H, Yoshida K, Yasuda Y, Tsutsui T. Infantile zinc deficiency: association with autism spectrum disorders. *Sci Rep.* 2011 Dec 3;1(1):129.
120. Grubucker AM. Environmental factors in autism. *Front Psychiatry.* 2013;3.
121. Zhou Y, Lin W, Rao T, Zheng J, Zhang T, Zhang M, et al. Ferroptosis and its potential role in the nervous system diseases. *J Inflamm Res.* 2022 Mar;Volume 15:1555–74.
122. Ndayisaba A, Kaindlstorfer C, Wenning GK. Iron in neurodegeneration – cause or consequence? *Front Neurosci.* 2019 Mar 1;13.
123. Chen L, Min J, Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Nov 23;7(1):378.
124. Pal A, Prasad R. Regional distribution of copper, zinc and iron in brain of Wistar rat model for Non-Wilsonian brain copper toxicosis. *Indian J Clin Biochem.* 2016 Jan 28;31(1):93–8.
125. Yakimoskii AF, Shantyr II, Vlasenko MA, Yakovleva M v. Effects of acyzol on zinc content in rat brain and blood plasma. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Jan 14;162(3):293–4.
126. Bell SG, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem.* 2009 Jan 5;10(1):55–62.
127. Yildiz A, Kaya Y, Tanriverdi O. Effect of the interaction between selenium and zinc on DNA repair in association with cancer prevention. *J Cancer Prev.* 2019 Sep 30;24(3):146–54.

128. Sharma SK, Bansal MP, Sandhir R. Altered dietary selenium influences brain iron content and behavioural outcomes. *Behav. Brain Res.* 2019 Oct;372:112011.
129. Staneviciene I, Sulinskiene J, Sadauskiene I, Liekis A, Ruzgaite A, Naginiene R, et al. Effect of selenium on the iron homeostasis and oxidative damage in brain and liver of mice. *Antioxidants.* 2022 Jun 21;11(7):1216.
130. Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, et al. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience.* 2013 Sep;248:345–58.
131. Navarro-Yepes J, Zavala-Flores L, Anandhan A, Wang F, Skotak M, Chandra N, et al. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol Ther.* 2014 May;142(2):206–30.
132. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta.* 2014 Sep;436:332–47.
133. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Oct;46:200–6.
134. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul 15;21(7):363–83.
135. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Vol. 2014, *Oxidative Oxid. Med. Cell. Longev.* Landes Bioscience; 2014.
136. Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online.* 2012 Dec;25(6):551–60.
137. van Velzen LS, Wijdeveld M, Black CN, van Tol MJ, van der Wee NJA, Veltman DJ, et al. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017 Jun;76:140–4.

138. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017 May;524:13–30.
139. Khoubnasab Jafari M, Ansarin K, Jouyban A. Comments on “use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review”. *Iran J Public Health.* 2015 May;44(5):714–5.
140. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Ustundag B, Bulut S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology.* 2002;46(4):186–9.
141. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem.* 2006 Sep;39(9):947–54.
142. Marija M, Paško K, Jasna L, Marijan K, Marta K, Nada V, et al. The influence of gemfibrozil on malondialdehyde level and paraoxonase 1 activity in Wistar and Fisher rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 Jun;108(6):428–35.
143. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 2018 Dec 1;54(4):287–93.
144. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 2005 Jan 1;79(1–2):157–65.
145. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2010 Dec;48(12):909–30.
146. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995 Jun;64(1):97–112.
147. Strange RW, Antonyuk S, Hough MA, Doucette PA, Rodriguez JA, Hart PJ, et al. The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol.* 2003 May;328(4):877–91.

148. Roberts BR, Tainer JA, Getzoff ED, Malencik DA, Anderson SR, Bomben VC, et al. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J Mol Biol.* 2007 Nov;373(4):877–90.
149. Krishnamurthy P, Wadhvani A. Antioxidant enzymes and human health. in: antioxidant enzyme. InTech; 2012.
150. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 1984 Sep 15;222(3):649–55.
151. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jan 1;61(2):192–208.
152. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1991 Nov;266(32):22028–34.
153. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan 1;82(1):47–95.
154. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Jan;59(2):163–70.
155. Tas F, Hansel H, Belce A, Ilvan S, Argon A, Camlica H, et al. Oxidative stress in breast cancer. *Medical Oncology.* 2005;22(1):011–6.
156. Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy J, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem.* 2005 Feb;38(2):154–8.
157. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis C de, Marinari UM, et al. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–16.
158. Wang X, Yang Y, Zhang H, Liu J. Safety assessment and comparison of sodium selenite and bioselenium obtained from yeast in mice. *Biomed Res Int.* 2017;2017.

159. Pochinok TV, Veselova TV, Gorobetz NI. Protein peroxidation and lipid peroxidation in children with undifferentiated dysplasia of connective tissue. *Sovremennaya pediatriya* [Internet]. 2016 Mar 31;(2(74)):36–40. Available from: <https://med-expert.com.ua/en/protein-peroxidation-and-lipid-peroxidation-in-children-with-undifferentiated-dysplasia-of-connective-tissue/>
160. Uchiyama M, Mihara M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. Vol. 86, *Anal. Biochem.* 1978.
161. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Vol. 9, *Free Radical Biology & Medicine.* 1990.
162. Sadauskiene I, Liekis A, Bernotiene R, Sulinskiene J, Kasauskas A, Zekonis G. The effects of buckwheat leaf and flower extracts on antioxidant status in mouse organs. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Jun 14;2018:1–7.
163. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase chain reaction (PCR). In: *food toxicants analysis.* Elsevier; 2007. p. 147–87.
164. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013 Aug;3(3):71–85.
165. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013 Aug;3(3):92–95.
166. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. Vol. 32, *Toxicol Pathol.* 2004. p. 126–31.
167. Zhai Q, Xiao Y, Li P, Tian F, Zhao J, Zhang H, et al. Varied doses and chemical forms of selenium supplementation differentially affect mouse intestinal physiology. *Food Funct.* 2019;10(9):5398–412.
168. Preedy VR, Watson RR. *Reviews in food and nutrition toxicity, Volume 4.* CRC Press; 2005.

169. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Apr;16(7):705–43.
170. Edens FW, Sefton AE. Organic selenium in animal nutrition – utilisation, metabolism, storage and comparison with other selenium sources. *Anim Nutr*. 2016;4.
171. Moreno-Reyes R, Egrise D, Ne`ve J, Ne`ve N, Pasteels JL, Schoutens A. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. 2001.
172. Arthur JR, Nicol F, Beckeit GJ. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases"2 [Internet]. Vol. 57, *Nuir Supp*. 1993. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/57/2/236S/4715275>
173. Zhang Q, Chen L, Guo K, Zheng L, Liu B, Yu W, et al. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Aug;154(2):255–61.
174. Łanocha-Arendarczyk N, Baranowska-Bosiacka I, Kot K, Pilarczyk B, Tomza-Marciniak A, Kabat-Koperska J, et al. Biochemical profile, liver and kidney selenium (Se) status during acanthamoebiasis in a mouse model. *Folia Biol (Praha)*. 2018 Jun 22;66(1):33–40.
175. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*. 2010 May 1;91(5):1484S-1491S.
176. Akahoshi N, Anan Y, Hashimoto Y, Tokoro N, Mizuno R, Hayashi S, et al. Dietary selenium deficiency or selenomethionine excess drastically alters organ selenium contents without altering the expression of most selenoproteins in mice. *J Nutr Biochem*. 2019 Jul;69:120–9.
177. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. Vol. 35, *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews Inc.; 2015. p. 109–34.
178. Li KX, Wang JS, Yuan D, Zhao RX, Wang YX, Zhan XA. Effects of different selenium sources and levels on antioxidant status in broiler breeders. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2018 Dec 1;31(12):1939–45.

179. Kang S, Li R, Jin H, You HJ, Ji GE. Effects of selenium- and zinc-enriched *Lactobacillus plantarum* SeZi on antioxidant capacities and Gut microbiome in an ICR mouse Model. *antioxidants*. 2020 Oct 21;9(10):1028.
180. Grotto D, Carneiro MFH, de Castro MM, Garcia SC, Junior FB. Long-term excessive selenium supplementation induces hypertension in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2018 Mar 1;182(1):70–7.
181. Zhang Y, Zhou Y, Schweizer U, Savaskan NE, Hua D, Kipnis J, et al. Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. *J. Bio. Chem*. 2008 Jan;283(4):2427–38.
182. Burk RF, Hill KE, Motley AK, Winfrey VP, Kurokawa S, Mitchell SL, et al. Selenoprotein P and apolipoprotein E receptor-2 interact at the blood-brain barrier and also within the brain to maintain an essential selenium pool that protects against neurodegeneration. *FASEB J.* 2014 Aug 23;28(8):3579–88.
183. Solovyev N, Drobyshev E, Blume B, Michalke B. Selenium at the neural barriers: a review. Vol. 15, *Front. Neurosci.*; 2021.
184. Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 1;7(1).
185. Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox (Review). *Mol Med Rep*. 2011 Oct 31;
186. Song G, Zhang Z, Wen L, Chen C, Shi Q, Zhang Y, et al. Selenomethionine ameliorates cognitive decline, reduces tau hyperphosphorylation, and reverses synaptic deficit in the triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2014 Jun 4;41(1):85–99.
187. Stolwijk JM, Garje R, Sieren JC, Buettner GR, Zakharia Y. Understanding the redox biology of selenium in the search of targeted cancer therapies. Vol. 9, *Antioxidants*. MDPI; 2020.
188. Shen HM, Yang CF, Ding WX, Liu J, Ong CN. Original contribution superoxide radical-initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated hepg 2 cells: mitochondria serve as the main target. 2000.
189. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. Vol. 17, *Free Radic. Biol. Med.* 1994.

190. Osredkar J. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol.* 2011;s3(01).
191. Aigner E. Dysregulation of iron and copper homeostasis in nonalcoholic fatty liver. *World J Hepatol.* 2014;7(2):177.
192. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011 Jun 15;2011:1–13.
193. Ozcelik D, Ozaras R, Gurel Z, Uzun H, Aydin S. Copper-mediated oxidative stress in rat liver. *Biol Trace Elem Res.* 2003;96(1–3):209–16.
194. Lee SR. Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–11.
195. Li Z, Liu Y, Wei R, Yong VW, Xue M. The important role of zinc in neurological diseases. *Biomolecules.* 2022 Dec 23;13(1):28.
196. Marreiro D, Cruz K, Morais J, Beserra J, Severo J, de Oliveira A. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants.* 2017 Mar 29;6(2):24.
197. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr.* 2013 Jan 1;4(1):82–91.
198. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal.* 2012;5(1):9–19.
199. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Vol. 24, *Curr. Biol. Cell Press*; 2014.
200. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Jul 7;14.
201. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 28;22(9):4642.

202. Aksoy Y., Balk M., Ögüş İ. H., Özer N. The mechanism of inhibition of human erythrocyte catalase by Azide. *Turk. J. Biol.* 2004;28(2):65–70.
203. Wang Y, Wu Y, Li T, Wang X, Zhu C. Iron metabolism and brain development in premature infants. *Front Physiol.* 2019 Apr 25;10.
204. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes.* 2012 Mar;61(3):728–38.
205. Garza-Lombó C, Posadas Y, Quintanar L, Gonsebatt ME, Franco R. Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: redox signaling and oxidative stress. *antioxid redox signal.* 2018 Jun 20;28(18):1669–703.
206. Ye H, Rouault TA. Human iron–sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry.* 2010 Jun 22;49(24):4945–56.
207. Yao B, Bagnato F, Matsuura E, Merkle H, van Gelderen P, Cantor FK, et al. Chronic multiple sclerosis lesions: characterization with high-field-strength mr imaging. *Radiology.* 2012 Jan;262(1):206–15.
208. Pandolfo M. Friedreich Ataxia. *J Child Neurol.* 2012 Sep 29;27(9):1204–11.
209. Minich WB. Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body. *Biochemistry (Moscow).* 2022 Jan 31;87(S1):S168–77.
210. Yadav UCS, Ramana K v. Regulation of NF-B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1–11.
211. Wangler MF, Bellen HJ. In vivo animal modeling: *Drosophila*. In: basic science methods for clinical researchers. Elsevier Inc.; 2017. p. 211–34.

7 PRIEDAI

1 priedas

DARBO RĖMIMO, AUTORIAUS INDĖLIO IR GALIMO INTERESŲ KONFLIKTO DEKLARACIJA

Baigiamojo darbo autoriaus pavardė ir vardas: Levinas Dovydas

Baigiamojo darbo pavadinimas lietuvių kalba: Seleno poveikio biogeninių elementų homeostazei bei lipidų peroksidacijai įvertinimas eksperimentinių pelių organuose

Baigiamojo darbo pavadinimas anglų kalba: Evaluation of the selenium effect on the biogenic elements homeostasis and lipid peroxidation in the experimental mice organs

Darbas remiamas: LSMU Medicinos fakulteto lėšomis

Patvirtinu, kad baigiamasis darbas atliktas ir parašytas savarankiškai, nepažeidžiant kitiems asmenims priklausančių autorinių teisių.

Bakalauranto vardas, pavardė ir parašas: Dovydas Levinas

Vadovo vardas, pavardė ir parašas: dr. doc. Inga Stanevičienė

2 priedas



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

BIOETIKOS CENTRAS

Kodas 302536989, Tilžės g. 18, LT- 47181, Kaunas, tel.: (8 37) 327233, www.lsmuni.lt, el.p.: bec.registracija@lsmuni.lt

Medicinos akademijos (MA)
Pirmos pakopos studijų programa – Medicininė
ir veterinarinė biochemija
III k. studentui Dovydui Levinui
Darbo vadovė doc. Inga Stanevičienė
LSMU Biochemijos katedra

2022.04.15 Nr. BEC-MVB(B)-367

DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs Dovydo Levino pateiktus dokumentus, studento tiriamajam darbui tema „Seleno poveikio biogeninių elementų homeostazei bei lipidų persoksidacijai įvertinimas eksperimentinių pelių organuose“ pritaria*.


Dr. Eimantas Pečiūsis

* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vykdančių asmenų nuo prievolės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomedicininį tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.

Padėka

Nuoširdžiai norėčiau padėkoti LSMU Medicinos akademijos neuromokslų instituto molekulinės neurobiologijos laboratorijos ir toksikologijos laboratorijos kolektyvams už nuoširdžią pagalbą, atliekant baigiamąjį bakalauro darbą. Dėkoju dr. Arūnui Liekiui už suteiktą pagalbą, atliekant katalazės aktyvumo nustatymo tyrimus, prof. Ilonai Sadauskienei už suteiktą pagalbą ir naudingus patarimus nustatinėjant MDA (malondialdehido) koncentraciją audiniuose, jaunesniajai mokslo darbuotojai Giedrei Miniotaitei už pagalbą atliekant genų raiškos įvertinimo tyrimus bei vertingus patarimus genetikos srityje. Nuoširdžiausiai noriu padėkoti savo darbo vadovei dr. doc. Ingai Stanevičienei už begalinę pagalbą viso baigiamojo darbo rengimo metu, vertingus patarimus, pamokymus ir žinoma pastabas. Visos žinios ir vertinga pagalba, gauta iš darbo vadovės, padės tolimesnės pakopos studijose.