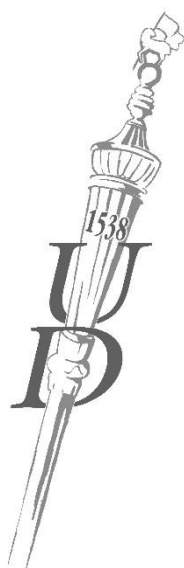


EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Nanopartikuláris szelénkészítmények farmakológiai vizsgálata – új lehetőségek a szelénpótlás területén

Ungvári Éva

Témavezető: Dr. Benkő Ilona



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	5
2. CÉLKITŰZÉSEK	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
4.1. Általános megfontolások	28
4.1.1. Kísérleti állatok.....	28
4.1.2. Vegyszerek.....	28
4.1.3. Nanopartikuláris elemi szelén előállítása	29
4.1.4. Vérvétel egerekből.....	29
4.1.5. Csontvelő kinyerése, sejtszuspenzió készítése.....	29
4.1.6. Kolóniastimuláló faktor források.....	30
4.1.6.1. WEHI-3B sejtvonal fenntartása	30
4.1.6.2. WEHI-3B kondicionált médium készítése	30
4.1.7. GM-CFU kolónia esszé	30
4.1.8. Csontvelőműködés vizsgálata.....	31
4.2. Szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére és csontvelői működésére kifejtett hatásainak vizsgálata	31
4.2.1. Bárányhús	31
4.2.2. Bárányhús szeléntartalmának mérése.....	32
4.2.3. Teljes antioxidáns kapacitás meghatározása.....	32
4.2.4. Kísérlet menete.....	32
4.3. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata.....	33
4.3.1. LactoMicroSel® előállítása	33
4.3.2. NanoSe és LactoMicroSel® Se-koncentrációjának mérése	34
4.3.3. További szelénkészítmények	34
4.3.4. Szeléntartalmú tápok készítése	35
4.3.4.1. Tápok Se-koncentrációjának megválasztása	35
4.3.5. A kísérletek menete.....	35
4.3.5.1. Toxikológiai vizsgálatok	36
4.3.5.1.1. Szöveti minták előkészítése	36
4.3.5.1.2. Metszetek festése.....	37
4.3.5.2. Hatástani vizsgálatok fízológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban	37
4.3.5.2.1. Fehérvérsejtek számának meghatározása	37
4.3.5.2.2. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások	37
4.3.5.2.3. Plazma Se-koncentrációjának meghatározása	38
4.3.5.2.4. Csontvelői funkcióra gyakorolt hatások	38
4.4. Statisztikai analízis	38
5. EREDMÉNYEK.....	39
5.1. Szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére és csontvelői működésére kifejtett hatásai fízológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban	39
5.1.1. In vivo Se-szupplementáció hatása a bárányhús Se-koncentrációjára	39

5.1.2. Normál és szelénnel dúsított bárányhús hatása a teljes antioxidáns kapacitásra	39
5.1.3. Fehérvérszám.....	40
5.1.4. Normál és szelénnel dúsított bárányhús hatása a csontvelői működésre fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban.....	42
5.1.4.1. Csontvelői cellularitás	42
5.1.4.2. GM-CFU kolóniák előfordulási gyakorisága	42
5.1.4.3. A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma	43
5.2. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata	45
5.2.1. Toxikológiai vizsgálatok.....	45
5.2.1.1. Túlélés	45
5.2.1.2. Megfigyelések	45
5.2.1.3. Testtömeg	46
5.2.1.4. Szervek tömege.....	47
5.2.1.5. Fehérvérszám	48
5.2.1.6. Máj hisztopatológia	49
5.2.1.7. Csontvelői működésre gyakorolt hatások.....	50
5.2.2. Hatástani vizsgálatok	51
5.2.2.1. Vér paraméterek.....	51
5.2.2.2. Plazma Se-koncentrációjának meghatározása	52
5.2.2.3. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban	53
5.2.2.4. Csontvelői működésre gyakorolt hatások fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban	54
5.2.2.4.1. Csontvelői cellularitás	54
5.2.2.4.2. GM-CFU kolóniák előfordulási gyakorisága	54
5.2.2.4.3. A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma	54
6. MEGBESZÉLÉS	56
6.1. Szelénnel dúsított bárányhús.....	57
6.2. Környezeti ártalmak okozta oxidatív stressz modellezése.....	58
6.3. Szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns rendszerére gyakorolt hatásai.....	58
6.4. Szelénnel dúsított bárányhús fehérvérsejtekre gyakorolt hatása	59
6.5. Szelénnel dúsított bárányhús csontvelői működésre gyakorolt hatásai	59
6.6. LactoMicroSel®.....	60
6.7. Vizsgált szelénkészítmények toxicitása.....	61
6.8. Hatástani vizsgálatok.....	63
7. KONKLÚZIÓ	64
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	65
9. ÖSSZEFOGLALÁS	66
10. SUMMARY (angol nyelvű összefoglalás)	67
11. IRODALOMJEGYZÉK	68
12. TÁRGYSZAVAK	79
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
14. FÜGGELÉK	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CLA	<i>conjugated linoleic acid</i> = konjugált linolsav
CYP1B	citokróm P450 1B
DMBA	7,12-dimetil-benzantracén
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> = Nemzetek Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete
FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i>
GI	gasztrointesztinális
GM-CFU	<i>granulocyta-macrophag colony-forming unit</i> = granulocyta-macrophag kolóniaképző egység
GPx	glutathion-peroxidáz
HDL	high-density lipoprotein = magas denzitású lipoprotein
HSC	hemopoietic stem cell = hemopoetikus őssejt
LDL	low-density lipoprotein = alacsony denzitású lipoprotein
LMS	LactoMicroSel®
NanoSe	nanopartikuláris szelén/nanoszelén
PAH	<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> = policiklusos aromás szénhidrogének
PHGPx	foszfolipid hidroperoxid glutathion peroxidáz
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> = többszörösen telítetlen zsírsav
RDA	<i>recommended dietary allowance</i> = napi ajánlott mennyiség
ROS	reactive oxygen species
Se	szelén
SeCys	szenenocisztein
SeMet	szenenometionin
SeNP	szelén nanopartikulumok
T ₃	trijód-tironin
T ₄	tiroxin
TPTZ	2,4,6-tripiridyl-s-triazine
TRxR	tioeredoxin reduktáz
UL	<i>tolerable upper intake level</i> = legmagasabb tolerálható mennyiség

1. BEVEZETÉS

A szervezetünkben zajló milliányi –mára már többnyire ismert- biokémiai folyamat összehangolt működése eredményezi egészséges állapotunkat, jó közérzetünket. Ezt az egyensúlyt azonban manapság egyre nehezebb fenntartani. A modernizáció fokozott környezeti stresszt jelent szervezetünknek. A közlekedési eszközök által kibocsátott gázok, vegyi anyagok, a gyárkémények és cigaretta füstje, növényvédőszer, káros sugárzások a kor embere számára újabb és újabb veszélyforrásokat jelentenek. Hatásukra túlsúlyba kerülhetnek az oxidatív folyamatok, szabadgyökök szaporodhatnak fel, melyeket a szervezet endogén védelmi rendszere már képtelen eliminálni. Ilyen esetben beszélünk oxidatív stresszről. A felszaporodott szabadgyökök károsítják a sejtek makromolekuláit, DNS-lánc-töréseket, membránsérüléseket, és fehérjefunkciók kiesését eredményezhetik. Az oxidatív stressz alattomos kór állapot, mely észrevétlenül alakul ki, ugyanakkor a legsúlyosabb, -mortalitási listák élén álló betegségek okozója lehet. Mára már bizonyított, hogy kardiovaszkuláris megbetegedések (*Sugamura és Keaney 2011.*), daganatos elváltozások (*Borek és mtsai 1993*), diabetes mellitus, Parkinson-kór (*Kumar és mtsai 2012*), valamint osteoporosis (*Basu és mtsai 2001*) kialakulásának hátterében állhat. Emellett szerepet játszik az elhízás és öregedés folyamatában is.

Szabadgyökök keletkezéséhez felgyorsult életvitelünk, helytelen táplálkozási szokásaink is nagymértékben hozzájárulnak. Az életmód, étrend rendezése a megelőzés legsikeresebb eszköze lehet. A táplálékkal bevitt antioxidáns molekulák támogatják belső védelmi rendszerünket, eliminálják a szabadgyököket, fenntartva ezzel az oxidánsok-antioxidánsok fiziológiai egyensúlyát.

A szelén (Se) egy esszenciális mikroelem, mely az egyik legjelentősebb antioxidáns tulajdonságú enzim, a glutathion-peroxidáz aktív centrumát képezi. Korábban toxikus és rákkeltő anyagnak tartották, csak néhány évtizede ismerték fel, hogy a szervezet számára nélkülözhetetlen elemről van szó. Az alacsony Se bevitel számos betegség rizikófaktor lehet. Bár nehéz kvantifikálni, egy 2000-ben készült globális felmérés szerint az alacsony Se bevitel 0,5-1 milliárd főt érinthet világszerte. Ugyanezen vizsgálat kimutatta, hogy a magyar lakosság átlagos szérumban Se koncentrációja az optimális érték alatt van (*Combs 2001*).

Ezek alapján belátható, hogy a lakosság megfelelő szelénellátásáról gondoskodni kell. A szelén terápiás alkalmazása során tekintettel kell lennünk arra, hogy az optimális dózistartománya igen szűknek mondható, azaz a hatásos és toxikus dózis közel esik egymáshoz. Emiatt dozírozása nagy odafigyelést igényel. Fokozottan igaz ez az étrend-kiegészítőként

alkalmazott szelénkészítményekre, amelyek megközelítőleg sem olyan szigorú vizsgálatokon esnek át, mint a terápiás szerek. A Se kizárólag táplálék útján történő bevitelére hagyatkozni pedig hiba lenne, ugyanis a talajok Se ellátottságától függően a növényi és állati termékek Se koncentrációja igen széles tartományban mozoghat. A szelénpótlás hatékonyságát nagyban segítené, ha sikerülne olyan funkcionális élelmiszer és/vagy szelénkészítményt előállítani, melynek Se-koncentrációja ismert, valamint -a biztonságosabb alkalmazás érdekében- optimális dózistartománya szélesebb a jelenleg elérhető készítményeknél.

Az utóbbi években a szelénkutatások középpontjába a nanoméretű elemi Se részecskék kerültek. Számos tanulmány arról számol be, hogy hatásosabbak a szabadgyökök eliminálásában, mint a szerves és szervetlen szelénvegyületek (*Sadeghian és mtsai 2012, Wang és mtsai 2007*). Emellett élénken kutatják terápiás alkalmazási lehetőségeit az onkológiában. Toxicitásukról eltérő eredmények láttak napvilágot, mely mindenképpen tisztázásra szorul.

A nanopartikuláris elemi Se előállításának, felhasználásának és alkalmazásának módjai mai napig kiaknázatlan területet jelentenek a kutatók számára. Legfőbb cél egy funkcionális élelmiszer és/vagy egy hatásos, ugyanakkor kevésbé toxikus szelénkészítmény előállítása, mely az optimális dózistartomány kiszélesedésével egy biztonságosabb alkalmazást tenne lehetővé.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során fő célom volt, hogy legalább olyan hatásos, ugyanakkor kevésbé toxikus terméket állítsak elő nanopartikuláris elemi Se felhasználásával, mint a jelenleg forgalomban lévő szelénkészítmények. A terméknek kényelmetlenségektől mentesen, per os adagolhatónak kell lennie, és illeszkednie kell a normál étrendhez.

I. Funkcionális élelmiszer előállítás

Először állat húsának in vivo nanoszelén szupplementációjára került sor. Választásom a hazánkban méltánytalanul népszerűtlen bányahúsról esett, mely magas ásványi anyagtartalommal rendelkezik, és kiváló forrása a szelénnek. A bányahús Se-koncentrációjának további emelésével olyan funkcionális élelmiszerhez jutnánk, mely hatásos módja lenne a Se-bevitelnek, ugyanakkor táplálék jellegéből adódóan nem lehetne túlادagolni. Kísérleteim során az alábbi kérdésekre kerestem a válaszokat:

1. Növelhető-e a bányahús Se-koncentrációja per os bevitt nanoszelénnel?
2. Változik-e a hús Se-koncentrációja hőkezelés hatására?
3. Van-e hatása a bányahúsnak illetve a Se-dús bányahúsnak az egerek antioxidáns védelmi rendszerére fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban?
4. Oxidatív stressz állapotában a felgyülemlett szabadgyökök károsítják a sejtek makromolekuláit. Ennek funkciókiesés vagy akár sejthalál is lehet a következménye. Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy a fehérvérsejtek érzékenyen reagálnak a xenobiotikumok károsító hatásaira, ezért fontosnak ítélem megvizsgálni, hogy az oxidatív stressz (DMBA-kezelés) okoz-e sejtpusztulást a fehérvérsejtek körében. Amennyiben igen, melyik sejttypusban?
5. Jól ismert, hogy a citosztatikumok negatív hatással vannak a csontvelői vérképzésre. A legsérülékenyebb sejtpopulációt a GM-CFU progenitorok képezik, melyek a granulocyták és macrophagok utánpótlását biztosítják. Ezen progenitorok pusztulása a granulopoézis zavarához, neutropéniás állapot kialakulásához vezethet. A súlyos következményekre való tekintettel vizsgálni kívántam a DMBA-kezelés csontvelői működésre, azon belül a granulopoézisre kifejtett hatásait.
6. Képes-e a bányahús és a Se-dús bányahús mérsékelni a DMBA-kezelés okozta csontvelőtoxicitást?

II. Étrend-kiegészítő előállítása

A vizsgálatok további részében új technológiai eljárással készített, LactoMicroSel® (továbbiakban LMS) néven bejegyzett készítményt kívántam összehasonlítani a korábbi technológiával előállított nanoszelénnel és szelénpótlásra már régóta használt, szerves és szervetlen szelénkészítményekkel.

7. Milyen toxikológiai paraméterekkel rendelkezik a két nanopartikuláris szelénkészítmény? Extrémen magas dózisban adódnak-e különbségek az egyes szelénformák között túlélés, fehérvérsejtszám, ill. csontvelői működés tekintetében?
8. Adódnak-e hisztopatológiai elváltozások a máj szövetében toxikus mennyiségű Se fogyasztása esetén?
9. Van-e különbség a Se tartalmú antioxidáns enzim, a glutation-peroxidáz aktivitásában fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban?
10. Képesek-e mérsékelni az egyes szelénkészítmények a DMBA-okozta csontvelőtoxicitást?
11. Hasonló-e a hatása vagy esetleg hatásosabbnak bizonyul-e a korábbi technológiával előállított NanoSe és a LMS a szabadgyökök redukálásában a már forgalomban lévő készítményekhez képest?

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mai modern világunkban a szervezetünket érintő legfenyegetőbb veszély az oxidatív stressz. A felgyülemelő szabadgyökök károsíthatják sejtjeink makromolekuláit, gyengíthetik immunrendszerünket. Emellett számos –mortalitási lista élén álló– megbetegedés hátterében állhat, úgymint kardiovaszkuláris, malignus megbetegedések, neurodegeneratív elváltozások (Alzheimer-kór, Parkinson-kór), rheumatoid arthritis. Ezen kívül az elhízás és öregedés folyamatában is jelentős szerepet tulajdonítanak nekik (*Roberts és mtsai 2009.*)

Szabadgyökök

A szabadgyökök olyan molekulák, vagy molekulafragmentek, melyek párosítatlan elektront hordoznak külső elektronhéjukon. Ez meglehetősen instabil állapot, emiatt fokozott reakciókészség jellemzi őket. A stabil állapot eléréséhez sejtjeink molekuláival is képesek reakcióba lépni, módosítva azok fiziológiás funkcióját. Szerkezeti felépítés alapján megkülönböztetünk oxigén-, nitrogén-, szén- és ritkábban kén központú szabadgyököket. A központi atom szerint nevezzük őket reaktív oxigén/nitrogén/szén/kén specieseknek. Rövidítésük: ROS/RNS/RCS/RSS.

A súlyos következményekre való tekintettel káros hatásaik kiemelt figyelmet kapnak, ugyanakkor a reaktív oxigén speciesek a szervezetben számos területen töltenek be fiziológiás funkciókat. Az egyik legfontosabb feladatuk a kórokozókkal szembeni védelem. Ha a szervezet baktériumot észlel, a macrophagokban található NADPH-oxidáz aktivitása fokozódik, és nagy mennyiségű szabadgyök termelődik, ami a baktérium elpusztításában vesz részt. Egyéb sejtekben megfigyelték, hogy részt vesznek az intracelluláris szignalizációban, továbbá fokozzák a fehérvérsejtek adhézióját az érfalhoz, elősegítve ezzel a sebgyógyulást (*Valko és mtsai 2007*). *Buonocore és mtsai (2010)* vizsgálatai igazolták, hogy szükségesek a normál fertilitáshoz, spermák éréséhez, és az embrió megfelelő fejlődéséhez is.

Szabadgyökök endogén módon és exogén hatásokra egyaránt keletkezhetnek szervezetünkben (*Kryston és mtsai 2011*). Fő endogén forrást jelent a mitokondriális elektrontranszportlánc, NADPH-oxidáz és xantin-oxidáz enzim tevékenysége és egyéb nem-enzimatis reakciók, pl.: a vas redox-státusz kialakításához szorosan kapcsolódó Fenton-reakció (*Perron és mtsai 2009*). A környezetből érkező (exogén) stimulusok széles tárháza megjelenik a nagyvárosi levegőben: a cigarettafüst (*Valavanidis és mtsai 2009*), UV-sugárzás (*Ikehata and Ono 2011*), elektromágneses sugárzások (röntgen-, gamma-sugárzás) és egyéb környezeti szennyező anyagok (*Rossner és mtsai 2011*) szabadgyök-képződést indukálnak csak úgy, mint az egyes gyógyszerek, xenobiotikumok, peszticidek. A környezeti szennyezőanyagok

leggyakoribb összetevői a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH), melyek jelen vannak a járművek kipufogógázaiban, gyárak és a háztartások által kibocsájtott füstben, valamint füstölt és grillezett ételekben (*Lijinsky és mtsai 1991., Kitts és mtsai 2012*) Egyes képviselőik bizonyítottan mutagén, karcinogén, vagy teratogén hatással rendelkeznek. Habár a nagyvárosi levegő ártalmait kevésbé áll módunkban kivédeni, az ételek megfelelő elkészítésével csökkenthetjük a szervezetünkbe jutó PAH-vegyületek mennyiségét (*Perelló és mtsai 2009*).

A legegyszerűbb PAH vegyületek a 3 aromás gyűrűt tartalmazó antracén és fenantrén. A 7,12-dimetil-benzantracént (DMBA) sikeresen alkalmazzák környezeti szennyezés okozta oxidatív stressz modellezésére állatkísérletekben. Dózisfüggő karcinogén valamint immunszuppresszor hatással bír a lépben, tímuszban és a csontvelőben. Mind a humorális mind a celluláris immunválasz csökken (*Miyata és mtsai 2001*). Intraperitoneálisan adott DMBA hatására 48 h múlva a cellularitás csökkenése mutatkozik a csontvelőben a lymphoid és myeloid sejtvonalon egyaránt (*N'jai és mtsai 2010*). A fokozottan érzékeny progenitor sejtek károsodásával a hemopoézis zavart szenved, a fehérvérsejtek utánpótlása megszűnik.

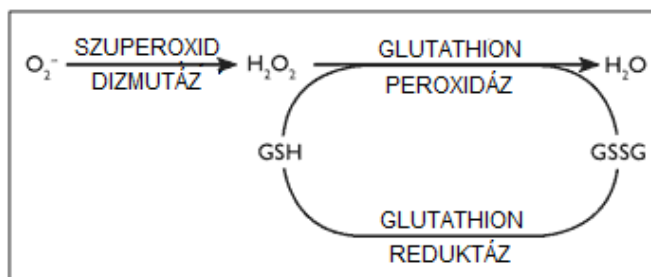
A PAH-ok károsító hatásait kétféle módon fejtik ki: egyrészt metabolizmusuk során ártalmas melléktermékek keletkeznek, másrészt szabadgyökök képződését indukálják. Citokróm P450 (CYP) hatására transz-dihidrodionál metabolizálódnak, majd diol-epoxiddá hidrolizálódva a DNS lánchoz kötődnek és mutációkat okoznak. Emellett o-kinon metabolitok keletkeznek, melyek belépnek a redox ciklusba, és nagy mennyiségű ROS-t generálnak (*Hanzalova és mtsai 2010, Penning és mtsai 1996*). A ROS annak érdekében, hogy párosítatlan elektronjuknak párt találjanak, reakcióba lépnek a szervezet bármely molekulájával és oxidánsként viselkednek. Nem kivételek ezalól a sejtek makromolekulái sem. A DNS-hez kötődve mutációkat eredményezhetnek, a fehérjéket funkcióképtelenné tehetik, a membránlipidekhez való kötődésük pedig a sejtmembrán folytonosságát szakíthatja meg. Ha ezek a károsodások elég súlyosak, a sejt nekrózisához vezetnek. Ennek kivédése érdekében a szervezet antioxidáns molekulái lépnek fel, melyek elektront adnak át a szabadgyököknek, megszüntetve ezzel instabil állapotukat. A szabadgyökök (oxidánsok) képződésének és eliminálásának egyensúlyát a szervezet endogén antioxidánsai, illetve a táplálékkal bevitt antioxidáns molekulák biztosítják. Ha az egyensúly felborul, a szabadgyökök felhalmozódnak, oxidatív stressz állapotáról beszélünk.

Védekezés az oxidatív stressz ellen: antioxidánsok

Az antioxidánsok olyan molekulák, melyek elektront adnak át a szabadgyököknek, vagy bármi módon részt vesznek az elektrondonáció folyamatában, megszüntetve ezzel a szabadgyökök instabil állapotát.

Szervezetünk számos endogén, antioxidáns funkciót betöltő molekulával rendelkezik, ezek közül a legismertebbek:

1. Intra- és extracelluláris enzimek:



1. ábra: *antioxidáns enzimek és az általuk katalizált reakciók*

- szuperoxid-dizmutáz: a reaktív szuperoxid gyököt ($O_2^{\bullet -}$) O_2 -né és H_2O_2 -dá alakítja
 - glutathion-peroxidáz: H_2O_2 gyököt alakítja vízzé. A reakcióban a glutathion az elektrondonor.
 - glutathion-reduktáz: redukálja a glutathiont a szabadgyökkel való reakció után
 - glutathion-S-transzferáz: katalizálja a redukált glutathion és a szabadgyök konjugációját.
 - kataláz: $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$
 - citokróm-oxidáz: az elektrontranszportlánc végén található enzim, mely a citokróm c molekuláktól kapott elektront molekuláris O_2 -nek továbbítja, amelyből 2 mol H_2O keletkezik
2. *Aminosavak:* kisebb antioxidáns kapacitásuk ellenére jelentős antioxidáns erőt képviselnek, mivel intracelluláris koncentrációjuk nagy.
- arginin
 - cisztein
 - metionin
 - glicin
3. *Mikroelemek:*
- szelén: glutathion-peroxidáz aktív centruma
 - cink, mangán: szuperoxid-dizmutáz aktív centruma
 - króm

4. *Kelátképzők*: albumin, cörułoplazmin, transzferrin
5. *Nem enzimátikus fehérjék*: húgysav, bilirubin, glutathion
6. *Vitaminok*: A, C, E-vitamin
7. *Egyebek*: likopin, lutein, koenzim-Q...stb.

Funkcionális élelmiszerek

Az élelmiszerek elsődleges feladata a tápanyagigények kielégítése, a kellő mennyiségű nutriensek bevitele. Azonban vannak olyan élelmiszerek és élelmiszer összetevők, melyek túlmutatnak ezen a funkción. Nemcsak a hiánybetegségek megelőzésére alkalmasak, hanem biológiailag aktív komponenseiknek köszönhetően jótékony élettani és pszichológiai hatásokkal is rendelkeznek. Míg korábban a hiánybetegségek elkerülése volt a cél, ma már a táplálkozástudomány olyan táplálékok felkutatásával illetve előállításával foglalkozik, amelyek egy megemelkedett egészségi állapot elérését, a civilizációs betegségek elkerülését és ezáltal az aktív munkával eltöltött életszakasz megnyújtását teszik lehetővé (*Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document*).

Európában a European Commission Concerted Action on Functional Food Science (FUFOSE-Group) 1999-ben a következő definíciót ajánlotta: „Az élelmiszer akkor tekinthető funkcionálisnak, ha a megfelelő táplálkozásélettani hatásokon túlmenően, a szervezetben egy vagy több cél-funkcióra kimutatható pozitív hatása van úgy, hogy jobb egészségi állapot vagy kedvezőbb közérzet és/vagy a betegségek kockázatának csökkenése érhető el. Funkcionális élelmiszer kizárólag élelmiszer formájában kínálható, nem mint tablettá vagy kapszula. A szokásos táplálkozási magatartás integrális részét képezze, és hatását már a szokásos fogyasztási mennyiségnél fejtsse ki” (*Diplock és mtsai 1999, Katan és mtsai 1999*).

Funkcionális élelmiszerek előállítása

Legelterjedtebb módszer az élelmiszer egy jó tulajdonságának kihangsúlyozása, azaz egy pozitív hatású összetevő szintjének megemlése vagy új bioaktív anyag bejuttatása az élelmiszerbe. Pl.: probiotikumokkal, prebiotikumokkal dúsított tejtermékek; megemelt ásványi anyag- és vitamintartalommal bíró zöldségek, húsok; antioxidánsokban (E-vitamin, karotinoidok, szelén) gazdag tojások.

A funkcionális élelmiszerek előállításának másik hatékony módja a nemkívánatos összetevő (cukor, só, nitrit, zsír, koleszterin, laktóz) mennyiségének csökkentése (*Hoffmann és mtsai 2010*).

Növények, mint funkcionális élelmiszerek

Elsők között igazolták a zöldségek, gyümölcsök, gabonafélék egészségre gyakorolt pozitív hatását. A bennük található ételmi rostok felszívódás nélkül haladnak át a bélcsatornán, fokozzák a bél motilitását, ezáltal elősegítik az emésztést. Az antioxidánsok, úgymint tokoferolok, aszkorbinsav, karotinoidok (β -karotin, likopin), flavonoidok önmagukban is részt vesznek a szabadgyökök eliminálásban, valamint támogatják a szervezet belső antioxidáns rendszerét.

Húsok, mint funkcionális élelmiszerek

Habár a húsok negatív tulajdonságaik (magas koleszterin, telített zsírsav, és sótartalom) miatt összefüggésbe hozhatók az obezitással, kardiovaszkuláris és koronária megbetegedésekkel, magas vérnyomással és a rák egyes típusaival, ugyanakkor nélkülözhetetlen komponensét képezik a változatos étrendnek. A húsok legfőbb fehérjeforrásaink, részt vesznek a szövetek felépítésében és regenerációjában. Az emésztés során keletkező aminosavak szükségesek az idegrendszer és immunrendszer egészséges működéséhez. Emellett olyan mikronutrienseket tartalmaznak, melyek a növényekben nem találhatók meg, vagy biológiai hasznosíthatóságuk igen csekély. A húsok legfőbb forrásai az antioxidáns védekezésben szerepet játszó glutathionnak (Higgs és mtsai 2000). A kérődzők húsa -magas linolsavtartalmuknak köszönhetően- antikarcinogénnek és antiatherogénnek bizonyult (Hoffmann és mtsai 2010).

Bárányhús

A bárányhús főként a mediterrán étrendek alkotórésze, Magyarországon méltánytalanul népszerűtlen. Ennek egyrészt anyagi okai vannak, másrészt pedig a megszokások dominálnak, hisz nem ezen szocializálódtak a fogyasztói társadalom tagjai. Az már beépült a köztudatba, hogy az egészséges táplálkozás elengedhetetlen része a húsfogyasztás, ám a lakosság nagy hányada -anyagi megfontolások miatt- inkább a „gyakrabban silányabb minőséget” elv mellett dönt. A jó minőségű húsnak számító bárány hazai fogyasztása a közelmúltig többnyire csak a húsvéti időszakra korlátozódott, azonban mostanra már az év többi szakaszában is megnövekedett a kereslet iránta, ennek ellenére sajnos még mindig rétegeterméknek számít.

Báránynak tekintjük a maximum 14 hónapos, fogváltás előtt álló állatot. Gasztronómiai vonatkozásban a bárány fogalma alatt a 6-11 kg tömegű bontott testeket értjük. Azontúl, hogy

ezen fiatal állatok húsa puha, ízletes és kevésbé faggyús, számos biológiailag aktív összetevővel rendelkezik.

Vas: a bányahús - a marha-és sertéshússal együtt - a vörös húsok közé tartozik. A vörös szín oka a megemelkedett mioglobin-tartalom. Ebből kifolyólag kiváló forrása a vasnak. Táplálék útján részint a bányai szövetekből származó hem-vashoz juthatunk, részint pedig az állat által elfogyasztott növényekből származó (nem-hem) vashoz. Az állati eredetű hem-vas abszorpciója lényegesen jobb.

Cink: számos enzim aktív komponensét képezi, ezáltal nélkülözhetetlen a normál növekedés, fejlődés, az immunfunkciók és sebgyógyulás folyamatában. Felszívódását számos tényező befolyásolhatja. Az állati fehérjében gazdag diéta segíti az abszorpciót, így -azontúl, hogy a bányahús kiváló cinkforrásként szolgál- a cink jobb biológiai hasznosulását is segíti.

Emellett nagy mennyiségben tartalmaz **B₂**, **B₆**, **B₁₂** vitamint valamint az antioxidáns védekezés szempontjából kiemelkedő jelentőségű **szelént**. A bányahús alapvetően magas Se tartalmát tovább emelheti az állat Se-dús talajú legelőn való tartása, vagy a takarmány Se-szupplementációja.

A bányahús hazai népszerűsítését célul tűzte ki Dr. Jávori András és Dr. Monori István munkacsoportja. Elsősorban az ismeretek terjesztésével, a hús jó tulajdonságainak és lehetséges elkészítési módjának bemutatásával igyekeznek közelebb hozni a lakossághoz. Emellett a bányahús minőségének javításával is foglalkoztak, melynek egyik eszköze a hús *in vivo* szupplementálása nanopartikuláris elemi Se-nel. Törekvéseik összhangban állnak a célkitűzéseikkel, miszerint per os fogyasztható, az eddigi étrend-kiegészítőknél biztonságosabb formáját találjam meg a szelénpótlásnak.

A szelén, mint esszenciális mikroelem

A szelén felfedezése

A szelén egy nem fémes félvezető elem, melyet 1817-ben a svéd kémikus, Jöns Jakob Berzelius fedezett fel. Munkatársa, Martin Klaproth a kén égése során visszamaradó vörös anyagra lett figyelmes, melyet ő elemi tellúrnak vélt. Azonban Berzelius további beható analízise után kiderült, hogy egy addig ismeretlen elemről van szó. Mivel megjelenésében, viselkedésében nagyon hasonló volt a tellúrhoz- melyet latinul a Föld istennőjéről neveztek el- Berzelius úgy döntött, a Föld társáról –a Holdról nevezi el az új elemet, így kapta a görög Hold

istennője, Selene után a nevét. Más források szerint az elnevezésben az is szerepet játszott, hogy a Hold éppoly Janus-arcú, mint a szelén.

Kémiai tulajdonságai

A Se a periódusos rendszerben az oxigénnel, kénnel, tellúrral, polóniummal együtt a kalkogének csoportjában (VI B), 34-es rendszámmal foglal helyet. Több allotróp módosulata létezik. Leggyakoribb formája a kristályos szerkezetű vörös és szürke Se, ezen kívül létezik amorf vörös és üvegszerű fekete Se is. A kristályos vörös Se a kénhez hasonlóan viselkedik. Előállítását Se-vegyületek termikus bontásával vagy fekete Se szén-diszulfidban való forralásával történik. Normál körülmények között ez a forma nem stabil, hamar átalakul a fémes megjelenésű szürke szeléné, mely fémes tulajdonságokkal bír (stabil, egydimenziós láncú szerkezet, félvezető képesség), ettől függetlenül azonban nem fémes anyagként tartják számon. Ami a kémiai reaktivitását illeti, a legtöbb elemmel képes kötést kialakítani, ennek ellenére kevésbé reaktív, mint az oxigén vagy a kén. A leggyakoribb és egyben legstabilabb formák a szelenidek, melyek az erősen pozitív töltésű IA és IIA csoportok elemeivel, a lantanoidákkal vagy az erős elektronegativitású elemek (O, F, Cl) kötődésével képződnek. Kevésbé stabilak a hidridek, a Se-sók és az oxidok (*Greenwood és Earnshaw 1994*).

Szelénforrások

Ételek: a táplálék eredetű fő Se forrásaink többnyire a magas fehérjetartalomhoz kötődnek. Nagy mennyiségben tartalmaznak Se-t a tenger gyümölcsei, tengeri halak, állati belsőségek (máj, vese), tejtermékek, húseleink közül pedig a bárány és a marha. Legnagyobb koncentrációt a hazánkban kevésbé ismert brazil dióban mértek (68-91 µg/dió!).

Pontos értékeket lehetetlen megadni, ugyanis ezen élelmiszerek Se tartalma rendkívül széles tartományban mozog. Az adott földrajzi terület talajának Se tartalma határozza meg a talajból a növényekbe, majd a növényevő állatokba kerülő Se mennyiségét. Ezek alapján belátható, hogy ugyanazon fajtájú növény Se koncentrációja más értékeket mutat egy jó és egy alacsony Se-ellátottságú talajban. A fogyasztásra szánt állatok húsnak Se koncentrációja kevésbé áll szoros összefüggésben a talaj Se-tartalmával, melynek oka a házasítás és a tudatos takarmányozás.

Táplálék-kiegészítők: számos multivitamin készítményben találkozhatunk Se-nel, de emellett egyre több csak Se főkomponensű étrend-kiegészítő is kapható a gyógyszertárakban,

szaküzletekben. Ezek általában szerves szelenometionin formájában vagy szervesetlen Na-szelenit (Na_2SeO_3), Na-szelenát (Na_2SeO_4) vegyületként tartalmazzák a Se-t. Újabb irányvonalat képvisel az az eljárás, amikor az étrend-kiegészítőbe magas Se-koncentrációjú táptalajban növesztett élesztőgombát tesznek.

Talajok szelénellátottsága nemzetközi viszonylatban

Jó Se-ellátottságú területnek tekinthető Ausztrália, USA egyes részei és Írország, míg meglehetősen alacsony a talaj Se tartalma Kína egyes tartományainban *Li és mtsai (2012)*, az USA bizonyos területeinek és Új-Zélandnak (*Sheck és mtsai 2010*). Némileg jobb, de ugyancsak alacsony szelén-ellátottságú talajjal rendelkezik Európa legtöbb országa, pl. Egyesült Királyság, Franciaország, Németország, Svédország, Finnország, Horvátország, Szlovákia (*Klapec és mtsai 1998*) Sajnos Magyarország is ez utóbbi kategóriába sorolható (*Molnár és mtsai 2013.*, *Cser és mtsai 1996*).

A probléma felismerése után Finnországban történtek törekvések a talaj dúsítására Se tartalmú trágya használatával. A lakosság szérum Se szintjének mérése alapján úgy tűnik a törekvések sikeresnek bizonyultak. Új-Zélandon -a műtrágyázás mellett- a magas Se tartalmú import gabona behozatalával igyekezett a kormány a lakosság megfelelő Se beviteléről gondoskodni.

Kínában már az 1970-es évek óta zajlik a kormány-által támogatott szelén-szupplementációs program. Skóciában pedig a haszonállatok Na-szelenittal történő célzott szelénpótlását valósították meg.

Magyarország szelén-ellátottsága

A hazai földtani kutatások eredményei azt mutatják, hogy Magyarország talajainak Se koncentrációja igen tág határokon belül változik. Egyaránt rendelkezik Se hiányos (0,1 mg/kg alatt) és szelénrel megfelelően ellátott területekkel (1-1,5 mg/kg). A Bükk egyes részeiről extrém magas Se tartalmú, 4-5 mg/kg koncentrációjú talajmintákat is gyűjtöttek. A lúgos talajokban a Se vízben oldott, növények számára felvehető formában tartalmaz szelenátot, míg a Se hiányos területek a savanyú talajokhoz köthetők (*Molnár és mtsai 2013*). Az 1970-es években a Nemzetek Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) kezdeményezésére, 30 ország részvételével egységes talaj- és növény-mintavételre került sor. Az elemzés során kiderült, hogy Magyarország termőtalajai a nemzetközi átlaggal megegyező felvehető Se-t tartalmazznak, ez a mennyiség azonban cseppet sem jelent élettani optimumértéket is egyben.

1992-ben 300 különböző hazai területről származó minták mérése során általános megállapítást nyert, hogy a magyarországi talajok döntő többsége Se hiányos (*Gondi és mtsai 1992.*). Ilyen nagy mintaszámú, reprezentatív vizsgálat azóta nem készült.

Szelénpótlásra vonatkozó törekvések a korábbi években elenyészőek voltak. 1994-ben szelénrel dúsított élesztővel sült kenyérről számoltak be (*Rumi és mtsai 1994*), de igazából sem ez, sem a külföldön használt szelénpótló módszerek nem honosodtak meg. Az utóbbi években a szelénről szerzett egyre pontosabb ismeretek miatt a szelénpótlás kérdése felértékelődött.

Szelenoproteinek

A szervezetben található Se főképp fehérjékbe épülve, szelenoproteinek formájában van jelen. A szelenoproteinek olyan fehérjék, melyek cisztein vagy metionin aminosava a kén helyett Se-t tartalmaznak. Ezidáig 30 új szelenoproteint azonosítottak, ebből legalább 15 jól karakterizálható biológiai funkcióval bír.

Szelenoprotein	Rövidítés	Funkció
Glutathion-peroxidáz 1	GPx-1	celluláris/klasszikus GPx
Glutathion-peroxidáz 2	GPx-2	gasztrointesztinális GPx
Glutathion-peroxidáz 3	GPx-3	plazma GPx
Glutathion-peroxidáz 4	GPx-4, PHGPx	foszfolipid hidroperoxid GPx
Glutathion-peroxidáz 6	GPx-6	olfaktorikus GPx
Jodotironin-dejodináz 1	DI1, D1, DIO1	tiroid hormon aktiválás (dejodináció)
Jodotironin-dejodináz 2	DI2, D2, DIO2	szövetspecifikus tiroid hormon aktiválás (dejodináció)
Jodotironin-dejodináz 3	DI3, D3, DIO3	szövetspecifikus tiroid hormon deaktiváció (dejodináció)
Szelenoprotein N	SePN	normál izomfejlődés, izomsejtek védelme + tisztázatlan funkciók
Szelenoprotein P	SePP	plazmaprotein, Se-transzport
Szelenoprotein W	SePW	normál izomfejlődés, izomsejtek védelme + tisztázatlan funkciók
Tioredoxin-reduktáz 1	TR1, TRxR1	citoszólikus tioredoxin redukciója
Tioredoxin-reduktáz 2	TR2, TRxR2	mitokondriális tioredoxin redukciója
Tioredoxin-reduktáz-3	TR3, TRxR3	herespecifikus tioredoxin reduktáz

1. táblázat: Legismertebb szelenoproteinek összefoglaló táblázata

Glutathion-peroxidázok

A szelenoproteinek kapcsán az elsőként említendő csoport a glutathion-peroxidázok enzimsaládja, melyek az antioxidáns védekezés szempontjából kiemelt figyelmet érdemelnek. H_2O_2 és más szerves hidroperoxidok vízzé és alkohollá történő redukcióját katalizálják, megakadályozva ezzel a szabadgyökök nekrotikus hatását.

Mai ismereteink szerint az enzimsaládnak 8 tagja létezik, melyek struktúrájukban, lokalizációjukban és szubsztrát-preferenciájukban térnek el egymástól. A GPx 1-4 és humán GPx-6 szelenoprotein (embertől eltérő fajokban a GPx-6 nem szelenoprotein), a GPx 5-7-8 katalitikus centrumában nem található Se.

GPx-1 vagy celluláris/klasszikus GPx

A GPx-1 az enzimsalád leggyakrabban előforduló tagja. Struktúráját tekintve homotetramer. A sejtek mitokondriumában, citoszólban, és egyes sejtek peroxisómájában is előfordul. 1957-ben vörösvérsejtben mutatták ki, de azóta bebizonyosodott, hogy a szervezet összes sejtjében megtalálható. A GPx enzimsaládban, Se ellátottság szempontjából felállított hierarchia szerint a rangsor legalján helyezkedik el, amely azt jelenti, hogy Se deficiencia esetén ezen enzim aktivitása csökken először. Szelén pótlásával az enzimműködés újra maximalizálható. A szervezetben egyfajta Se-poolként funkcionál, szükség esetén biztosítja a Se-t a hierarchia csúcsán elhelyezkedő enzimeknek. Ezen tulajdonsága diagnosztikus jelentőséggel bír, hisz alkalmassá teszi az aktuális Se- és antioxidáns státusz feltérképezésére (Holben és mtsai 1999, Lubos és mtsai 2011, Brigelius Flohé és Maiorino 2013)

GPx-2 vagy gasztrointesztinális GPx

A gyomor-bél traktus epitéliumában expresszálódik, innen ered az elnevezése is (GPx-GI). Magas koncentrációban van jelen a vastagbél kriptáinak bazális részén (a koncentráció csökken a kripták csúcsi apikális része felé haladva) és a bélbolyhokban. Egyes kutatók úgy vélik, a GPx-2 barrierként funkcionál az intesztinális epitéliumban, megvédi a sejteket a táplálékkal bejutott lipid hidroperoxidoktól Wingler és mtsai (2000). Brigelius-Flohé és Maiorino (2013) szerint aligha lehet ez a GPx-2 fő feladata, hisz az abszorpció nem a kripták bazális részére lokalizálódik, hanem az apikális részek felé, ahol viszont a GPx-2 koncentráció igen alacsony. A GPx-2 előfordulási helye az proliferálódó intesztinális progenitorsejtek lokalizációjával esik egybe. Florian és munkacsoportja (2010.) azt tapasztalta, hogy GPx-2 knockout egerekben –

különösen alacsony Se koncentrációjú diétán tartott állatokban - a vastagbél kriptáinak bazális területein megnövekedett az apoptotikus sejtek száma, valamint a GPx-1 overexpressziója volt megfigyelhető. Az apoptotikus sejtek tekintetében ez a kompenzáció csak részben volt célravezető, így feltételezhető, hogy a GPx-2 szerepet játszik az intesztinális progenitor sejtek növekedésében, differenciálódásában és túlélésében.

GPx-3 vagy plazma GPx

A GPx-1-hez hasonló, homotetramer felépítésű glutathion-peroxidáz. Elsősorban a vese proximális tubulusainak sejtjeiben termelődik, de szintézisét detektálták már májban, szívben, tüdőben, belekben, agyban, vázizomban, placentában és a mell szöveteiben is. A vese prioritását és a Se homeosztázisban betöltött kiemelkedő szerepét bizonyítja, hogy krónikus veseelégtelenségben szenvedő páciensekben a GPx-3 termelődése a betegség súlyosságával arányosan csökken, vesetranszplantációt követően pedig visszatér a normál szintre (Zachara és mtsai 2006.) A termelődés helyéről a plazmába, vagy más egyéb extracelluláris folyadékba szekretálódik (tej, amnionfolyadék, csarnokvíz). A GPx-3 és a szelenoprotein P együttesen a plazmában található Se 97%-át teszi ki. A GPx-1-hez hasonlóan szintén fontos diagnosztikus marker, a nem megfelelő Se bevitel a plazma GPx-3 szintjének csökkenésében rövid időn belül megmutatkozik. Se bevitellel az enzim aktivitása újra maximalizálható.

GPx-4 vagy foszfolipid hidroperoxid GPx (PHGPx)

A GPx-1,2,3-tól mind struktúrájában, mint pedig szubsztrát-specifitásban eltérő enzim. A GPx-4 egy monomer, melynek szubsztrátját nemcsak a H₂O₂, hanem foszfolipid, koleszterol, koleszterolészter hidroperoxidok is képezik. Az egyetlen GPx, mely a sejtmembránba épült lipid hidroperoxidokat is képes redukálni, ezáltal fontos szerepet játszik a lipidperoxidációval összefüggésbe hozható kórképek (pl. atherosclerosis) kialakulásának megelőzésében.

3 izoforma létezik, melyet egyazon gén kódol. A citoszólban található izoforma (cPHGPx) ubikviter, a mitokondriális és magi izoforma (mPHGPx és snPHGPx) főképp a herékben termelődik és a fertilitásért felelős (Shi és mtsai 2010).

GPx-6

Homotetramer felépítésű GPx, mely csak emberben szelenoprotein. Rágcsálókban, illetve más fajokban a cisztein nem tartalmaz Se-t. Expresszióját a szaglóhámában figyelték meg, viszont funkciójáról, szubsztrát-specifitásáról ezidáig keveset tudni (*Brigelius-Flohé és mtsai 2013*).

Thioredoxin reduktázok

A szelenoenzimek másik csoportját a thioredoxin-reduktázok képezik. Baktériumokban, néhány eukarióta szervezetben, állatokban és emberben egyaránt előfordul. Az emberi TRxR-oknak 3 izoformája létezik (citoszolikus, mitokondriális és a herében található), melyeket más-más gének kódolnak. Homodimer struktúrájú proteinek, melyeknek minden monomerje tartalmaz egy FAD prosztetikus csoportot, egy NADPH kötőhelyet és egy redox-aktív diszulfid csoportot. Mint ahogyan arra nevük is utal – az oxidált thioredoxin redukálásáért felelősek – gyakorlatilag egyedüli enzimként, így nagy befolyásolhatósági lehetőséget jelentenek a thioredoxin közvetítette biológiai folyamatokban. Antioxidáns hatásukat kétféle módon fejtik ki, egyrészt az oxidált dehidroaskorbát redukálásával a szervezet számára hasznosítható aszkorbinsavat hoz létre (*May és mtsai 1997*), másrészt az elektrondonorként funkcionáló thioredoxin közreműködésével direkt módon a thioredoxin-peroxidáz működését, ezáltal a H₂O₂ gyökök eliminálását támogatja (*Mustacich and Powis 2000*). Emellett a ribonukleotid reduktáz redukálása révén jelentős szerepet kap a dezoxiribonukleinsavak szintézisében (*Moore és mtsai 1964*) valamint a sejtciklus szabályozásában. A tumorszuppresszor p53 gén aktiválása és az intracelluláris redox homeosztázis befolyásolásával preventív hatása lehet a daganatok kialakulásában (*Carlson és mtsai 2012*).

Az enzim működéséhez esszenciális a Se jelenléte (*Fujiwara és mtsai 1999*). *In vitro* és *in vivo* kísérletek egyaránt igazolják, hogy a tápközeghez adott, vagy táplálék útján bevitt Se növeli a TRx enzim szintézisét és aktivitását (*Mustacich and Powis 2000*). A Se deficiens táppal etetett patkányok szöveteiben jelentősen csökken a TRx aktivitás, kivételt képez az agy (*Hill és mtsai 1997*).

Szelenoprotein P

A szelenoprotein P plazmaprotein, mely antioxidáns szerepén túl transzporterként viselkedik, Se-t szállít a különböző szövetekbe, illetve anyatej útján az újszülöttbe (*Pietschmann és mtsai 2014, Hill és mtsai 2014*) Amellett, hogy a herékben is biztosítja a

PHGPx-hez szükséges Se mennyiséget, ő maga is hozzájárul a fertilis sperma létrehozásához (Michaelis és mtsai 2014).

A szelenoprotein P a szelenoenzimek hierarchiájának alján helyezkedik el, így ha a Se bevitel limitált, az enzimaktivitás csökken. Ezáltal a Se státusz megállapításában éppoly hasznos biokémiai marker, mint a celluláris és plazma GPx.

Szelenoprotein N, W

Szerepük még nem tisztázott, azonban annyi bizonyos, hogy az izom fejlődésében, az izomsejtek védelmében fontos szerepet játszanak. Kódoló génjük kiütése izomdegenerációhoz vezet (Zhang és mtsai 2012).

A szelenoprotein W az elsők között azonosított szelenoprotein, mely legnagyobb mennyiségben az izmokban, a szívben és az agyban szintetizálódik. Meglehetősen érzékeny a Se bevitelre, emiatt jól tükrözi az aktuális Se státuszt. Antioxidáns hatása vitathatatlan, védi a mioblasztokat az oxidatív stressz károsító hatásaitól az izomfejlődés során, viszont feltételezhetően nem ez a fő feladata.

Tiroid hormon dejodinázok

A jodotironin-dejodináz enzimek az aktív trijodotironin (T_3) hormon létrehozásáért felelős enzimek. A pajzsmirigy sejtjeiben 4 jódatomos tiroxin (T_4) és 3 jódatomos jodotironin (T_3) szintetizálódik. Előbbi biológiailag inaktív prohormon, melynek dejodinációjával aktív T_3 keletkezik. A reakciót a szeléntartalmú jodotironin-dejodináz enzimek katalizálják, melyek így módon kiemelkedő szerepet töltenek be a tiroid hormonok szintézisében és az általuk közvetített biológiai folyamatokban. Emlősökben 3 típusát figyelték meg. Az 1-es és 3-as típus a plazmamembránban, a 2-es típus az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódik. 1-es típus felelős valójában a vérben keringő aktív T_3 szintért. Ezzel ellentétes hatású a 3-as típus, mely inaktíválja a T_3 -t. A két enzim együttes működése eredményezi az aktív-inaktív trijód-tironin hormonok egyensúlyát. A 2-es típus szövetspecifikus feladatokat lát el: legmagasabb koncentrációt születés környékén mérhetünk a vázizmokban, mely a posztnatális időszakban egyre csökken. Expressziója csak izomsérülést követő regeneráció során fokozódik újra. Ezenkívül a barna zsírszövetben a hideghez való adaptáció kapcsán emelkedik meg a szintje (Labunsky és mtsai 2014).

Lin és mtsai (2014) igazolták a Se esszenciális szerepét a jodotironin-dejodináz enzimek működésében. Se hiányos táppal etetett csirkékben zavart szenvedett a $T_4 \rightarrow T_3$ konverzió. A T_4

szintje megemelkedett, a biológiailag aktív T_3 szintje pedig szignifikánsan csökkent a pajzsmirigyben.

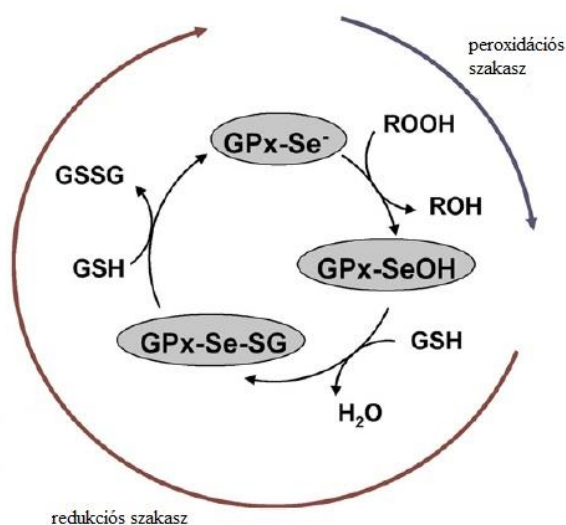
A szelén szerepe a biológiai folyamatokban

A Se szerepe az állati és humán szervezetben ma már tisztázódni látszik, ám korábban ez korántsem volt olyan egyértelmű. Az 1930-as években megjelent közleményekben mérgező, majd később karcinogén elemnek nyilvánították (Vernie és mtsai 1984). További vizsgálatok azonban bebizonyították ennek ellenkezőjét, miszerint a szervezet számára nélkülözhetetlen anyagról van szó, mi több, tumorelles tulajdonsággal is bír. Az, hogy a Se éppen melyik arcát mutatja felénk, elsősorban az alkalmazott koncentráció függvénye.

Antioxidáns védekezés

Mai ismereteink szerint a Se az antioxidáns védekezés egyik kulcsfontosságú eleme, mivel a szabadgyökök eliminálásáért felelős glutathion-peroxidáz enzimek aktív centrumát képezi. A Se megfelelő bevitele segít elkerülni az oxidatív stressz következményeként kialakuló betegségeket.

Antioxidáns hatásukat a H_2O_2 és más szerves hidroperoxidok vízzé és alkohollá történő redukálása révén fejtik ki. A redukálóerőt a glutathion biztosítja (kivéve néhány esetben, pl. az agyi mitokondriumokban, ahol a glutathion-szintetáz hiányában γ -glutamilcisztein szolgáltatja a redukálóerőt). A glutathion-peroxidáz enzimek katalitikus ciklusát a GPx-1 példáján keresztül az alábbi ábra szemlélteti:



2. ábra: A GPx-1 enzim katalitikus ciklusa. A GPx aktív centrumában lévő szelenol (GPx-Se⁻) a hidroperoxid (ROOH) jelenlétében oxidálódik. Az oxidált forma két lépésben alakul vissza a redukált formává, melyhez 2 glutathion (GSH) szükséges. A folyamat végeredményeképpen víz és alkohol keletkezik. (Brigelius-Flohé és Maiorino 2013)

Immunrendszerre gyakorolt hatások

A megfelelő Se-bevitel nélkülözhetetlen mind a veleszületett, mind a szerzett immunválasz folyamatában. Szerepet játszik a T helper sejtek differenciációjában, regulációjában, a B-sejtek patogénfüggő antitesttermelésében, a fehérvérsejtek adhéziójában, migrációjában (Huang és mtsai 2012) valamint fokozza az NK-sejtek citotoxikus válaszát is (Fernandes és mtsai 2014).

A Se deficiencia közrejátszik a gyulladás folyamatában, Se adagolásával azonban a gyulladásos markerek visszatérnek az alapszintre (Stockler-Pinto és mtsai 2014, Zhang és mtsai 2015). Antivirális hatását Hepatitis C (Mukherjee és mtsai 2014), és Cocksackie (Cermelli és mtsai 2002) víruson is bizonyították, a HIV-1 vírus virulenciáját pedig csökkenti (Weeks és mtsai 2012). Antivirális szerekkel kombinálva szinergista hatást fejt ki influenza A vírus gátlása során (Abdullaev és mtsai 1988).

Anyagcserére gyakorolt hatás

A dehidrináz enzimek aktív komponenseként részt vesz a pajzsmirigyhormon aktiválásában ($T_4 \rightarrow T_3$ átalakulás), ezáltal közreműködik az anyagcsere megfelelő szinten tartásában.

Fertilitás

A Se bevitel és a férfi fertilitás kapcsolata a szelenoproteinek lokalizációjában gyökerezik. A herékben jelenlévő PHGPx jelentős antioxidáns erőt képvisel, és védi a spermatozoákat a reaktív oxigén speciestől. A szelenoprotein P transzportfunkciót lát el, a herékbe szállítja a Se-t, emellett maga is részt vesz a spermatogenezisben. A PHGPx kulcsfontosságát igazolandó Schneider és mtsai (2009) megállapították, hogy PHGPx knockout egerek infertilisek, a spermiumok száma csökkent, és gyakoriak voltak a funkcióképtelen ivarsejtek. Férfiakon végzett vizsgálatok is igazolják a Se normál fertilitásban betöltött szerepét: Se-kezelés hatására fokozódik a CatSper gén expressziója, mely a spermiumok motilitásáért felelős. Emellett ritkábban fordulnak elő morfológiai abnormalitások és javul a spermiumok életképessége is (Mohammadi és mtsai 2009)

Kemopreventív hatás

Redman és mtsai (1997) és mtsai által végzett *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a szelenometionin dózisfüggően képes gátolni a mell-, prosztata és a bőr rákos sejteinek növekedését, ugyanakkor a gátlás normál fibroblaszt sejtvonalon csak 1000x magasabb koncentrációban (mM) jelentkezett. Egy nagy létszámú, randomizált tanulmány szerint a napi

200 µg Se szupplementáció képes csökkenteni a prosztata-, tüdő- és vastagbélrák incidenciáját és mortalitását (Clark és mtsai 1996). A daganatokra való hajlam és kialakulásuk valószínűsége összefüggésbe hozható a GPx-1 enzim csökkent expressziójával. *In vitro* sejtenyészetekben a Se szupplementáció -és ezzel összhangban a GPx-1 aktivitás növekedése- csökkenti az UV-sugárzás okozta DNS lánc-töréseket, növeli a sejtek túlélési esélyeit. *In vivo* vizsgálatokban tRNS^{sec} mutáns egereket használtak, melyeket csökkent szelenoprotein –különösen GPx-1- expresszió jellemzett. GPx-1 hiányában ezek az állatok fokozott hajlamot mutattak a daganatos elváltozásokra (Lubos és mtsai 2011).

Kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatások

GPx-1 hiánya endotheliális diszfunkciókat okoz, mely jelentős strukturális abnormalitásokhoz vezethet az erekben és a szívben. Az oxidatív stressz mérséklésével protektív szerepet játszik az ischaemia-reperfúzió kialakulásában (Rose és mtsai 2014). Transzgén egereken kimutatták, hogy a GPx overexpressziója ellenállóbbá tette az állatokat a miokardiális infarktussal szemben (Yoshida és mtsai 1996). Az alacsony szelénbevitel megnyújtja az említett betegségekből való felépülés idejét is. A Se szupplementáció emeli a vér HDL szintjét, ezzel párhuzamosan csökkenti az atherosclerotikus plakkok kialakulását és egyéb kardiovaszkuláris megbetegedések rizikóját (Cominetti és mtsai 2012). Alacsony szérums Se szint facilitálja az endotheliális diszfunkciók és atherosclerosis kialakulását (Atakan és mtsai 2013). A szelén jelentőségének felfedezése a Cocksackie B3 vírussal összefüggésbe hozható kardiomiopátia, a Keshan-kór tanulmányozásához köthető. Az ilyen betegségben szenvedő páciensek esetében egyöntetűen alacsony plazma Se szintet mértek. A szelén antivirális és indirekt antioxidáns hatása egyaránt összefüggésbe hozható a betegség megelőzésével (Loscalzo és mtsai 2014).

A szelén és az obezitás kapcsolata

Összefüggést figyeltek meg alacsony szelénbevitel és elhízás között. Gyermekbevonásával készült tanulmány alapján kimutatható volt a negatív korreláció a szérums Se szint és az összes antropometriai paraméter között. Ráadásul a túlsúlyos gyermekek antioxidáns kapacitása is alacsonyabb volt, ugyanis az alacsony szelénszint a GPx expresszió csökkenését vonja maga után (Ortega és mtsai 2012, Alasfar és mtsai 2011). OLETF patkányokon végzett kísérletekben a 2 hétig tartó Se -kezelés csökkentette a vér glükóz szintjét, a koleszterol-,

triglicerid-, LDL-szintet. Gátolta az adipocyták hipertrófiáját, ezáltal csökkentette az abdominális zsírszöveti felhalmozódást (*Kim és mtsai 2012*).

Napi bevitel

A tápanyagok bevitele kapcsán általában két fontos paramétert kell figyelembe vennünk:

1. napi ajánlott mennyiség (Recommended Dietary Allowance = RDA)
2. legmagasabb tolerálható mennyiség (Tolerable Upper Intake Level = UL)

A *National Institutes of Health* által megadott értékek kortól és nemtől függően változhatnak.

A megválasztott értékek korrelálnak azzal a Se mennyiséggel, amely az adott életszakaszban maximalizálja a GPx aktivitást.

A szelén napi ajánlott mennyiségét (RDA) életkoronként a 2. táblázat mutatja.

Kor	Férfi (µg)	Nő (µg)	Terhesség (µg)	Laktáció (µg)
6 hónapos korig	15	15		
7-12 hónap	20	20		
1-3 év	20	20		
4-8 év	30	30		
9-13 év	40	40		
14-18 év	55	55	60	70
19-50 év	55	55	60	70
51 év felett	55	55		

2. táblázat: *Se napi ajánlott mennyisége életkoronként*

Szelénhiány

Az alacsony Se bevitel 0,5-1 milliárd embert érint világszerte (*Combs 2001*). Elégtelen szelénbevitel esetén a glutathion-peroxidáz működése zavart szenved, így a szervezetben szabadgyökök halmozódnak fel. Az oxidatív stressz számos betegség kialakulásának rizikófaktoraként lehet. A Se legjellemzőbb hiánybetegsége a Keshan-kór (kardiomiopátia), melyet Kína azon tartományáról neveztek el, ahol először azonosították a betegség okát.

Emellett közrejátszik a férfiak terméketlenségében, valamint a Kashin-Beck-kór (osteoarthritis) kialakulásában. A dejodináz enzimek elégtelen működése miatt a pajzsmirigyhormon közvetítette folyamatok is zavart szenvednek, így megnövekedhet pl. a csecsemőkori kreténizmus rizikója is.

Irodalmi adatok szerint maximális GPx-expresszió és aktivitás 90 µg/l plazma Se-koncentrációnál figyelhető meg. Ezzel szemben a magyar lakosság körében végzett vizsgálat során kiderült, hogy az átlagos Se koncentráció nem haladja meg az 50 µg/l értéket (Cser és mtsai 1996).

Szeléntoxicitás

Ahogy arról korábban említés esett, a brazil dió nagy mennyiségben tartalmaz Se-t. Ennek mértéke elérheti diónként a 68-91 µg-ot. Rendszeres fogyasztása okozhat toxikus tüneteket. A szeléntoxikózis v. szelenózis első tünetei a fokhagymaszagú lehelet és a fémes íz a szájbán. *Krónikus* nagy dózisú szelénbevitel következménye a haj és köröm töredezettsége vagy elvesztése, bőrkiütések, bőrléziók, hányinger, hányás, fogak elszíneződése, szédülés, súlyosabb esetben pedig ingerlékenység és idegrendszeri abnormalitások.

Táplálék útján bevitt egyszeri Se mennyiség ritkán éri el a toxikus mértéket, de táplálék-kiegészítő formájában előfordulhat a túladagolás. *Akut* szelénmérgezés számos tünetet ölthet: gasztrointesztinális és neurológiai problémák, feledékenység, tüdőelégtelenség, miokardiális infarktus és egyéb szív-és érrendszeri károsodások, hajhullás, izomgyengeség, tremor, arcpír, veseelégtelenség, ritka esetekben halál.

A *National Institutes of Health* által megadott legmagasabb tolerálható mennyiségek (UL) életkoronként a 3. táblázatban láthatók.

Kor	Férfi (µg)	Nő (µg)	Terhesség (µg)	Laktáció (µg)
6 hónapos korig	45	45		
7-12 hónap	60	60		
1-3 év	90	90		
4-8 év	150	150		
9-13 év	280	280		
14-18 év	400	400	400	400
19 év felett	400	400	400	400

3. táblázat: Se legmagasabb tolerálható mennyiségei életkoronként

Ezen értékek meghatározása a legenyhébb toxikus tünetek megjelenéséhez (hajhullás, körömtöredezettség) kötődik.

Szelén esetében a RDA és UL érték közel esik egymáshoz, az optimális dózistartomány szűk, emiatt a táplálék-kiegészítő formájában alkalmazott Se dozírozása különösen nagy figyelmet igényel.

Új törekvések: nanopartikuláris szelénkészítmények

A biztonságosabb alkalmazhatóságra való törekvés a kutatókat új formulák, és technológiai újítások kifejlesztésére sarkallja. A legújabb irányvonalat a Se nanopartikulumok (SeNP) jelentik, melyek előállítására jelenleg 2 módszer kínálkozik: 1. kémiai szintézis (*Zhang és mtsai 2001*) 2. ún. „green technology”, azaz elemi Se előállítása baktériumok segítségével. A baktériumok tápközegéhez nagy mennyiségű szelenitet adva a baktériumok metabolizmusuk során elektronakceptorként használják a Se oxianiont, majd nanoméretű (50-500 nm) elemi Se gömböcskék (Se^0) formájában kiválasztják tápközegükbe. Számos baktériumfaj képes a Se redukálására. A gömböcskék mérete fajra jellemző tulajdonság. A kémiai szintézissel szemben ez a módszer jóval hatékonyabb, mert egységes méretű, nagy tisztaságú Se partikulumokat eredményez, ami illeszkedik az étrend-kiegészítőkkel szemben támasztott elvárásokhoz. Emellett az előállítás folyamata gyorsabb, költséghatékonyabb, és az egyes lépések is kontrollálhatóbbak (*Tam és mtsai 2010, Eszenyi és mtsai 2011*).

Ami a biológiai hatásokat illeti, igen kedvező eredményekkel szolgáltak az eddigi vizsgálatok. A nanopartikuláris Se antioxidáns hatása jelentősebb mind a szerves, mind pedig a szerves szelénformákénál (*Wang és mtsai 2007*), emellett az immunrendszerre gyakorolt hatása is kifejezettebb. *Sadeghian és mtsai 2011* juhokon végzett összehasonlító vizsgálatából kiderült, hogy a SeNP a szelenithez képest szignifikánsabb nagyobb mértékben növelte a neutrophil granulocyták számát és nyújtotta a sejtek túlélési idejét.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Általános megfontolások

Kísérleteket 2 fő részre osztottam. Először vizsgáltam a szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére kifejtett hatásait, ezt követően összehasonlítást végeztem az új nanopartikuláris (NanoSe és LMS) és már ismert, forgalomban lévő szelénkészítményekkel. A vizsgálatok az alábbi pontokban megegyeztek:

4.1.1. Kísérleti állatok

Kísérleteket az Európai Közösség laboratóriumi állatok tartására vonatkozó útmutatásainak betartásával végeztem. A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága jóváhagyta (4/2011. DEMÁB).

A vizsgálatokhoz BDF1 (C57Bl/6 x DBA/2) 20 hetes hím egereket használtam (Országos Onkológiai Intézet, Budapest, Magyarország). Az állatokat az előírásoknak megfelelően tartottam: $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű és $60\pm 10\%$ relatív páratartalmú állatszobába tartódobozonként 5 egeret helyeztem el, 12 órás váltakozó fény-sötétség periódusban. A csapvizet, standard rágcsálótápot és a speciális diétának megfelelő tápokot az állatok *ad libitum* fogyaszthatták.

4.1.2. Vegyszerek

DMBA. 7,12-dimetil-benzantracént a Sigma Aldrich Kft.-től rendeltem (Budapest, Magyarország). A liofilizált anyagot napraforgó olajban oldottam. Az egerek 200 mg/ttkg egyszeri dózisú DMBA oltást kaptak intraperitoneálisan.

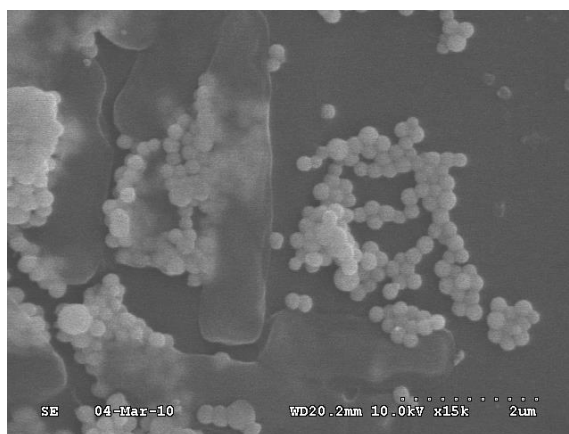
FRAP-reagens összetevői:

- acetát puffer: 300 mM, pH 3,6 (3,1 g Na-acetát + 16 ml jégcet + deszt.víz 1 l-re kiegészítve)
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ): 10 mM, 40mM-os HCl-ben oldva (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország)
- FeCl_2 : 20mM vizes oldata (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország)

Ransel kit: a glutathion-peroxidáz mérésére alkalmas vegyszercsomagot a Randox Laboratories Ltd.-től rendeltem (Crumlin, United Kingdom).

4.1.3. Nanopartikuláris elemi szelén előállítás

A 100-500 nm átmérőjű NanoSe gömböcskék előállítását Dr. Prokisch József és mtsai végezték (Eszenyi és mtsai 2011). A Se forrást és az inokulumot (probiotikus joghurt baktériumok) 1 L MRS médiumhoz (Oxoid Ltd., Hampshire, United Kingdom) adták. Se forrásként nátrium-hidroszelenit (NaHSeO_3) 10 g/L koncentrációjú törzsoldatát használták. 20 ml szelénit törzsoldatot adtak 980 ml MRS médiumhoz, így a végső koncentráció 0,2 g/L



3. ábra: Baktérium által kiválasztott nanoszelen gömböcskék- Dr. Prokisch József és mtsai felvétele

lett. A 10 ml-nyi inokulum *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus casei* baktériumfajok keverékét tartalmazta. A Se forrás és az inokulum hozzáadása után keverőben, 37°C-on megkezdődött a 48h át tartó fermentáció. Ezt követően 7 napon keresztül szobahőmérsékleten tömény sósavval kezelték a terméket, amely lizálta a baktériumokat, és szabaddá váltak a Se gömböcskék. Ismételt vizes mosással, centrifugálással ezek a Se nanopartikulumok tisztán elválaszthatók voltak.

4.1.4. Vérvétel egerekből

A vért hematológiai kapilláris segítségével a retroorbitális plexusból vettem le, majd 2 μl aprotinint (Gordox, Richter Gedeon Rt., Budapest, Magyarország) és 5 μl EDTA-t (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország) tartalmazó Eppendorf-csőbe engedtem. 100 μl vért sejtszám-meghatározáshoz (CellDyn 3700, Abbott, Santa Clara, CA, USA), a további vérmintákat pedig teljes antioxidáns kapacitás méréséhez és GPx aktivitás meghatározásához használtam.

4.1.5. Csontvelő kinyerése, sejtuszuszenzió készítése

Vérvételt követően cervikális diszlokációval extermináltam az állatokat, steril körülmények között eltávolítottam a femurt, majd fecskendő segítségével és 1 ml McCoy's 5A médiummal (GIBCO GRAND Island, NY, USA) kimostam a csontvelőt. Vékony tűn többször áthúzva egysejtes csontvelői szuszpenziót kaptam. A műveleteket lamináris box alatt végeztem, végig fokozottan ügyelve a sterilitás megtartására.

4.1.6. Kolónia stimuláló faktor források

4.1.6.1. WEHI-3B sejtvonal fenntartása

Metcalf és mtsai (1969) illetve *Warner és mtsai (1969)* szerint történt a WEHI-3B sejtek tenyésztése és a kondicionált médium készítése.

Megfelelő számú, fagyasztóban (-20 °C-on) tárolt és előzetesen sterilre szűrt 10 ml 20% borjúsavós szupplementált McCoy sejttenyésztő médiumot tartalmazó sejttenyésztő flaskákat a teljes felolvadásig 37 °C-os vízfürdőbe helyeztem. A felolvadás után legalább 3 órán keresztül 37 °C-os 5% CO₂ koncentrációjú termosztátba tettem. Körülbelül 10⁶ logaritmusos fázisban növekvő sejtet pipettával az előkészített táptalajt tartalmazó flaskába juttattam. Ezután a flaskákat 37 °C-os 5% CO₂ koncentrációjú termosztátba tettem és naponta invert mikroszkóp alatt ellenőriztem a sejtek szaporodását. A sejtek további passzálását szükség szerint, de általában minden 3. nap végeztem.

4.1.6.2. WEHI-3B kondicionált médium készítése

A növekvő sejteket passzálást követően továbbra is termosztátban tartottam, majd összesen 5-7 nap tenyésztési idő után a sejtuszupenziót 50 ml-es centrifugacsőben 15 percig 2500 rpm-en centrifugáltam és a felülúszót eltávolítva, szűrés után, mint kondicionált médiumot a csontvelői progenitor sejtek tenyésztésénél használtam.

4.1.7. GM-CFU kolónia esszé

A femoralis csontvelőből aseptikus körülmények között nyert csontvelő szuszpenzióból speciális lágy-gél tenyészeteket készítettem. A lágy-gél tenyészetek készítése a korábban leírtaknak megfelelően történt (*Benkő és mtsai 1999*), Petri-csészénként (Greiner, Nürtingen, Németország) 2x10⁵/ml csontvelői sejtrel. A tenyésztéshez McCoy's 5A módosított táptalajt használtam, mely kiegészítőként aminosavakat, Na-piruvátot, NaHCO₃-ot, antibiotikumokat (streptomycin, penicillin), valamint 20% borjú szérumot (GIBCO GRAND Izland NY USA) tartalmazott.

A lágy-gél halmazállapotot 1,2%-os metilcellulóz (Methocel, FLUKA, Buchs, Svájc) biztosította. Ebben a közegben a progenitor sejtek osztódásuk során keletkező utódsejtjeikkel együtt maradva kolóniákat képeznek. Kolóniastimuláló faktor forrásként WEHI-3B kondicionált médiumot adtam a sejtekhez. Az egyes állatok csontvelősejtjeiből 3-3 párhuzamos tenyészetet készítettem, amelyeket 7 napig CO₂-termosztátban (SANYO, SANYO Electric

Co.,Ltd., Japán) növesztettem 37°C-on, 100%-os páratartalom és 5%-os CO₂-tartalom mellett. Ezt követően a kolóniákat sztereomikroszkóp (Olympus, Hamburg, Németország) alatt megszámláltam. Kolóniának tekintettem a legalább 50 sejtet tartalmazó csoportokat.

4.1.8. Csontvelőműködés vizsgálata

A csontvelői funkciót a GM-CFU, azaz a granulocyta-macrophag közös progenitorok jellemző paramétereinek vizsgálatával határoztam meg. A betegek szempontjából ezen progenitorok számának csökkenése a legveszélyesebb, ugyanis granulocyták, macrophagok hiányában a szervezet védekező képessége gyengül, neutropeniás állapot léphet fel, ami súlyos fertőzésekhez és esetlegesen halálhoz is vezethet.

Meghatároztam a csontvelői cellularitást, melyet a csontvelői szuszpenzió sejtszáma és térfogatának szorzataként kaptam, a GM-CFU kolóniaszámot, valamint a cellularitás és a kolóniaszám szorzataként a femur teljes GM-CFU tartalmát. A tenyészetekben a GM-CFU progenitorsejtek leánysejtjeikkel együttmaradva kolóniákat képeznek, így az adott mennyiségű, 2×10^5 db csontvelői sejtet tartalmazó tenyészetekben megjelenő GM-CFU kolóniák száma megmutatja, hogy a sejtek hányad része volt GM-CFU progenitor.

4.2. Szelénrel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére és csontvelői működésére kifejtett hatásainak vizsgálata

4.2.1. Bárányhús

A szárított bárányhúst a Dr. Monori István és a Debreceni Egyetem Agrártudományi Központ Karcagi Kutatóintézete biztosította. Előállításánál fontos szempont volt, hogy a formuláját tekintve beilleszthető legyen az egerek étrendjébe. A nyers illetve fagyasztott forma kizárható volt, a szárított formula tűnt lehetséges megoldásnak –részben az állatok táplálkozási szokásai, részben gyakorlati szempontok (pl.: szavatossági idő) miatt.

A bárányok ivóvíz útján jutottak szelénhez. Vízük 0,1% koncentrációban tartalmazott NanoSe-t, mely felszívódva az izomszöveteikben is akkumulálódott. Az állatok levágása után a húsukat -a napsütés dehidratáló hatását imitálva- speciális berendezésben szárították. A dehidratáló dobozt 24 infravörös égő melegítette a megfelelő hőmérsékletre. Az infravörös fény előnye, hogy a 8-14 µm hullámhosszú sugarakat is tartalmaz, melyek nemcsak a hús felszínét képesek szárítani, hanem a mélyebb rétegekbe is behatolnak, biztosítva az egyenletes

dehidratálást. Emellett természetesen jelen vannak a 20 µm hullámhosszú sugarak is, melyek a felszínt melegítik. A hús fehérjetartalmának megőrzése érdekében a hőmérsékletet 38 °C-nál maximalizálták. A szárítási folyamat 48h át tartott, mialatt a 4-5 x 20-30 x 100-400 mm-es hússzeleteket négyszer fordították meg. A kész termék kevesebb, mint 7% vizet tartalmazott, ennek köszönhetően szobahőmérsékleten is akár 3 hónapig megőrzi minőségét.

4.2.2. Bárányhús szeléntartalmának mérése

A bárányhús szeléntartalmának meghatározását Dr. Prokisch József és mtsai végezték. A mérés hidrid-képzésen alapuló atomfluoreszcens spektrometria módszerével történt (HG-AFS). Mintaelőkészítés során 5 ml 65%-os HNO₃-t adtak 1 g húsmintához, először 60 °C-on 1 órán át, majd 120 °C-on 4 órán át emésztették. Ezután 3 ml 30%-os H₂O₂-t adtak hozzá. Az emésztett mintát 15 ml 3 M HCl-lel hígították, majd leszűrték. A HCl hozzáadása a hidrid-képzés szempontjából szükséges. A mérés Millenium Merlin típusú atomfluoreszcens spektrométeren történt.

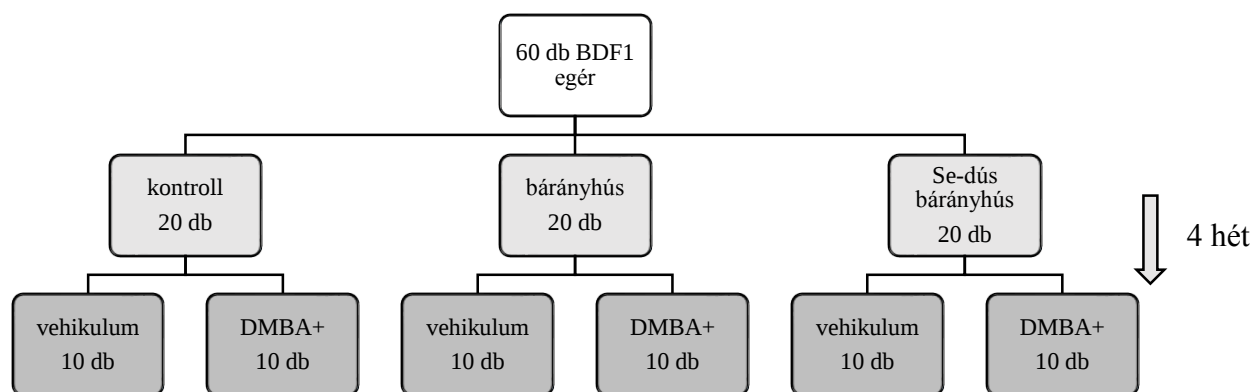
4.2.3. Teljes antioxidáns kapacitás meghatározása

A vizsgálat során FRAP-módszert (Ferric Reducing Ability of Plasma) alkalmaztam *Benzie és Strain nyomán (1999)*. Elektron-átmeneten alapuló kolorimetriás módszer, ahol a minták antioxidánsai viselkednek elektrondonorként, így alkalmas a vér teljes antioxidáns tartalmának meghatározására. A FRAP-reagens acetát puffert, TPTZ-t és FeCl₂-t tartalmazott 10:1:1 arányban. Alacsony pH-n a Fe³⁺-TPTZ komplexben lévő Fe³⁺ redukálódik Fe²⁺-vé, amelyet színváltozás kísér. A redukálódott vas mennyisége függ a környezetében lévő redukálószer (antioxidánsok) mennyiségétől.

A mérés vérplazmából történt. Ehhez az alvadásgátolt vért 10.000 rpm-en centrifugáltam 2 percig, majd a felülúszót leszívtam. 10 µl plazmához 300 µl FRAP-reagenst adtam, és 593 nm-en (Perkin Elmer spektrofotométer, Németország) detektáltam az abszorbancia-változást. Standardként 1000 µM aszkorbinsav oldatot használtam.

4.2.4. Kísérlet menete

Kísérleteimhez 60 db hím egeret (n=60) random módon 3 csoportba osztottam. A kontroll csoport (20 állat) standard rágcsálótápot fogyasztott, 20 állat szupplementálás nélküli szárított bárányhúst, 20 állat pedig NanoSe-nel dúsított bárányhúst kapott.



4. ábra: csoportbeosztás a funkcionális élelmiszer vizsgálata során.
Diéta időtartama: 4 hét

Mivel az egerek étrendjében ritkán szerepel hús, úgy mindkét báránymáj diétán lévő csoportnak szalmát adtam rostforrásként, valamint ivóvizüket Neovit Forte (Kela Laboratoria N.V., Belgium) oldattal szupplementáltam (0,125 ml/500ml víz/5 egér/hét), mely A, B₁, B₂, B₆, B₁₂ D, E vitaminokat és ásványi anyagokat (Mg, Co, Cu, Zn, Mn,) tartalmazott. Az oldatban Se nem volt.

Az etetési periódus 4 héten keresztül tartott. Eközben folyamatosan nyomon követtem az állatok testtömeg-változásait. A 28. nap végén további két alcsoportot alakítottam ki. Az egyik alcsoportban oxidatív stresszt indukáltam egyszeri 200 mg/ttkg i.p. DMBA-oltással, a másik alcsoport a DMBA oldószerét, napraforgó olajat kapta. Az oltást követő 48 h múlva történt a vér ill. csontvelő minták begyűjtése. A fent leírtak alapján zajlott a vér teljes antioxidáns kapacitásának meghatározása ill. a csontvelő funkcionális vizsgálata.

4.3. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata

4.3.1. LactoMicroSel® előállítása

A LactoMicroSel® néven bejegyzett készítményt Dr. Prokisch József és mtsai készítették (Eszenyi és mtsai 2011). A Debreceni Egyetem által szabadalmaztatott (Prokisch J. és Zommara M. 2008) új technológiai eljárással készült LactoMicroSel® szintetizálása a fermentációs szakaszig alapvetően megegyezik a NanoSe-nel azzal a különbséggel, hogy médium gyanánt friss tejet használtak. A baktériumok hozzáadása előtt a tejet ipari centrifugával lefölözték, így a zsírtartalma kevesebb, mint 0,3% lett. A Se-forrás és az inokulum összetétele a fentebb leírtak szerint alakult. A fermentáció 37-38 °C-on, 24 órán keresztül zajlott. A fermentációs idő végére

a szuszpenzió színe vörösre változott. Lecentrifugálták és a szilárd fázist 50 °C-on szárították, majd ledarálták.



5. ábra: szárított Se-dús joghurt (balra) és darált Se-dús joghurt por (jobbra) – Dr. Prokisch József és mtsai felvétele

4.3.2. NanoSe és LactoMicroSel® Se-koncentrációjának mérése

Az elkészült termékek Se-koncentrációját Dr. Prokisch József és mtsai láng emissziós atomabszorpciós (Thermo ICE 3000) és atomfluoreszcens spektrométerrel (PSA Thermo, Excalibur) ellenőrizték. A 1 ml mintához 3 ml tömény HNO_3 -at és 5 ml 30%-os H_2O_2 -t adtak, és 120 °C-on 1 órán át emésztették. Az emésztett mintát átszűrték és 50 ml vízzel felöntötték. Az elválasztott, tisztított NanoSe-mintákban 200-500 mg/L Se-koncentrációt mértek, míg a liofilizált LMS esetében 1000-3000 mg/kg Se-koncentrációt.

4.3.3. További szelénkészítmények

A két nanopartikuláris szelénkészítmény hatásait -szupplementálási célból már régóta használt- Se vegyületekkel, ill. készítménnyel kívántam összehasonlítani, melyek az alábbiak voltak:

- Na-szelenát (Na_2SeO_4) → szervesetlen (CEDA Chemicals GmbH, Németország)
- Na-szelenit (Na_2SeO_3) → szervesetlen (CEDA Chemicals GmbH, Németország)
- Sel-Plex® → szerves; állati takarmány szupplementálására használt, szelenometionint és szelenociszteint tartalmazó készítmény, melyet *Saccharomyces cerevisiae*-vel termeltetnek (Alltech Hungary Kft., Budapest, Magyarország)

4.3.4. Szeléntartalmú tápok készítése

A szupplementált tápok elkészítését Eszenyi Péter és Sztrik Attila segítségével végeztem. Ehhez normál rágszálótápot használtunk. Egyenletes szemcseméretű porrá daráltuk, majd hozzáadtuk a vizes oldatban lévő szelénkészítményeket kétféle koncentrációban (5 ppm és 50 ppm). Az így kapott masszát levágott végű fecskendőn átnyomtuk, formáztuk, majd 24 h-an át szárítószekrényben szárítottuk.



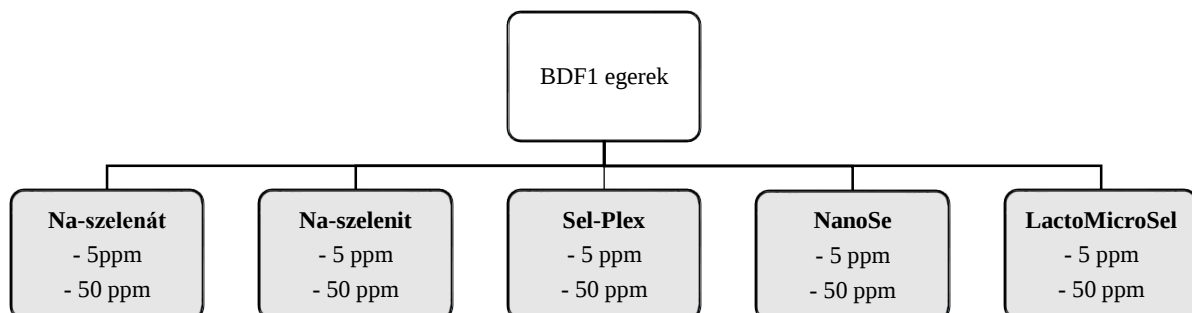
6. ábra: Se-nel szupplementált táp

4.3.4.1. Tápok Se-koncentrációjának megválasztása

A toxikológiai vizsgálatokban 50 ppm Se-koncentrációjú tápokot, míg a hatástani vizsgálatokban résztvevő állatok 5 ppm Se-koncentrációjú tápokot fogyasztottak. A koncentrációk megválasztása előzetes kalkuláció eredménye. A táplálék útján bevitt 5 és 50 ppm Se ekvivalens 40, 400 µg/ttkg/nap Se-nel, mely a bevitt táplálék egységnyi mennyiségére számítva 1, 10 µg Se/g- nak felel meg. Ha a napi táplálékbevitel megközelítőleg a testtömeg 4%-a, akkor ez a mennyiség emberi szervezetre extrapolálva 300 és 3000 µg napi Se-bevitelnek felel meg. Figyelembe véve a Se ajánlott napi dózisát és a maximálisan tolerálható mennyiségét az egerek számára az 5 ppm egy mérsékelt, hatásos, míg az 50 ppm egy erősen toxikus dózissnak tekintendő.

4.3.5. A kísérletek menete

A vizsgálatokban BDF1 egereket használtam. Az állatok 2 héten keresztül kapták a szupplementált tápokot.



7. ábra: kísérleti elrendezés a szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata során

A 2 hetes etetési periódus letelte után a hatástani vizsgálatban szereplő csoportok felében oxidatív stresszt indukáltam ip. DMBA oltással, majd a 4. táblázatban szereplő vizsgálatokat végeztem el.

Toxikológiai vizsgálatok		Hatástani vizsgálatok			
Túlélés	Ált. toxikológia	Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások		Csontvelői funkcióra gyakorolt hatások	
	testtömeg	<i>fiziológiás körülmények</i>	<i>oxidatív stressz</i>	<i>fiziológiás körülmények</i>	<i>oxidatív stressz</i>
	szervek tömege	GPx aktivitás		cellularitás	
	vérvizsgálat/fvs			GM-CFU kolóniaszám	
	máj hisztopatológia			femur teljes GM-CFU tartalma	
	csontvelői funkciók				
	viselkedés				
	külső megjelenés				

4. táblázat: a szelénkészítmények toxikológiai és hatástani vizsgálata során elvégzett mérések

4.3.5.1. Toxikológiai vizsgálatok

A túlélési vizsgálatot csoportonként 6 állaton végeztem. Az egereket 50 ppm Se-tartalmú táppal etettem, és rögzítettem az elhullások időpontját. Egy következő kísérleti elrendezésben folyamatosan nyomon követtem az állatok viselkedésében és külső megjelenésében jelentkező eltéréseket, a tápok ill. a testtömegek változásait. Az extermináció időpontját a túlélési vizsgálatokban kapott adatok alapján határoztam meg. A vérvétel, a csontvelői minták kinyerése a már leírtak alapján történt. Boncolás után lemértem a létfontosságú szervek tömegét, majd vizsgáltam a makroszkópos és máj esetében a mikroszkópos eltéréseket.

4.3.5.1.1. Szöveti minták előkészítése

A szövettani metszeteket Dr. Nagy Gábor és mtsai készítették. A hisztológiai vizsgálatokhoz használt minták a máj bal külső lebenyéből származtak. A protokoll szerint a minták fixáláson, dehidratáláson, beágyazáson és metszésen majd festésen estek keresztül. A fixálást 10%-os paraformaldehidben végezték 12 órán keresztül. Ez a lépés megakadályozza a bakteriális

bomlást, ezáltal hosszú időn keresztül megőrzi a minta jó minőségét. Ezt követően a mintákat növekvő koncentrációjú etanollal (50, 60, 70, 80, 90, 96 % és abszolút etanollal) dehidratálták. Az egyes lépcsők 30 percig zajlottak. A 100%-os etanol-kezelés után az alkoholt xilénnel távolították el a mintákból, és készítették elő a beágyazáshoz. A beágyazás 1 napon keresztül, 3 lépésben zajlott: (1) xilén-paraffin 1:1 arányú keveréke (6 h); (2) első paraffinos beágyazás (6 h); (3) második beágyazás paraffinba (12 h). Ezután 56 °C-os termosztátba helyezték. A végső beágyazás 1 napig tartott. A 15 µm (kb. 3 sejtréteg) vastagságú metszeteket Reichert típusú mikrotómmal készítették (Diversified Equipment).

4.3.5.1.2. Metszetek festése

A paraffint két lépésben távolították el a mintákból: (1) 10 percig xilénben tartották, majd (2) csökkenő koncentrációjú (96, 90, 80, 70, 60, 50%) etanollal kezelték 10-10 percig, és végül desztillált vízzel 5 percig. A rehidratálást követően a sejtmagot metanol és alum-hematoxylin tartalmú festékekkel festették 5 percig, majd a mintákat savas alkohollal kezelték (1 ml HCl 99 ml 70%-os etanolban oldva) 2 mp-ig. Két lépésben 5 percig csapvízben tartották, majd 45 mp-ig folyó vízzel mosták. A mintákat ezután újra dehidratálták 50, 60, és 70%-os etanollal 5-5 percig, majd 70%-os etanol-tartalmú eozin festékekkel festették (plazma-festés), és folytatták a dehidratálást 80, 90, 96%-os és abszolút etanollal 3-3 percig. Az alkoholt végül két lépésben, 5-5 perces xilén-kezeléssel távolították el a mintákból. A mintákat tartalmazó tárgylemezekre egy-egy csepp Entellan gyorsfedőanyagot (Merck Kft., Budapest, Magyarország) cseppentettek és fedőlemezzel borították.

4.3.5.2. Hatástani vizsgálatok fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

4.3.5.2.1. Fehérvérsejtek számának meghatározása

A fehérvérsejtek vizsgálata hematológiai automatával, Dr. Miszti-Blasius Kornél segítségével történt.

4.3.5.2.2. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások

A báránypuszt gazdag ásványi anyag és vitamintartalmával ellentétben a szelénkészítmények csak a Se aktív centrummal rendelkező enzimek aktivitásának fokozásával járulnak hozzá az antioxidáns kapacitás emeléséhez. Ennek detektálására a FRAP-módszernél specifikusabb

mérésre volt szükség, ezért az antioxidáns státuszt hűen reprezentáló GPx aktivitását határoztam meg. A mérést Ransel kit (Randox Laboratories Limited, United Kingdom) felhasználásával, *Paglia és Valentine (1967)* közleménye alapján végeztem. A kit elektronátmeneten alapuló, kolorimetriás módszer elvégzését teszi lehetővé. A minta esetünkben retroorbitális plexusból származó teljes vér (50 μ l) volt. Az enzimaktivitás eredményeként létrejövő abszorbancia-változást FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Németország) microplate readerrel detektáltam.

4.3.5.2.3. *Plazma Se-koncentrációjának meghatározása*

A vizsgálat Baranyai Edina közreműködésével a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Agilent Atomspektroszkópai Partner Laboratóriumában történt. A plazmaminták tömegét analitikai mérlegen mérték, majd 2 ml 65%-os salétromsavat és 500 μ l 30% hidrogén-peroxidot adagoltak hozzájuk és mikrohullámmal elősegített nagy nyomású feltáró egységben (MLS 1200 Mega) roncsolták. Ezt követően a mintákat lehűlést követően ioncserélt vízzel 10 ml térfogatra hígították. A Se koncentráció mérése lángatomabszorpciós spektrometriával történt (Agilent Technologies 240 FS AA), hidridfejlesztéssel, VGA 77 AA típusú hidridképző berendezéssel. A hidridképzéshez 0,6 (m/m)% NaBH₄ és 0,5 (m/m)% NaOH keverékét használták, valamint sav ágként 7 M koncentrációjú HCl oldatot alkalmaztak.

4.3.5.2.4. *Csontvelői funkcióra gyakorolt hatások*

A Se tartalmú tápok csontvelői működésre gyakorolt hatásait a fentebb leírt kolónia esszé módszerrel vizsgáltam.

4.4. *Statisztikai analízis*

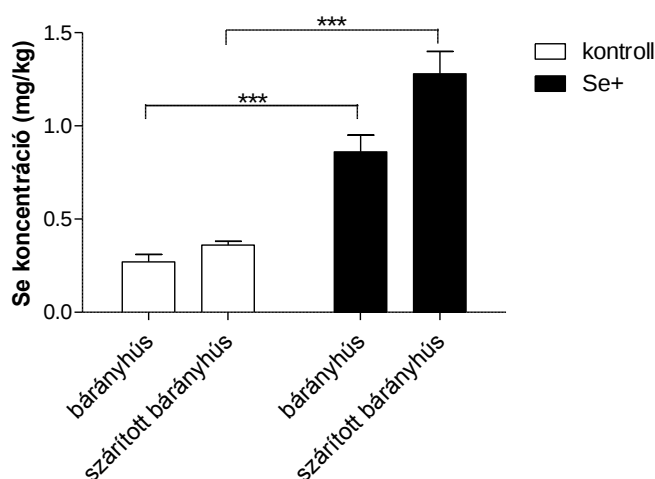
A statisztikai analízist GraphPad Prism szoftverrel végeztem (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettem fel. A kiértékeléshez páratlan t-próbát, valamint egyszempontos variancia analízist (One-way ANOVA) alkalmaztam, amit Bonferroni-féle *post hoc* módosítással készítettem el. A Bonferroni-féle módszer a páronkénti átlagok különbségének vizsgálatára használható, ahol a két csoport elemszáma lehet különböző is. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettem, ha $p < 0,05$.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére és csontvelői működésére kifejtett hatásai fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

5.1.1. In vivo Se-szupplementáció hatása a bárányhús Se-koncentrációjára

A Se-nanopartikulumokkal dúsított ivóvizet fogyasztó állatok húsának Se-koncentrációja háromszor magasabb volt, mint a normál csapvizet fogyasztó társaiké ($0,86 \pm 0,09$ és $0,27 \pm 0,04$ mg/kg). Ez az arány a hús szárítása után sem változott ($1,28 \pm 0,12$ és $0,36 \pm 0,03$ mg/kg Se). (8. ábra)



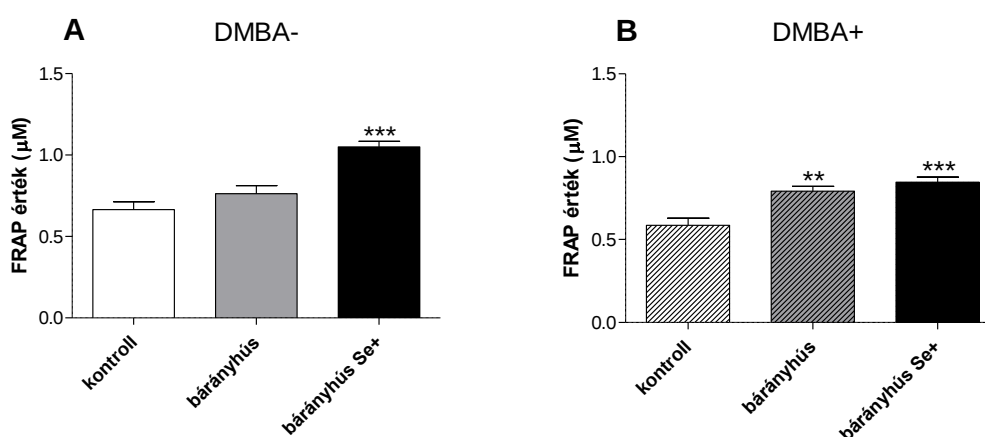
8. ábra: Bárányhús és Se-dús bárányhús Se koncentrációja hőkezelés előtt és után.
($n=5$ valamennyi csoportban, $***p < 0,001$)
A mérés Dr. Prokisch J. és mtsai közreműködésével zajlott.

5.1.2. Normál és szelénnel dúsított bárányhús hatása a teljes antioxidáns kapacitásra

Az eredményeim azt tükrözik, hogy a bárányhús jótékony hatással van a vér antioxidáns védelmi rendszerére. Szignifikánsan magasabb antioxidáns kapacitást mértem a Se-nel dúsított bárányhúst fogyasztó csoportban a kontroll ($p < 0,001$) illetve a szupplementálás nélküli bárányhúst fogyasztó csoporthoz képest ($p < 0,001$) (9A ábra).

Nagy dózisé, egyszeri intraperitoneális DMBA-oltással a csoportok felében oxidatív stresszt generáltam, mely mérsékelt csökkenést eredményezett a vér antioxidáns aktivitása tekintetében (9A és B ábra). Mind a Se-nel szupplementált, mind a szupplementálás nélküli bárányhús

fogyasztása protektívnek bizonyult a DMBA károsító hatásaival szemben. Előbbi esetében ez a védelem még jelentősebb volt ($p < 0,01$ és $p < 0,001$) (9B ábra). Habár az antioxidáns kapacitás csökkent a kezelt állatokban a kezeletlenekhez képest, a normál báránnyhús és különösen a Se-nel dúsított báránnyhús megakadályozta, hogy az antioxidáns kapacitás az abszolút kontroll állatok értékei alá csökkenjenek, így elősegítette, hogy a fiziológiás tartományban maradjanak.



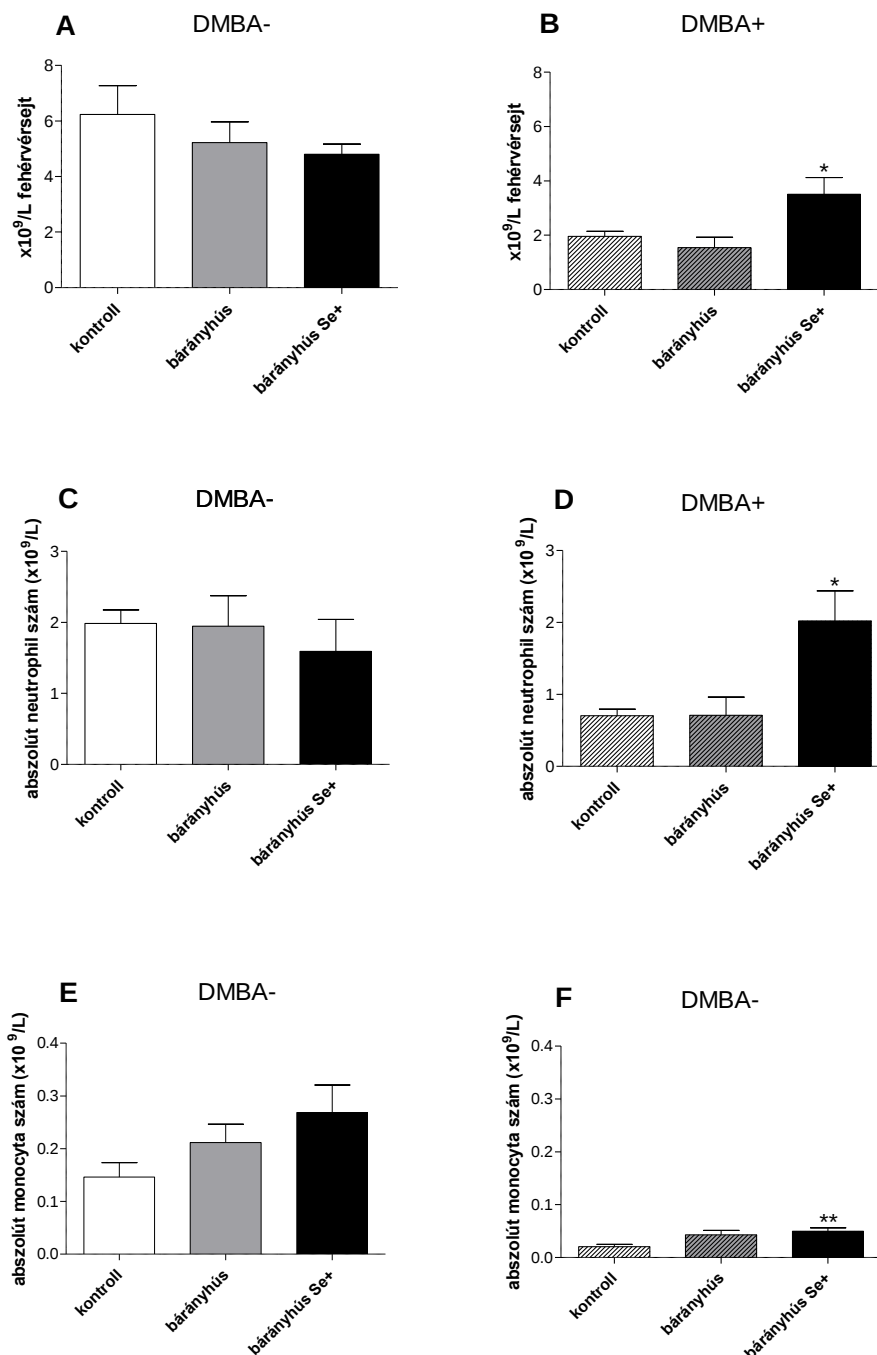
9. ábra: Normál és szelénrel dúsított báránnyhús hatása a teljes antioxidáns kapacitásra (A) normál körülmények között (DMBA-), (B) oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, $n=10$ valamennyi csoportban, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

5.1.3. Fehérvérsejtszám

A fehérvérsejtszám a fiziológiás tartományban volt mindhárom normál körülmények között tartott csoport esetében, szignifikáns különbségeket nem találtam a kontroll és a báránnyhússal etetett állatok eredményei között (10A. ábra). DMBA-kezelés hatására a fehérvérsejtszám jelentősen csökkent. A sejtpusztulás mértéke a Se-dús báránnyhússal etetett csoportban volt a legalacsonyabb, a kontroll és normál báránnyhúst fogyasztó állatokhoz képest a különbség statisztikailag is kimutatható volt ($p<0,05$) (10B ábra).

Az egyes fehérvérsejt típusok abszolút számának meghatározása során fény derült arra, hogy a Se-dús báránnyhússal etetett, oxidatív stressznek kitett csoportban a magasabb összfehérvérsejtszám a magasabb neutrophil granulocytá és monocytá számnak köszönhető. Míg a lymphocyták számában nem adódtak különbségek a DMBA-val kezelt csoportokban, addig a Se-dús báránnyhús kifejezett protektív hatással bírt a neutrophilekre és monocytákra.

(10D ábra). Az abszolút neutrophil szám a DMBA-oltás ellenére is a fiziológiás tartományban maradt.



10. ábra: Normál és szelénnel dúsított báránýhús hatása a fehérvérsejtszámra (A és B), az abszolút neutrophil számra (C és D) és abszolút monocyta számra (E és F) fiziológiás körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, $n=10$ valamennyi csoportban, * $p<0,05$; ** $p<0,01$)

5.1.4. Normál és szelénrel dúsított bárányhús hatása a csontvelői működésre fiziológiai körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

Ahogy azt a korábbi kísérleteink is igazolták, a környezet illetve xenobiotikumok károsító hatásaival szemben a fagocyták progenitorai (GM-CFU) a legérzékenyebbek. Ugyanakkor a vér vizsgálata kapcsán azt is tapasztaltam, hogy a Se-nel dúsított bárányhús protektív hatásai a fagocyták körében érvényesülnek leginkább. Emiatt fontosnak éreztem azt is, hogy az oxidatív stressz, valamint a bárányhúsok hatásait ezen sejtek csontvelőben található előalakjain is vizsgáljam.

A cellularitás, GM-CFU kolóniaszám és teljes femorális GM-CFU tartalom meghatározásával vizsgáltam a csontvelői funkciókat. Mivel minden vérsejt a csontvelőben képződik, a femorális csontvelő össz sejtszámának (cellularitás) meghatározása alkalmas a hemopoézis általános jellemzésére. A GM-CFU kolóniaszám-gyakoriság megmutatja a 2×10^5 csontvelői sejtből kinövő GM-CFU kolóniák számát, mely pontos indikátora a granulopoézis intenzitásának, a teljes GM-CFU tartalom pedig tükrözi a csontvelő regenerációs képességét.

5.1.4.1. Csontvelői cellularitás

Normál körülmények között nem volt különbség az egyes csoportok csontvelői mononukleáris sejtszámában. DMBA-kezelés hatására a cellularitás jelentős mértékben csökkent. A sejtpusztulás mértéke az egyes csoportokban eltérő volt. Legnagyobb csökkenést a kontroll csoportban tapasztaltam. A bárányhússal etetett állatok esetében kisebb mértékű, és a Se-dús bárányhúst fogyasztók körében a legcsekélyebb sejtpusztulást láttam ($p < 0,05$). Az eredmények alapján elmondható, hogy a nanoszelénrel szupplementált bárányhús közvetett módon képes mérsékelni a DMBA-okozta hemopoetikus zavarokat (11B ábra).

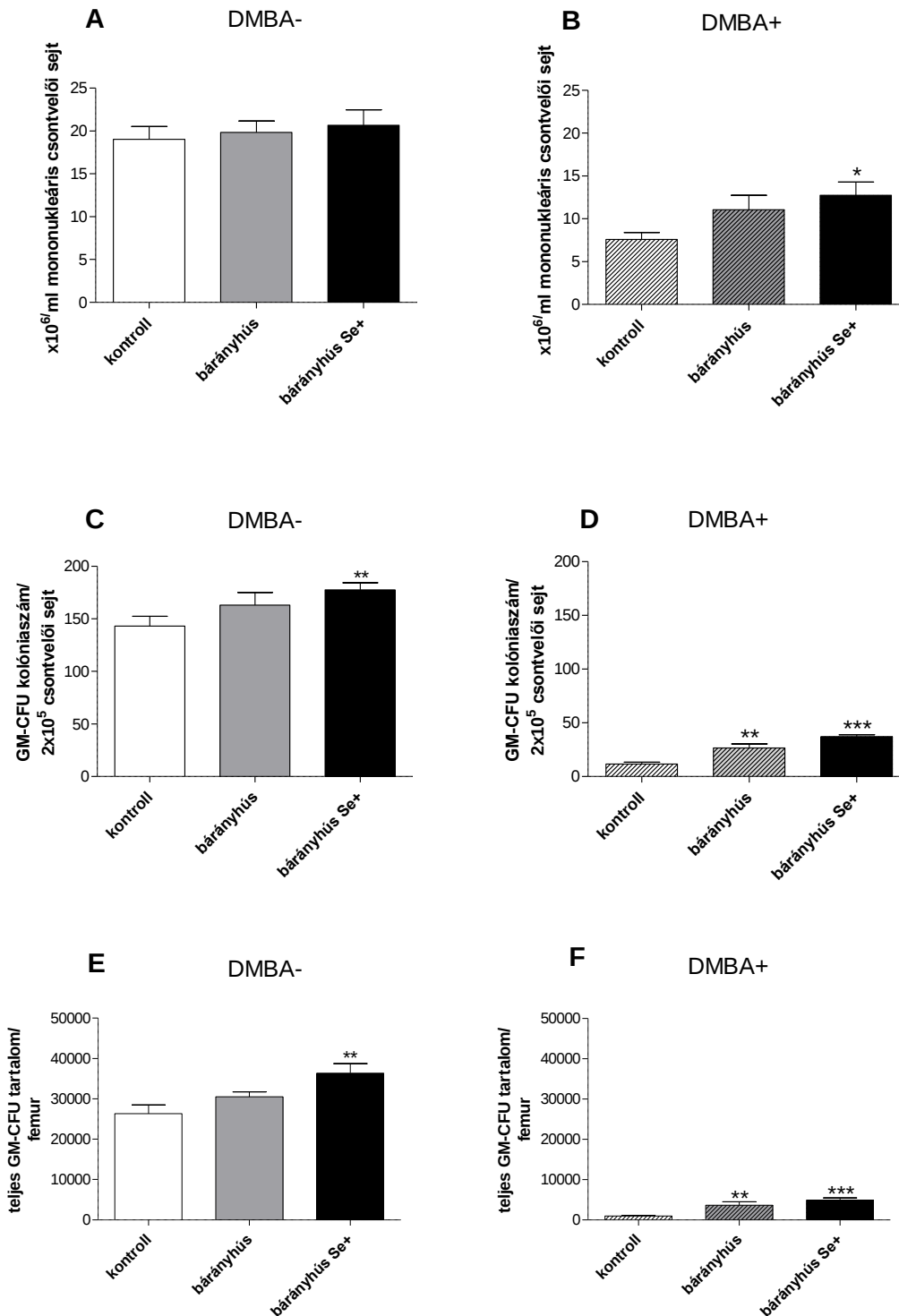
5.1.4.2. GM-CFU kolóniák előfordulási gyakorisága

Ezen paraméter szolgáltatja a legpontosabb információt a granulopoézis ill. a fagocyták regenerációjának intenzitásáról, állapotáról. E tekintetben már normál körülmények között is adódtak különbségek a különböző diétán lévő állatok között (11C ábra). Magasabb intenzitású granulopoézist tapasztaltunk a bárányhúst fogyasztó csoportban a kontroll csoporthoz képest, azonban statisztikailag jelentős különbség csak a Se-dús bárányhússal etetett állatok esetében adódott ($p < 0,01$).

A DMBA-kezelés mindhárom csoportban drasztikusan csökkentette a GM-CFU kolóniák előfordulási gyakoriságát ($p < 0,001$), amely a granulopoézis súlyos károsodására utal. A bárányhúsok fogyasztása védelmet jelentett az egerek számára, mivel szignifikánsan magasabb kolóniaszámokat számoltam mindkét bárányhúst fogyasztó csoportban. ($p < 0,01$ és $p < 0,001$) A Se-szupplementáció fokozta a bárányhús protektív hatását (11D ábra).

5.1.4.3. *A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma*

Fiziológiás körülmények között is intenzívebb granulopoézis és regenerációs képesség jellemezte a Se-dús bárányhúst fogyasztó állatokat. Mind kontroll, mind a normál bárányhússal etetett csoporthoz képest magasabb volt a csontvelőben a GM-CFU progenitorok száma (11E ábra). Az oxidatív stressz mindhárom csoportban jelentősen csökkentette a regenerációs képességet ($p < 0,001$), de a Se-dús bárányhús protektív hatása ezen paraméter kapcsán is megmutatkozott (11F ábra).



11. ábra: Normál és szelénrel dúsított bárányhús hatása a csontvelői cellularitásra (A és B), a GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságára (C és D) és a teljes femorális GM-CFU tartalomra (E és F) fiziológiai körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, $n=10$ valamennyi csoportban, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

5.2. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata

5.2.1. Toxikológiai vizsgálatok

5.2.1.1. Túlélés

Az 50 ppm Se-koncentrációjú tápok túlélésre gyakorolt hatásait az 5. táblázat összegzi.

	Napok	Egerek száma								Halálozás		Túlélés	
		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	db	%	db	%
kontroll	14	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0%	6	100%
szelenát	14	6	6	6	5	5	3	2	2	4	67%	2	33%
szelenit	14	6	6	6	6	5	5	5	4	2	33%	4	67%
Sel-Plex	14	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0%	6	100%
NanoSe	14	6	6	6	6	6	6	6	5	1	17%	5	83%
LactoMicroSel	14	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0%	6	100%

5. táblázat: 50 ppm dózisú szelénkészítmények hatása a túlélésre (n=6)

100%-os túlélést tapasztaltam a kontroll mellett a Sel-Plex-szel és a LMS-lel etetett állatok esetében is, míg két hetes szelenát-fogyasztás után a csoport kétharmada elhullott. A szelenit kevésbé volt toxikus, de az egerek egyharmada ebben a csoportban is elpusztult. NanoSe-nel etetett csoportban 2 hét után egy állat elhullását detektáltam (17%).

5.2.1.2. Megfigyelések

Az állatok viselkedését és külső jellemzőiket 5 pontos skálán értékeltem, ahol az 5-ös a kontroll állatokkal megegyező tulajdonságot jelentette (6. táblázat). Az értékelés szempontjai összhangban voltak az akut Se mérgezés tüneteivel, úgymint szőrzet elváltozása, fizikai aktivitás, széklet minősége.

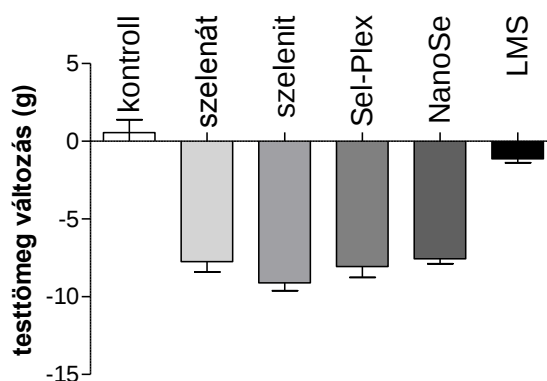
A szervetlen szelénformákat fogyasztó csoportok 2-3 nap alatt kedvetlenné, és fizikailag inaktívvá váltak. Szőrük fénytelen volt. Székletük a fiziológiás félkemény rizsszem alakúval ellentétben fekete, kenőcsös volt. Hasonló megfigyeléseim voltak a NanoSe-nel etetett csoportban is, bár emellett voltak normál székletű, némileg aktívabb egyedek is. Az említett 3 csoport közös jellemzője volt a görnyedt testtartás (mozgás közben is), ami hasi görcsökre, gasztrointesztinális panaszokra utalhat. A szerves Sel-Plexet és LMS-t fogyasztó állatok szőre, fizikai aktivitása és széklete nem tért el a kontroll csoporttól.

50 ppm	szőr	fizikai aktivitás	széklet
<i>szelenát</i>	5/2	5/1	fekete, kenőcsös
<i>szelenit</i>	5/3	5/1	fekete, kenőcsös
<i>Sel-Plex</i>	5/5	5/5	normál
<i>NanoSe</i>	5/5	5/3 ; 5/2	normál és fekete kenőcsös
<i>LactoMicroSel</i>	5/5	5/5	normál

6. táblázat: 50 ppm koncentrációjú szelénkészítményekkel etetett állatok szőrének, fizikai aktivitásának és székletminőségének értékelése 5 pontos skálán

5.2.1.3. Testtömeg

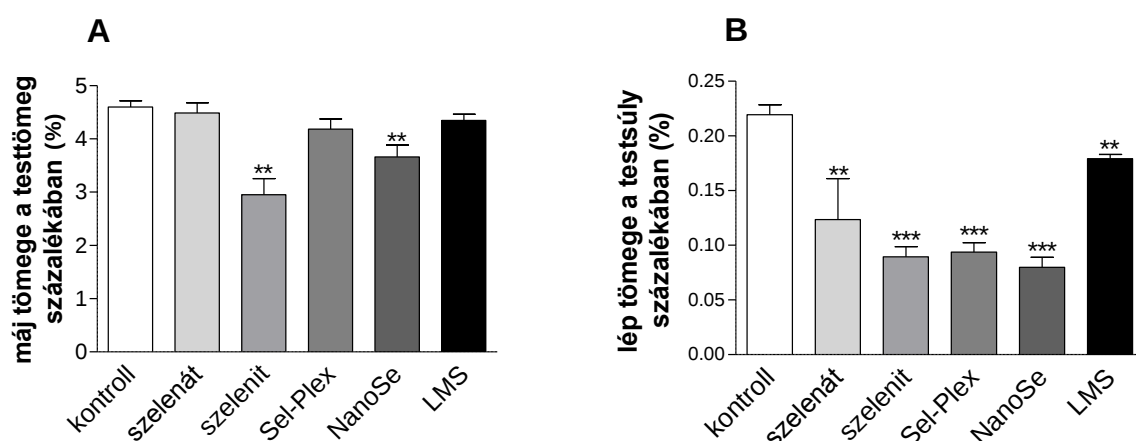
Az átlagos kiindulási testtömeg 27g volt. A toxicitás legszembetűnőbb következménye a testtömeg-csökkenés, melyet mindegyik csoportban tapasztaltam. A fogyás mértéke az alábbiak szerint alakult: szelenát 8g (30%), szelenit 9g (33%), Sel-Plex 8,5 g (31%), NanoSe 7,5g (28%) és LMS 1,2g (4%). A fentiekből látható, hogy a LMS még extrémén toxikus dózisban sem okozott jelentős testtömeg-csökkenést (12. ábra).



12. ábra: 50 ppm koncentrációjú szelénkészítmények hatására kialakuló testtömeg-csökkenés egerekben. (LMS=LactoMicroSel®; n=6 valamennyi csoportban)

5.2.1.4. Szervek tömege

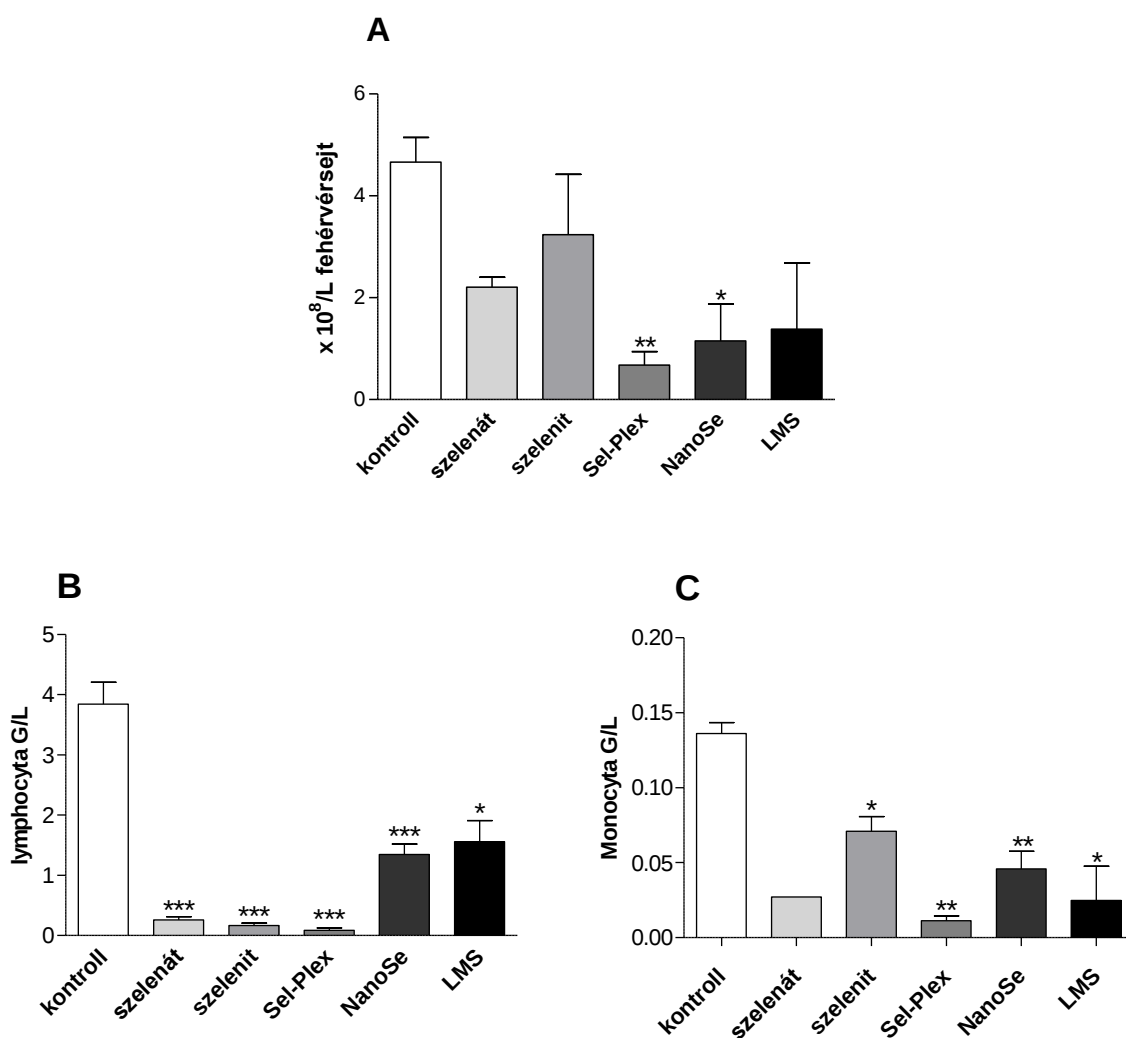
A toxicitás jellemző makroszkópos tünete lehet a szervek tömegének változása, mely utal az adott szerv károsodására. Tömegüket a testtömeg százalékában adtam meg. A *máj* tömegének csökkenését tapasztaltam 50 ppm szelenit és NanoSe esetében (13A ábra). A *lép* károsodása mindegyik csoportban jelentős volt ($p < 0,001$). A szelenát 44%-os, a szelenit 59%-os, a Sel-Plex 57%-os, a NanoSe 69%-os léptömeg-csökkenést eredményezett. A legenyhébb károsító hatása a LMS-nek volt (-19%; $p < 0,05$) (13B ábra). A *vesék* tömegében nem tapasztaltam változást a kontrollhoz képest (nem ábrázoltam diagramon).



13. ábra: 50 ppm szelénkészítmények hatása a máj-(A) és léptömegekre (B).
(LMS=LactoMicroSel®; n=6 valamennyi csoportban; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

5.2.1.5. Fehérvérszám

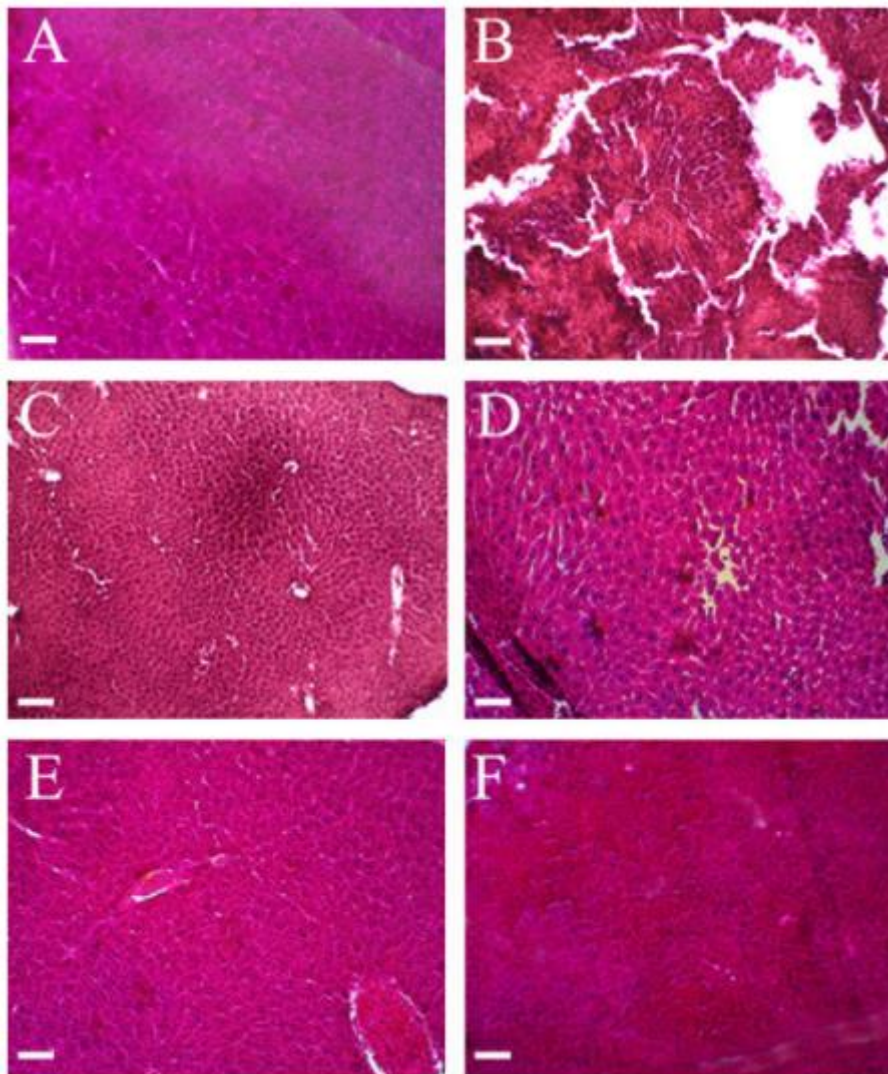
Toxikus dózisban adagolt szelénkészítmények hatására az össz fehérvérszám drasztikusan csökkent (14A ábra). A legsérülékenyebbek a lymphocyták (14B ábra) és a monocyták (14C ábra) bizonyultak. A vizsgált szelénkészítmények közül a legkisebb mértékű sejtpusztulást a LMS okozta.



14. ábra: Toxikus mennyiségű (50 ppm) szelén hatása a fehérvérszámra (A), abszolút lymphocytá számra (B) és abszolút monocytá számra (C). (LMS=LactoMicroSel®; n=6 valamennyi csoportban; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

5.2.1.6. Máj hisztopatológia

A kontroll máj szövettani képe egybefüggő, a szövet folytonos (15A ábra). Ezzel ellentétben 50 ppm koncentrációjú szelénkészítmények hatására ez a folytonosság, ill. a sejtek közötti kapcsolat megszakadt, kisebb-nagyobb sejtmentes területek keletkeztek. A károsodás mértéke a szelenát esetében volt a legnagyobb (15B ábra), majd ezt követte a szelenit (15C ábra). Sel-Plex kezelést követően a szövet pórusos jellegűvé vált a sejtek közötti apró megszakítások miatt (15D ábra). NanoSe hatására kevés nagyobb sejtmentes terület alakult ki (15E ábra), míg a LMS esetében a kontrollhoz hasonló szövettani képet láttam (15F ábra).

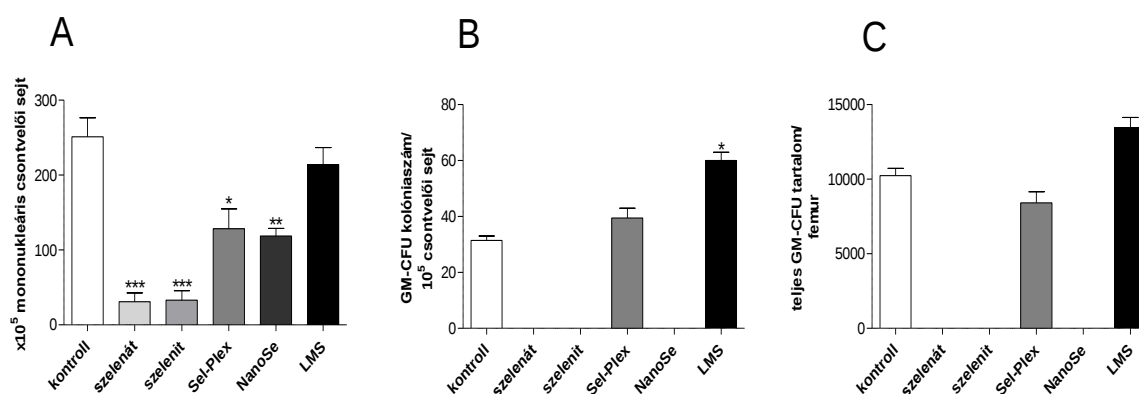


15. ábra: Májszövet hisztológiai képe toxikus mennyiségű (50 ppm) szelén adagolását követően. kontroll májszövet (A), szelenát (B), szelenit (C), Sel-Plex (D), NanoSe (E), LactoMicroSel® (F). 10x nagyítás, hematoxin-eozin festés. Lépték: 50µm.

A metszetek készítése Dr. Nagy Gábor és mtsai közreműködésével zajlott.

5.2.1.7. Csontvelői működésre gyakorolt hatások

A toxikus dózisú Se-készítmények a csontvelőben is súlyos károsodást okoztak (16A ábra). Legjelentősebb sejtpusztulást a szervetlen vegyületeknél (szelenát és szelenit) tapasztaltam (88-90%), majd ezt követte 55 %-kal a NanoSe, és 50%-kal a Sel-Plex. A legkíméletesebbnek a LMS bizonyult (20%-os csökkenés). A femur GM-CFU tartalmára vonatkozóan hiányosak az eredményeim (16B és C), ugyanis a szervetlen szelénkészítmények esetében olyan kevés GM-CFU progenitor sejt volt jelen a csontvelőben, hogy a tenyésztés sikertelen volt. Ezzel ellentétben a Sel-Plex-et fogyasztó csoportban a kontrollal megegyező értékeket kaptam, a LMS pedig kis mértékben meg is haladta azt.

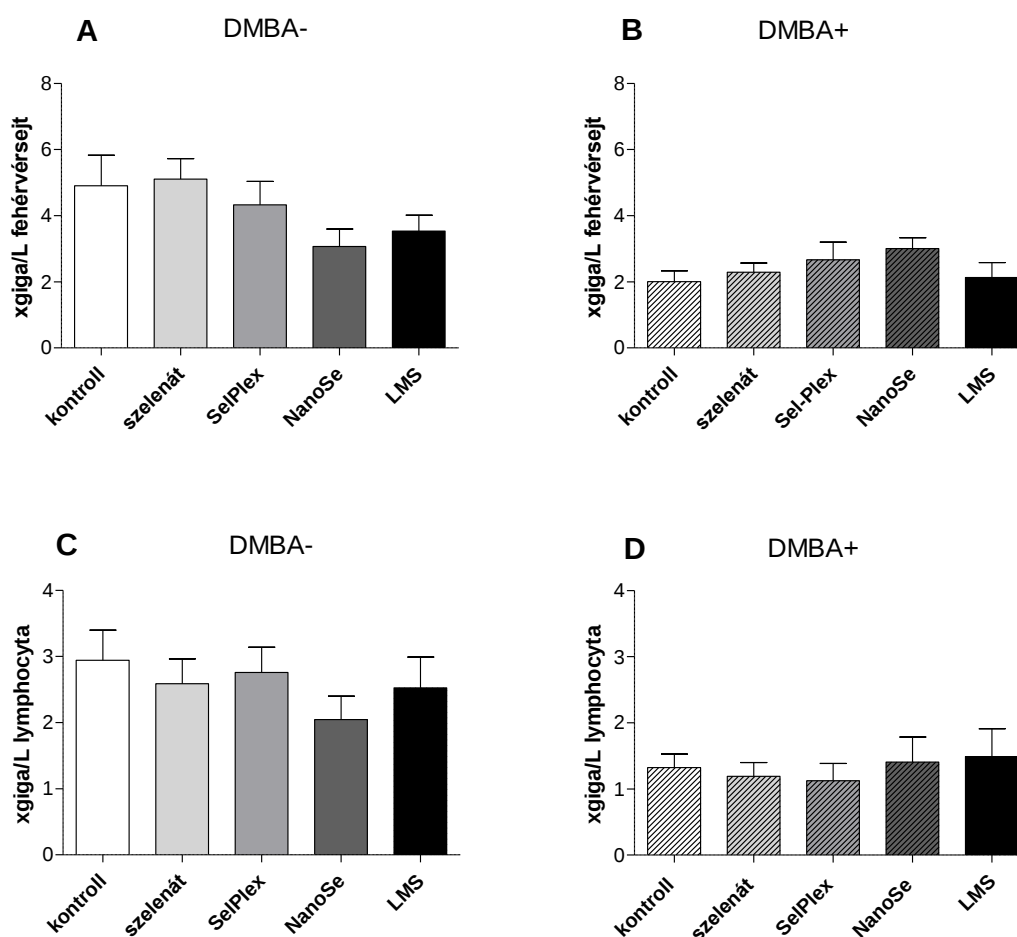


16. ábra: Toxikus mennyiségű (50 ppm) szelén hatása a csontvelői cellularitásra (A), a GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságára (B) és a teljes femorális GM-CFU tartalomra (C). (LMS=LactoMicroSel®; n=6 valamennyi csoportban; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

5.2.2. Hatástani vizsgálatok

5.2.2.1. Vér paraméterek

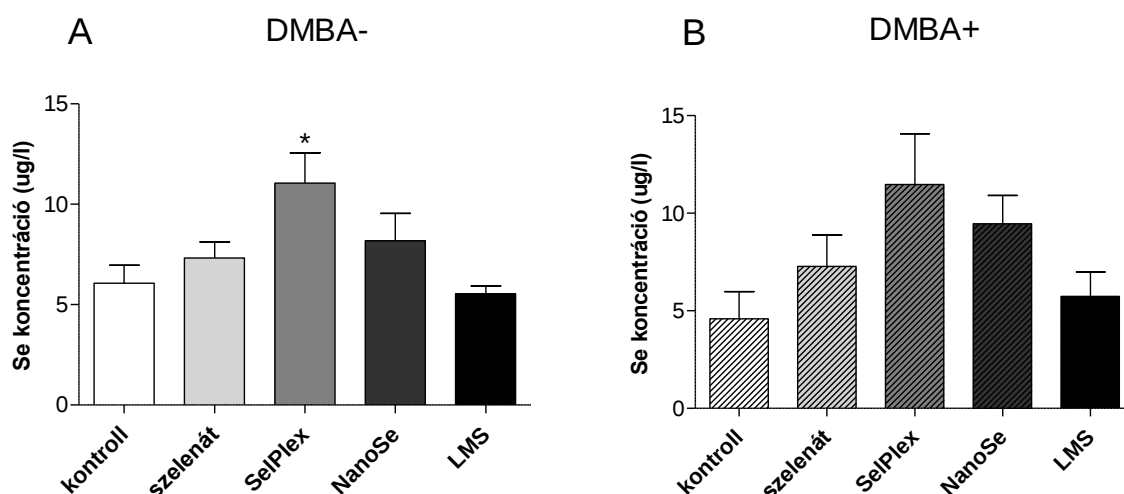
A fehérvérsejtszám tekintetében nem adódtak szignifikáns különbségek a csoportok között (17A ábra). A csoporton belül előfordultak nagy szórási értékek, de a nagy eltérések ellenére is az egyes állatok fehérvérsejt számai a normál tartományban mozogtak. DMBA hatására mérsékelt sejtpusztulást láthattam (17B ábra), az egyes szelénkészítmények között nem adódtak statisztikai különbségek. A fehérvérsejtek közül a lymphocyták voltak a legérzékenyebbek a DMBA-kezelésre, a szelénkészítmények preventív hatása e tekintetben nem mutatkozott (17C és D ábra).



17. ábra: Szelénkészítmények (5 ppm) hatása a fehérvérsejtszámra (A és B) és az abszolút lymphocytá számra (C és D) fiziológiás körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, LMS=LactoMicroSel®, n=5 valamennyi csoportban). A mérés Dr. Miszti-Blasius Kornél és mtsai közreműködésével zajlott.

5.2.2.2. Plazma Se-koncentrációjának meghatározása

Az összes szelénkészítmény jó hatásfokkal szívódott fel. A legmagasabb plazmakoncentrációt a szerves Sel-Plex érte el. (18A ábra). A többi csoportban statisztikailag értékelhető különbség nem adódott. A DMBA-kezelés nem befolyásolta az egyes szelénkészítmények felszívódását. (18B ábra). A plazma Se- koncentrációjából az egyes készítmények biológiai hasznosulására nehéz lenne következtetni, ennek pontos megállapításához további farmakokinetikai ismeretek szükségesek.



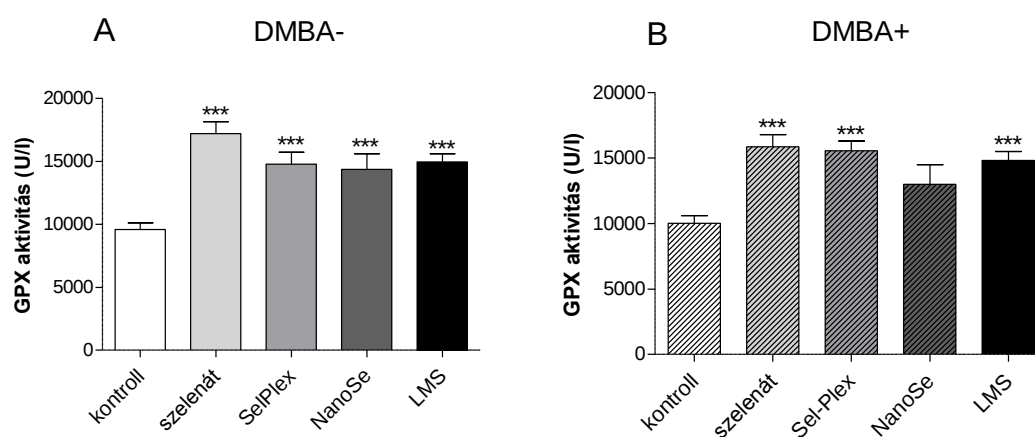
18. ábra: Szelénkészítmények hatása (5 ppm) a plazma Se-koncentrációjára fiziológiás körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, LMS=LactoMicroSel®, n=5 valamennyi csoportban, * $p < 0,05$).

A mérés Baranyai Edina és a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék mtsai közreműködésével zajlott.

5.2.2.3. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások fízológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

A GPx enzimek az antioxidáns védekezés fő komponensei. Aktivitásuk hűen reprezentálja az állat antioxidáns státuszát. Az enzim aktív centrumában Se helyezkedik el, melynek hiányában az enzim képtelen eliminálni a szabadgyököket. A vérben található GPx-ok aktivitása Se adagolásával növelhető, illetve maximalizálható.

Kísérleteimben az összes szelénkészítmény hatásosan ($p < 0,001$) emelte a GPx aktivitást a kontrollhoz képest mind fízológias körülmények között (19A ábra), mind pedig oxidatív stressznek kitett állatokban (19B ábra). Az egyes csoportok között nem tapasztaltam szignifikáns különbséget. A DMBA-kezelés nem befolyásolta a GPx aktivitását, a kezeletlen és a kezelt csoportban is hasonló értékeket kaptam.



19. ábra: Szelénkészítmények hatása (5 ppm) a glutathion-peroxidáz aktivitására fízológias körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, LMS=LactoMicroSel®, $n=5$ valamennyi csoportban, *** $p < 0,001$)

5.2.2.4. Csontvelői működésre gyakorolt hatások fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

5.2.2.4.1. Csontvelői cellularitás

Fiziológiás körülmények között a szelénkészítmények nincsenek hatással a csontvelői sejtek számára, az egyes csoportok között sem kaptam statisztikailag értékelhető különbséget, a cellularitás az normál tartományon belül mozgott (20A ábra).

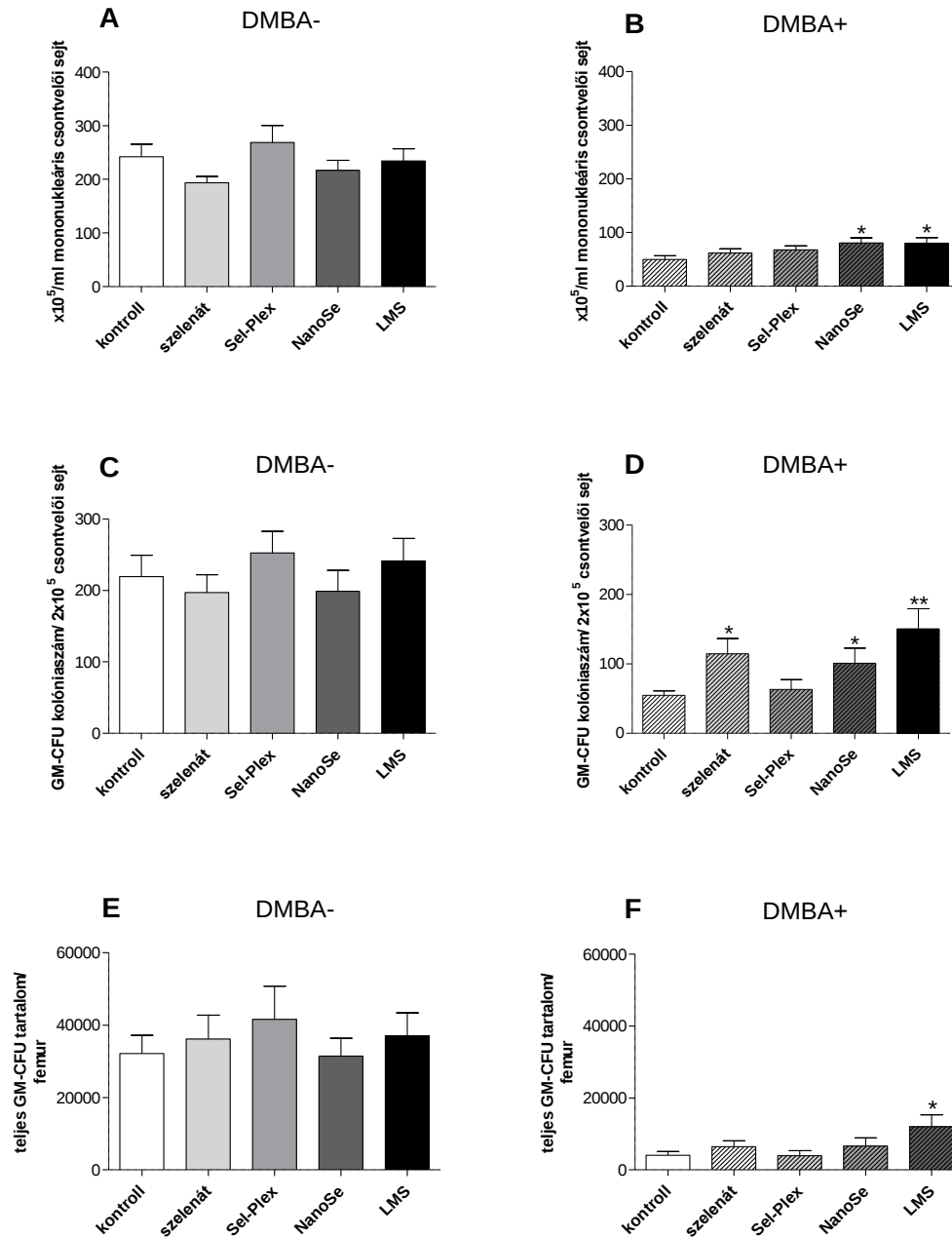
A DMBA-kezelés jelentős sejtpusztulást eredményezett minden csoportban. A NanoSe és a LMS védő hatása ezen a területen is érvényesült, ugyanis ezen csoportokban a kontrollhoz képest magasabb sejtszámokat kaptam (20B ábra).

5.2.2.4.2. GM-CFU kolóniák előfordulási gyakorisága

Ahogy az össz csontvelői sejtszámot, úgy a GM-CFU progenitorok számát sem befolyásolja a Se szupplementáció normál körülmények között (20C ábra). Oxidatív stressz állapotában a GM-CFU progenitorok pusztulása gátat vet a hatékony sejtregenerációnak, és az érett fehérvérsejtek pótlásának. Általánosságban elmondható, hogy a Se szupplementáció fokozta a csontvelő regenerációs képességeit. E tekintetben a LMS különösen hatásosnak bizonyult, a kinőtt kolóniák száma megközelítette a kezeletlen (DMBA-) csoportok értékeit (20D ábra)

5.2.2.4.3. A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma

Az előzőekből adódóan a femur teljes GM-CFU tartalmára sem voltak hatással a szelénkészítmények fiziológiás körülmények között (20E ábra). A DMBA-kezelés hatására kialakuló regenerációs potenciál-csökkenés mérséklésére csak a LMS volt képes ($p < 0,05$) (20F ábra).



20. ábra: Szelénkészítmények hatásai (5 ppm) a csontvelői cellularitásra (A és B), a GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságára (C és D) és a teljes femorális GM-CFU tartalomra (E és F) fiziológias körülmények között (DMBA-) és oxidatív stressznek kitett állatokban (DMBA+). (DMBA=7,12-dimetil-benzantracén, LMS=LactoMicroSel®, n=10 valamennyi csoportban, *p<0,05; **p<0,01)

6. MEGBESZÉLÉS

Az urbanizáció okozta környezeti változások súlyos terheket rónak szervezetünkre. Megváltozott életmódunk, életkörülményeink számos új betegséget is hoztak magukkal. A 21. század embere számára a legfenyegetőbb veszélyt az oxidatív stressz jelenti. A kipufogógázokkal, cigarettafüsttel, gyárkémények füstjével szennyezett városi levegő, ionizáló és röntgensugárzás, peszticidek, egyéb vegyszerek, gyógyszerek nagymértékben hozzájárulnak ahhoz, hogy a szervezetben túlsúlyba kerüljenek a szabadgyökképző folyamatok, és oxidatív stressz alakuljon ki. A párosítatlan elektronnal rendelkező szabadgyökök rendkívül reaktívak, reakcióba lépnek a szervezet bármely szabad elektronnal rendelkező molekulájával. A reakció révén károsodik vagy kiesik a makromolekulák funkciója (DNS-lánctörések, membránkárosodások, enzimek funkcióvesztése). A kórállapot veszélyessége abban rejlik, hogy a környezeti expozíció a városi ember számára gyakorlatilag elkerülhetetlen, kialakulása pedig mindaddig észrevétlen marad, amíg testi tüneteket nem produkál. Kísérletek támasztják alá, hogy az oxidatív stressz is lehet kiváltó oka a magas mortalitási rátájú betegségeknek, úgymint kardiovaszkuláris megbetegedések, daganatok, diabetes mellitus, neurodegeneratív kórképek. Emellett közrejátszik az elhízás és öregedés folyamatában is. *Caenorhabditis elegans*-szal végzett kutatások során bebizonyosodott, hogy az antioxidánsokban (alma- és gyógynövény kivonatok) gazdag tápközegekben tartott fonálférgek élettartama –az oxidatív stressz mérséklésének köszönhetően- megnőtt a kontroll párjaikhoz képest (Vayndorf és mtsai 2013, Moriwaki és mtsai 2013)

Habár a környezetünkön nem tudunk változtatni, életmódunk és étrendünk módosításával nagymértékben hozzájárulhatunk primer védelmi rendszerünk támogatásához. Szervezetünk antioxidánsai a táplálék antioxidáns molekuláival karöltve semlegesítik a szabadgyököket. Elektronodonáció révén megszüntetik instabil állapotukat, és neutrális végtermékeket produkálnak. A változatos, antioxidánsokban gazdag étrend biztosítja szervezetünk oxidáns termelő/elimináló rendszerének fiziológias egyensúlyát.

A Se egy esszenciális mikroelem, mely a legjelentősebb antioxidáns enzim, a glutathion-peroxidáz aktív komponenseként részt vesz a szabadgyökök eliminálásában. Elégtelen Se bevitel esetén az enzim működésképtelenné válik. A folyamat reverzibilis, Se adagolásával (akár táplálék, akár étrend-kiegészítő formájában) aktivitása növelhető, illetve maximalizálható.

Magyarország talajai többnyire Se hiányosak, emiatt sok esetben a növényi és állati eredetű élelmiszereink sem tartalmazzak megfelelő mennyiségű Se-t. A Se hiány súlyos következményeire való tekintettel nagy hangsúlyt kapnak a hatékony szelénpótlásra való törekvések. Az eddigi készítmények szervetlen vagy szerves Se-t tartalmaztak, melyek optimális dózistartománya szűk, ezáltal fennáll a túladagolás veszélye.

Kutatómunkám során olyan termékeket kerestem, melyek potenciálisan alkalmasak az ajánlott dózisú Se bevitelére, ugyanakkor alkalmazásuk kisebb kockázattal jár, mint a jelenleg forgalomban lévő készítmények.

6.1. Szelénnel dúsított bárányhús

A bárányhús főképp a mediterrán étrendek részét képezi, hazánkban méltánytalanul népszerűtlen. Okai részben a szokásokra, részben a minőségi bárányhús költséges beszerzésére vezethetők vissza. Továbbá a köztudatban is elterjedt, hogy a vörös húsok rendszeres, nagy mennyiségű fogyasztása a kardiovaszkuláris megbetegedések és gasztrointesztinális daganatok rizikófaktorát jelentik (*Sinha és mtsai 2009*). Azzal viszont már kevesebben vannak tisztában, hogy a bárányhús igen értékes fehérjeforrás, valamint olyan esszenciális tápanyagokat tartalmaz, melyek nélkülözhetetlen elemei az egészséges és kiegyensúlyozott táplálkozásnak. Ásványi anyagok közül nagy mennyiségben tartalmaz vasat, cinket, szelént és mangánt, továbbá kiváló forrásai az E vitaminnak, B-vitaminoknak és karotinoknak (*Cabrera és mtsai 2014*). Zsír-, PUFA és CLA tartalma nagymértékben függ az állat takarmányozásától, a geográfiai tényezőktől, valamint az egyes testtájak zsír-összetétele is eltérő mintázatot mutat (*Díaz és mtsai 2005*). A fentieket figyelembe véve érdemes újra átgondolnunk a vörös húsokról alkotott ítéleteket, és a hangsúlyt a mértékletességre és változatosságra helyezni (*Binnie és mtsai 2014*).

Vizsgálataim során a bárányhús minőségének javítását már meglévő előnyös tulajdonságának fokozásával kívántam elérni. A bárányhús jó Se forrás, ám a Se mennyiségét szupplementáció révén tovább emelhetjük. Az állatok ivóvízbe keverve jutottak hozzá a mikroelemhez, és izomszöveteikben kumulálták azt. Atomfluoreszcens spektroszkópiával bebizonyosodott, hogy ily módon akár háromszorosára növelhető a hús Se tartalma (Se-nel dúsított: $0,86 \pm 0,09$; kontroll: $0,27 \pm 0,04$ mg/kg).

Az ivóvíz szupplementálásához „zöld technológiával” előállított nanopartikuláris elemi Se-t használtam, mely a szelénkészítmények legújabb irányvonalát képezik. A nanoméretű elemi

szeléngömböcskéket *Lactobacillus sp.* és *Streptococcus thermophilus* fajokkal termeltetik (Eszenyi és mtsai 2011)

6.2. Környezeti ártalmak okozta oxidatív stressz modellezése

A DMBA a policiklusos aromás szénhidrogének csoportjába tartozó vegyület, mely a környezetbe komplex szénhidrogének tökéletlen égése során kerül. Indirekt karcinogén, a szervezetbe jutó vegyület csak metabolikus aktiváción átesve válik karcinogénné. A metabolizácót a máj mikroszómáiban CYP450A1 enzim, a csontvelő sztróma sejtjeiben a CYP450B1 enzim végzi (Bhuvaneswari és mtsai 2004). A PAH-vegyületek első lépésben transz-dihidrodliollá alakulnak át, amelyből a továbbiakban két különböző toxikus végtermék keletkezik: 1. diol-epoxiddá hidrolizálódva a DNS lánchoz kötődnek, azzal irreverzibilis kötést alakítanak ki, és mutációkat okoznak. 2. aldo-keto reduktázok a transz-dihidrodliolt o-kinonokká alakítják, melyek képesek belépni a redox ciklusba, és nagy mennyiségű ROS képződését generálják (Hanzalova és mtsai 2010, Penning és mtsai 1996). A képződő két végtermék a DMBA-t egyaránt alkalmassá teszi daganatos megbetegedések, és oxidatív stressz modellezésére kísérletes körülmények között (Shi és mtsai 2011, Ember és mtsai 1998).

6.3. Szelénrel dúsított bárányhús egerek antioxidáns rendszerére gyakorolt hatásai

A szabadgyökök mértéktelen felszaporodása ellen a szervezetünk antioxidáns molekulái hatnak. Elég stabil molekulák ahhoz, hogy elektrondonáció révén neutralizálják a szabadgyököket. Az antioxidánsok egy része a szervezetben szintetizálódik (glutathion, húgysav, ubiquinol) míg mások csak táplálék útján vihetők be (E, C-vitamin, β -karotin). Antioxidánsok közé soroljuk azokat az enzimeket is, melyek a neutralizáló redoxi reakcióban közvetetten részt vesznek, illetőleg azokat, amelyek a szabadgyököket enzimatisz utón bontják ártalmatlan végtermékekre (glutathion-peroxidáz). Antioxidánsok ily módon betölthetnek gyökfogó, H-donor, elektrondonor, peroxid-bontó, enzim inhibitor, szinergista, fémkelátor... stb. funkció extra-, és intracellulárisan egyaránt (Lobo és mtsai 2010).

Számos vizsgálat igazolja, hogy antioxidáns molekulák per os bevitele növeli a szervezet antioxidáns kapacitását (Müller és mtsai 2015., Li és mtsai 2015, Yilmaz és mtsai 2004). Kísérleteim első szakaszában ezt a megoldást választottam az antioxidáns tulajdonságú Se bevitelére. Mind a normál bárányhús, mind a Se-dús bárányhús növelte az egerek antioxidáns kapacitását fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban egyaránt. Se-nel dúsított bárányhús esetében az emelkedés jelentősebb volt.

6.4. Szelénnel dúsított bárányhús fehérvérsejtekre gyakorolt hatása

A macrophagok nagy mennyiségű ROS-t termelnek, melyet a patogén mikroorganizmusok elpusztítására használnak fel. A szabadgyökök túlzott felszaporodása ellen az antioxidánsok hatnak. Ezen túlmenően ismeretes, hogy gyulladás esetén olyan nagy lokális koncentrációban lehetnek jelen ROS-ek, melyek már károsítják a macrophagokat. Ez ellen szintén az antioxidáns molekulák jelentenek védelmet.

A DMBA jelentősen csökkentette a fehérvérsejtek számát. Ez a megfigyelés összhangban áll más kutatók eredményeivel (*Galván és mtsai 2006.*) A legsérülékenyebb populációt a monocyták képezték, melyeknek közel 90%-a elpusztult. Érzékenységük alapja, hogy számos olyan DNS repair enzim hiányzik belőlük, amelyek más sejtekben megtalálhatók, így a szabadgyökök okozta DNS károsodás esetükben nagy valószínűséggel apoptózishoz vezet (*Bauer és mtsai 2011*). Neutrophil granulocyták körében a Se-dús bárányhús kifejezettebb protektív hatása érvényesült, vélhetően azért, mert a monocytákban az antioxidáns enzimek expressziója alacsonyabb, mint a neutrophilekben (*Carta és mtsai 2011*).

6.5. Szelénnel dúsított bárányhús csontvelői működésre gyakorolt hatásai

Irodalmi adatok szerint az antioxidánsok befolyással lehetnek a csontvelői sejtek proliferációjára. *Rimmelé és mtsai 2014* azt tapasztalták, hogy az ismerten antioxidáns tulajdonságú resveratrol *in vivo* adása az egerekben megemelte a csontvelői hemopoetikus őssejtek számát (HSC) és a multipotens progenitorok kapacitását, amelynek terápiás lehetősége van a hemopoetikus őssejteket érintő megbetegedésekben, valamint transzplantációt követően. Ennek kapcsán felvetődhet, hogy fiziológiás körülmények között esetlegesen rosszindulatú hematológiai elburjánzások rizikójával kell számolni, ez azonban még nem bizonyított. Kísérleteimben normál körülmények között sem a bárányhús sem a Se-dús bárányhús nem befolyásolta a csontvelői sejtszámot, viszont a GM-CFU progenitorok előfordulási gyakorisága Se-dús bárányhús fogyasztását követően emelkedett.

A sugárzás (UV-sugárzás, radioterápia), citosztatikumok és egyéb xenobiotikumok károsító hatásaival szemben az osztódó sejtek a legérzékenyebbek. A legsérülékenyebb populációt a progenitor sejtek képezik, melyek osztódási ideje a pluripotens őssejteknél rövidebb. A vérsejtek közül a neutrophil granulocyták töltik a legkevesebb időt a vérpályán, így utánpótlásuk nélkülözhetetlen az olykor életet veszélyeztető neutropéniás állapot kivédésében (*Benkő és mtsai 2003, 1999*).

A csontvelői progenitor sejtek NADPH-oxidázzal rendelkeznek, mely szabadgyököket termel. Míg a neutrophil granulocyták esetében ez a mikroorganizmusok elpusztítását szolgálja, addig a csontvelői progenitoroknál hipoxiás mikrokörnyezetet teremt, mely biztosítja a sejtek hosszútávú megújulását, és szerepet játszik a differenciációban is (*Piccoli és mtsai 2007, Urao és mtsai 2013*). A ROS azonban kétélű fegyverek, a fiziológiás mennyiséget meghaladva a progenitorok pusztulását idézik elő.

Vizsgálataim eredményei összhangban állnak azokkal a korábbi kísérletekkel, melyekben ip. DMBA oltást követő 48h múlva hypocellularitást tapasztaltak (*Heidel és mtsai 2000, Galván és mtsai 2006, Page és mtsai 2003*). A DMBA metabolizációját a csontvelőben a CYP1B1 enzim végzi. *N'jai és mtsai (2010)* a DMBA kezelést CYP1B1 null egereken is elvégezték, ekkor csontvelői sejtpusztulást nem tapasztaltak. A DMBA-okozta sejtpusztuláshoz tehát nem csak a szabadgyökök, hanem a DMBA lokális metabolizmusa során keletkező toxikus végtermékek is nagymértékben hozzájárulnak.

In vitro körülmények egér és humán csontvelői sejteken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a tápközeghez adott antioxidánsok kivédik a szabadgyökök károsító hatásait (*Hamid és mtsai 2014, Alves és mtsai 2013*). *In vivo* kísérleteimben a Se-dús bárányszűcs képes volt mérsékelni a csontvelőben a DMBA-okozta sejtpusztulást, mely mind az össz sejtszámban, mind pedig a GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságában megnyilvánult. A progenitor sejtekben az érett sejtekhez hasonlóan megtalálható a TRxR (*Ebert és mtsai 2006*), valamint a GPx1 (*Islam és mtsai 2014*), mely Se szupplementáció hatására fokozott antioxidáns védekezést tesz lehetővé.

6.6. LactoMicroSel®

Kísérleteim második szakaszában új technológiával előállított nanoszelén készítményt használtam. Az új LMS abban különbözik az eddigi nanopartikuláris szelénformáktól, hogy az elemi szeléngömböcskék nem kerülnek elválasztásra, a készítményben az elemi Se-en túl megtalálhatók a termelő baktériumok és a szerves tápközeg is (*Eszenyi és mtsai 2011*). Munkám során ismert szervetlen (szelenát, szelenit) és szerves szelénformákkal (Sel-Plex), valamint nanoszelénnel (NanoSe) hasonlítottam össze -toxikológiai és hatástani szempontokat figyelembe véve.

6.7. Vizsgált szelénkészítmények toxicitása

A National Institute of Health által meghatározott Se napi ajánlott dózis felnőtteknek 55 µg. Ez az a Se mennyiség, amely maximalizálja a GPx aktivitást. A legmagasabb tolerálható dózis (400 µg) ehhez közel esik, ami miatt az optimális koncentrációtartomány meglehetősen szűknek mondható. Irodalmi adatok alapján, illetve előzetes kalkulációt követően az egerek számára tolerálható mennyiségnek az 5 ppm, míg toxikus mennyiségnek az 50 ppm Se koncentrációt választottam.

Az 50 ppm Se tartalmú tápok fogyasztása során a túlélési mutatók a következők szerint alakultak: szelenát 33%, szelenit 67%, NanoSe 83%. A Sel-Plex-et és LMS-t fogyasztó állatok 100%-a túlélte a 2 hetes etetési periódust.

Az általános toxikológiai vizsgálatok eredményeit összegezve elmondható, hogy a két szervetlen Se vegyület az összes paraméter tekintetében toxikusabbnak bizonyult a többi vizsgált készítményhez képest. Máj-, vese-, lép- és testtömeg esetében a szelenit okozta a legjelentősebb csökkenést. A túlélést, test-és szervtömeg eredményeket egybevetve a szelénkészítmények csökkenő toxicitási sorrendjét az alábbiak szerint állítottam fel: szelenát > szelenit > NanoSe > Sel-Plex > LMS.

A fehérvérsejtek száma Se toxikózis fennállásakor drasztikus mértékben csökkent az összes csoportban. A legsérülékenyebbnek a lymphocyták és a monocyták bizonyultak. A vizsgált szelénkészítmények közül a legkisebb mértékű sejtpusztulást a LMS okozta.

A kontroll máj szövettani képe egybefüggő, a szövet folytonos. Ezzel ellentétben 50 ppm koncentrációjú szelénkészítmények hatására a folytonosság, ill. a sejtek közötti kapcsolat megszakadt, kisebb-nagyobb sejtmentes területek keletkeztek. A károsodás mértéke eltérő volt az egyes csoportokban. LMS esetében a kontrollhoz hasonló szövettani képet láttam. A mikroszkópiai vizsgálat alapján felállított toxicitási sorrend a következő: szelenát > szelenit > NanoSe > Sel-Plex > LMS.

Toxikus mennyiségű Se a csontvelői működést is negatívan befolyásolta. A mononukleáris csontvelői sejtek száma az összes csoportban jelentősen csökkent, kivéve a LMS -lel kezelt csoportokat, ahol szignifikáns eltérést nem tapasztaltam a kontrollhoz képest. A GM-CFU progenitorok számát illetően csak a Sel-Plex és LMS csoportban tudtam eredményeket prezentálni. Sejtpusztulást nem tapasztaltam, ellentétben a szervetlen formákkal, ahol az alacsony progenitor jelenlét miatt a tenyésztés sikertelen volt.

Jogosan merülhet fel a kérdés, hogy vajon nem azért bizonyult-e kevésbé toxikusnak a LMS, mert kevesebbet ettek belőle az állatok? A tápok tömegének, fogyásának mérése tisztázza a kérdést: a legkevesebbet (0,5g/egér/nap) a szelenittel szupplementált tápból fogyasztottak az állatok, majd ezt követte a szelenát (0,8g/egér/nap) > NanoSe (1g/egér/nap) > Sel-Plex (2,15g/egér/nap) > LMS (3,2 g/egér/nap). Az LMS-t tartalmazó tápból a kontrollal megegyező mennyiség fogyott naponta, ami arra utal, hogy az állatoknál nem jelentkeztek GI panaszok.

Az összehasonlító toxikológiai vizsgálataink alapján a legártalmasabbnak a szervetlen szelénvegyületek mutatkoztak. A NanoSe is csak a rangsor 3. helyén áll. A legkevésbé toxikus, ezáltal leginkább preferált készítmény a LMS volt.

A Se toxicitás molekuláris mechanizmusa kevésbé ismert. Annyi azonban bizonyosnak tűnik, hogy a központi szerepet a Se-vegyületek endogén tiol-csoportokkal alkotott interakciói játsszák. A szelenit (Se(IV)) katalitikusan oxidálja a szulfhidril csoportokat és –S-Se-S- kötést tartalmazó instabil közti termékek keletkezését generálja (*Nogueira és mtsai 2011*). Mi több, a Se-mediálta tiol-oxidáció nagy mennyiségű ROS-t termel, amely a Se toxicitását tovább fokozza (*Chen és mtsai 2007, Plano és mtsai 2010*).

Wang és mtsai 2007 kimutatták, hogy a selenometionin (SeMet) és a nano-méretű elemi Se kevésbé toxikus, mint a szelenit. Továbbá a szelenitet és NanoSe-t összehasonlító vizsgálatokból kiderült, hogy a nagydózisú szelenit gátolta a szuperoxid-dizmutázt és a glutathion redukcióját, ami súlyos oxidatív stressz kialakulásához vezetett. A májat szintén a két lokális antioxidáns enzim gátlása révén károsította. NanoSe esetében enzimgátlást, ezáltal májkárosodást nem tapasztaltak (*Zhang és mtsai 2005*). A szelenitet 7x toxikusabb vegyületnek titulálták (*Zhang és mtsai 2001*). *Wang és mtsai 2007* kísérleteiben a 20-60 nm méretű részecskéket tartalmazó nanoszelén toxicitása kisebb volt, mint a SeMet-nak. Az általam végzett kísérletekben a SeMet (Sel-Plex) -ezzel épp ellenkezően- kevésbé volt toxikus. A látszólagos ellentmondás oka a részecskék méretében keresendő. Az általam használt NanoSe 100-500 nm méretű gömböcskéket tartalmazott, míg *Wang* munkacsoportja 20-60 nm részecskékkal dolgozott. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a részecskék mérete egyenesen arányos a toxicitással, emellett a kisebb méretű szeléngömböcskék akkumulációja és kemopreventív hatása is jelentősebb (*Peng és mtsai 2007*).

6.8. Hatástani vizsgálatok

A Se szupplementáció a Se központú enzimek aktivitásának fokozásával járul hozzá az antioxidáns kapacitás növekedéséhez. Ennek igazolására az GPx aktivitását mértem. Normál körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban egyaránt emelkedett GPx aktivitást tapasztaltam a kontrollhoz képest. Az egyes szelénkészítmények hatásai között különbséget nem láttam. *Touat-Hamici és mtsai (2014)* szerint a szelenoproteinek fokozott expressziójának egyik kiváltó oka az oxidatív stressz, és feltétele az elegendő mennyiségű Se jelenléte.

A csontvelői paramétereket (cellularitást, GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságát és a femur teljes GM-CFU tartalmát) fiziológiás körülmények között nem befolyásolta a Se jelenléte, viszont oxidatív stressznek kitett állatokban a LMS egyértelműen protektívnek bizonyult a DMBA károsító hatásaival szemben. Érett fehérvérsejtek vizsgálatakor ez a protektív hatás nem nyilvánult meg. A legérzékenyebb populációt a lymphocyták képezték.

Kimutatható, hogy a Se által kiváltott hatás nemcsak dózis, hanem kémiai összetétel függvénye is (*Zeng és mtsai 2010*). Étrend-kiegészítőként egyaránt használnak szerves (SeMet, SeCys) és szervetlen (szelenát, szelenit) szelénformákat, melyek eltérő farmakokinetikai paraméterekkel rendelkeznek. A szelenoaminosavak karrier molekulák segítségével jutnak a sejtekbe, csaknem teljes mértékben felszívódnak *Gammelgaard és mtsai (2011)*. Kísérleteim alátámasztották ezt, a szerves Sel-Plex esetén tapasztaltuk a legmagasabb plazma Se-koncentrációt. A szelenát paracellulárisan, passzív diffúzióval abszorbeálódik, melynek hatékonysága valamelyest kisebb. Intracellulárisan mind a szervetlen, mind pedig a szerves formák szeleniddé redukálódnak, és proteinekbe épülnek (szelenoenzimek), de a SeMet emellett kompetitív módon a metionint helyettesítve képes más –nem Se központú- fehérjékbe is beépülni, ezáltal akkumulálódni a szervezetben (*Fairweather-Tait és mtsai 2010, Todd és mtsai 2012*).

Montgomery és mtsai (2012) kutatási eredményei szerint mind a szerves, mind a szervetlen szelénformák hatékonyan támogatták az immunrendszert lovakban, ám eltérő módon. A szervetlen Se stimulálja az IL-1 és IL-8 termelést a neutrophil granulocytákban, míg a szerves vegyületek az IL-5 és IL-1 expressziót lymphocytákban. A szerves vegyületek emellett a sperma minőségének javításában és motilitásuk fokozásában is hatékonyabbak (*Slowinska és mtsai 2011*).

Az új technológiával előállított SeNP-k biaktívabbnak bizonyultak *Sadeghian és mtsai (2011)* kísérleteiben, ahol a neutrophilek számának növelésével, túlélési mutatóinak és

aktivitásuk javításával támogatták az immunrendszert. Kísérleteimben a NanoSe nem bizonyult hatásosabbnak sem a szervetlen, sem a szerves készítményeknél, de ahogyan azt korábban tárgyaltam a hatás és a toxicitás mértéke az elemi szelénrészecskék méretének függvénye.

A LMS-t fogyasztó csoportban alacsony plazma Se-koncentrációt mértem, ugyanakkor a készítmény hatása legalább olyan jónak, ill. jobbnak bizonyult, mint a többi Se species. LMS tekintetében még nem rendelkezünk farmakokinetikai adatokkal, de hipotézisem szerint, mivel a Sel-Plex-hez hasonlóan szerves kötésekben tartalmazza a szelént, az LMS abszorpciója és disztribúciója egyaránt gyors és hatékony, valamint más szerves szelén vegyületekhez hasonlóan képes a sejtekben fehérjékbe épülve raktározódni.

7. KONKLÚZIÓ

Nagy mintaszámú geográfiai vizsgálat rávilágított arra, Magyarország talajai többnyire szelénben szegények, ebből kifolyólag a hazai növényi és állati eredetű élelmiszerek sem jelentenek kielégítő szelénforrást. Az étrend-kiegészítőként alkalmazott szelénkészítmények dozírozása gondos tervezést igényel, mert a szelén optimális dózistartománya szűk, így fennállhat a túladagolás veszélye.

Kísérletes munkám során munkacsoportommal olyan funkcionális élelmiszert illetve étrend-kiegészítőként alkalmazható szelénkészítményt vizsgáltam, melyek hatékonyan támogatják az immunrendszert az oxidatív stresszel szembeni védekezésben, ugyanakkor a toxicitás kockázata alacsony. Az általam vizsgált funkcionális élelmiszer a szelén és a bárányhús jótékony hatásait ötvözve növeli a szervezet ellenálló képességét, és a készítmény táplálék jellege miatt szelén túladagolással sem kell számolnunk. A LactoMicroSel® több tekintetben hatásosabbnak, ugyanakkor kevésbé toxikusnak bizonyult a forgalomban lévő vizsgált szelénkészítményeknél.

A szelénrel dúsított bárányhús és a kedvezőbb terápiás szélességű LactoMicroSel® készítmény új kapukat nyit meg a biztonságosabb szelénpótlás területén.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK

Szelénnel szupplementált bárányhús vizsgálata során nyert új eredmények és megállapítások:

- A per os bejuttatott nanopartikuláris szelénnel háromszorosára emelhető a bárányhús szelénkoncentrációja.
- Az elfogyasztott szelénnel szupplementált bárányhús hatásosan emelte az egerek teljes antioxidáns kapacitását.
- A szelénnel szupplementált bárányhúsnak protektív hatása van a DMBA-val indukált immunotoxicitással szemben, mely mind az érett fehérvérsejtek, mind pedig a csontvelői előalakok szintjén megnyilvánul. A granulopoézis regeneratív kapacitása 4x hatékonyabb az oxidatív stressznek kitett kontroll állatokéhoz képest.

Új nanopartikuláris szelénkészítmény (LactoMicroSel®) vizsgálata során az alábbi eredményeket értem el:

- A már forgalomban lévő, szelénpótlásra használt szelénkészítményekkel összevetve, a LactoMicroSel® bizonyult a legkevésbé toxikus szelénformának az általunk vizsgált összes általános toxikológiai paraméter tekintetében.
- A szelén specíesek tolerálható dózisa (5 ppm) hatásosan emelte a glutathion-peroxidáz aktivitását fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban egyaránt. Míg az érett fagocitákra és csontvelői előalakjaikra normál körülmények között nincs hatással, addig a DMBA-val kezelt állatokban a LactoMicroSel® protektív hatása figyelhető meg.

Kutatómunkám során olyan funkcionális élelmiszert és étrend-kiegészítőt vizsgáltam, mely hatásosan emeli a szervezet védekező képességét a szabadgyökökkel szemben, ugyanakkor a toxicitás veszélyeivel sem kell számolnunk. A szelénnel dúsított bárányhús és a kedvezőbb terápiás szélességű LactoMicroSel® készítmény új lehetőséget kínál a biztonságosabb szelénpótlás területén.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az oxidatív stressz számos súlyos megbetegedés (daganatok, kardiovaszkuláris megbetegedések) hátterében állhat. A szabadgyökök túlzott mértékű felszaporodása ellen a szervezet antioxidáns védelmi rendszere és a táplálékkal bevitt antioxidáns molekulák együttesen lépnek fel. A jelenleg kapható, antioxidáns hatású szelénkészítmények optimális dózistartománya szűk, így célul tűztem ki olyan funkcionális ételmisszer illetve étrend-kiegészítő előállítását, melyek biztonságosabb szelénpótlást tesznek lehetővé.

A per os bejuttatott nanopartikuláris szelén kumulálódik az izomszövetben, így módon háromszorosára emelhető a bárányszelén tartalma. Az elfogyasztott szeléndús bárányszelén hatására az egerek vérének antioxidáns kapacitása emelkedett, továbbá protektív hatást tapasztaltunk 7,12-dimetil-benzantracénnel (DMBA) indukált immunotoxicitással szemben, mely mind az érett fehérvérsejtek, mind a csontvelői előalakok szintjén megnyilvánult. A granulopoézis regeneratív kapacitása 4x hatékonyabb volt az oxidatív stressznek kitett kontroll állatokéhoz képest.

Ezt követően új technológiával előállított LactoMicroSel® (LMS) készítmény toxikológiai és hatástani összehasonlító vizsgálatát végeztem el már ismert szervetlen és szerves szelénkészítményekkel szemben. A LMS a nanoméretű elemi szelén részecskéken túlmenően tartalmazza az őket termelő baktériumokat és a szerves tápközeget is. Minden általam vizsgált általános toxikológiai paraméter (túlélés, testtömeg, szervtömeg, máj hisztopatológia, vérkép, csontvelőtoxicitás) tekintetében a LMS bizonyult a legkevésbé toxikus készítménynek. Az eredményeket összegezve a következő csökkenő toxicitási sorrend állítható fel: szelenát $\geq$ szelenit > NanoSe > Sel-Plex > LMS.

A szelén speciesek tolerálható dózisa (5 ppm) emelte az antioxidáns hatású glutathion-peroxidáz enzim aktivitását fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban egyaránt. Míg az érett fagocitákra és csontvelői előalakjaikra normál körülmények között nem voltak hatással, addig a DMBA-val kezelt állatokban a LMS protektív hatását figyeltem meg.

Kutatómunkám eredményeit összegezve azt mondhatom, hogy olyan funkcionális ételmisszert és étrend-kiegészítőt vizsgáltam, amelyek hatásosan növelik a szervezet szabadgyökökkel szembeni védekezőképességét, ugyanakkor a szeléntúladagolás veszélyeivel sem kell számolnunk. A szelénrel dúsított bárányszelén és a szélesebb optimális dózistartománnyal rendelkező LactoMicroSel® készítmény új kapukat nyit meg a biztonságosabb szelénpótlás területén.

10. SUMMARY

Oxidative stress correlates with development of many diseases leading mortality lists worldwide – like cardiovascular and malignant diseases. Endogenous antioxidant defense mechanisms, supported by exogenous sources of antioxidant materials, limit and counterbalance the effects of free radicals. The therapeutic window of current selenium compounds is really narrow, so our aim was to produce a functional food and dietary supplement, which provide an opportunity to safer selenium supplementation.

The normally high selenium concentration of lamb meat was further increased (three times) by nanoparticle selenium supplementation and a dose-dependent increase in antioxidant capacity of blood was observed. Selenium-enriched lamb meat also protected against DMBA immunotoxicity, twice as high number of white blood cells, among them three times more phagocytes, survived. Similarly, in bone marrow twice more cells survived and the regenerative capacity of granulopoiesis was four times higher than in control DMBA-damaged mice.

Next the new LactoMicroSel® (LMS) product was compared to current organic and inorganic compounds on aspects of toxicological and physiological effects. LMS produced by lactic acid bacteria and contained not only nano-sized elemental selenium but also bacteria and organic microenvironment as well. In all the studied general toxicological parameter (survival, body and organ mass, liver histopathology, hematology and myelotoxicity) LMS was the less toxic compound. Toxicity of Se species decreased in the following order: selenate $\geq$ selenite $>$ NanoSe $>$ Sel-Plex $>$ LMS.

The administration of tolerable Se doses (5 ppm) increased the activity of antioxidant glutathione-peroxidase enzyme under physiological and oxidative circumstances. While there was no effect on mature phagocytes and their progenitors in bone marrow under normal circumstances, significant protective effect of LMS was observed in DMBA-treated animals.

To summarize the results, a functional food and a dietary supplement was produced which effectively support the antioxidant defense system against free radicals with a lower risk of selenium overdose. The selenium-enriched lamb meat and LactoMicroSel® with wider therapeutic window means new opportunity for safer selenium supplementation.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdul Hamid, Z., Lin Lin, W. H., Abdalla, B. J., Bee Yuen, O., Latif, E. S., Mohamed, J., Rajab, N. F., Paik Wah, C., Wak Harto, M. K., & Budin, S. B. (2014). The role of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle) in maintenance of ex vivo murine bone marrow-derived hematopoietic stem cells. *ScientificWorldJournal*, 2014, 258192.
2. Abdullaev, I. I., Asadullaev, T. B., & Abdullaev, F. I. (1988). [Effect of sodium selenite and its combination with remantadine on the synthesis of virus-specific polypeptides in a cell culture infected with influenza A virus]. *Vopr Virusol*, 33(6), 676-680.
3. Alasfar, F., Ben-Nakhi, M., Khoursheed, M., Kehinde, E. O., & Alsaleh, M. (2011). Selenium is significantly depleted among morbidly obese female patients seeking bariatric surgery. *Obes Surg*, 21(11), 1710-1713.
4. Alves, H., Mentink, A., Le, B., van Blitterswijk, C. A., & de Boer, J. (2013). Effect of antioxidant supplementation on the total yield, oxidative stress levels, and multipotency of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A*, 19(7-8), 928-937.
5. Atakan, A., Macunluoglu, B., Kaya, Y., Ari, E., Demir, H., Asicioglu, E., & Kaspar, C. (2013). Decreased serum selenium levels are correlated with diminished coronary flow reserve among hemodialysis patients. *Biol Trace Elem Res*, 155(3), 333-338.
6. Basu, S., Michaëlsson, K., Olofsson, H., Johansson, S., & Melhus, H. (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1), 275-279.
7. Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D., & Kaina, B. (2011). Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(52), 21105-21110.
8. Benko, I., Djazayeri, K., Abrahám, C., Zsuga, J., & Szilvássy, Z. (2003). Rosiglitazone-induced protection against myelotoxicity produced by 5-fluorouracil. *Eur J Pharmacol*, 477(2), 179-182.
9. Benko, I., Hernádi, F., Megyeri, A., Kiss, A., Somogyi, G., Tegyei, Z., Kraicsovits, F., & Kovács, P. (1999). Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *J Antimicrob Chemother*, 43(5), 675-681.

10. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 299, 15-27.
11. Bhuvaneswari, V., Velmurugan, B., Abraham, S. K., & Nagini, S. (2004). Tomato and garlic by gavage modulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Braz J Med Biol Res*, 37(7), 1029-1034.
12. Binnie, M. A., Barlow, K., Johnson, V., & Harrison, C. (2014). Red meats: time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat Sci*, 98(3), 445-451.
13. Borek, C. (1993). Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environ Health Perspect*, 101 Suppl 3, 237-245.
14. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3289-3303.
15. Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15(4), 186-190.
16. Cabrera, M. C., & Saadoun, A. (2014). An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. *Meat Sci*, 98(3), 435-444.
17. Carlson, B. A., Yoo, M. H., Tobe, R., Mueller, C., Naranjo-Suarez, S., Hoffmann, V. J., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L. (2012). Thioredoxin reductase 1 protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via control of cellular redox homeostasis. *Carcinogenesis*, 33(9), 1806-1813.
18. Carta, S., Tassi, S., Pettinati, I., Delfino, L., Dinarello, C. A., & Rubartelli, A. (2011). The rate of interleukin-1 β secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to Toll-like receptor triggering. *J Biol Chem*, 286(31), 27069-27080.
19. Cermelli, C., Vinceti, M., Scaltriti, E., Bazzani, E., Beretti, F., Vivoli, G., & Portolani, M. (2002). Selenite inhibition of Coxsackie virus B5 replication: implications on the etiology of Keshan disease. *J Trace Elem Med Biol*, 16(1), 41-46.
20. Chen, J. J., Boylan, L. M., Wu, C. K., & Spallholz, J. E. (2007). Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors*, 31(1), 55-66.

21. Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Leshner, J. L., Park, H. K., Sanders, B. B., Smith, C. L., & Taylor, J. R. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 276(24), 1957-1963.
22. Cominetti, C., de Bortoli, M. C., Garrido, A. B., & Cozzolino, S. M. (2012). Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res*, 32(6), 403-407.
23. Combs GF Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr*. 2001 May;85(5):517-47.
24. Cser, M. A., Sziklai-László, I., Menzel, H., & Lombeck, I. (1996). Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children. *J Trace Elem Med Biol*, 10(3), 167-173.
25. Díaz, M. T., Alvarez, I., De la Fuente, J., Sañudo, C., Campo, M. M., Oliver, M. A., Font I Furnols, M., Montossi, F., San Julián, R., Nute, G. R., & Cañeque, V. (2005). Fatty acid composition of meat from typical lamb production systems of Spain, United Kingdom, Germany and Uruguay. *Meat Sci*, 71(2), 256-263.
26. Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. and Roberfroid, M.B. (1999), "Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document", British Journal of Nutrition, Vol. 81, pp. S1-S27.
27. Ebert, R., Ulmer, M., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Stopper, H., Schupp, N., Kassem, M., & Jakob, F. (2006). Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells*, 24(5), 1226-1235.
28. Ember, I., Kiss, I., & Pusztai, Z. (1998). Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on onco/suppressor gene action in vivo: a short-term experiment. *Anticancer Res*, 18(1A), 445-447.
29. Eszenyi, P., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J. 2011. Elemental, nano-Sized (100-500 nm) selenium production by probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol. 1, No. 2, July 2011
30. Eszenyi, P., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J. 2011. Production of Lactomicrosel® and nanosize (100-500 NM) selenium spheres by probiotic lactic acid bacteria. International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE vol.9 (2011) © (2011)IACSIT Press, Singapore
31. Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., & Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*, 91(5), 1484S-1491S.

32. Fernandes, A. P., & Gandin, V. (2014). Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochim Biophys Acta*.
33. Florian, S., Krehl, S., Loewinger, M., Kipp, A., Banning, A., Esworthy, S., Chu, F. F., & Brigelius-Flohé, R. (2010). Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1694-1702.
34. Fujiwara, N., Fujii, T., Fujii, J., & Taniguchi, N. (1999). Functional expression of rat thioredoxin reductase: selenocysteine insertion sequence element is essential for the active enzyme. *Biochem J*, 340 (Pt 2), 439-444.
35. Galván, N., Page, T. J., Czuprynski, C. J., & Jefcoate, C. R. (2006). Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 213(2), 105-116.
36. Gammelgaard, B., Jackson, M. I., & Gabel-Jensen, C. (2011). Surveying selenium speciation from soil to cell--forms and transformations. *Anal Bioanal Chem*, 399(5), 1743-1763.
37. Gondi, F., Pantó, G., Fehér, J., Bogye, G., & Alfthan, G. (1992). Selenium in Hungary. The rock-soil-human system. *Biol Trace Elem Res*, 35(3), 299-306.
38. Greenwood, N.N and Earnshaw, A. Chemistry of the elements. 1994. Pergamon Press Ltd. Oxford
39. Hanzalova, K., Rossner, P., & Sram, R. J. (2010). Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. *Mutat Res*, 696(2), 114-121.
40. Heidel, S. M., MacWilliams, P. S., Baird, W. M., Dashwood, W. M., Buters, J. T., Gonzalez, F. J., Larsen, M. C., Czuprynski, C. J., & Jefcoate, C. R. (2000). Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res*, 60(13), 3454-3460.
41. Higgs J. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11: 85-95.
42. Hill, K. E., McCollum, G. W., Boeglin, M. E., & Burk, R. F. (1997). Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, 234(2), 293-295.
43. Hill, K. E., Motley, A. K., Winfrey, V. P., & Burk, R. F. (2014). Selenoprotein P is the major selenium transport protein in mouse milk. *PLoS One*, 9(7), e103486.
44. Hoffmann M., Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F., 2010. Functional food of animal origin. Meat and meat products. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 5, #63.

45. Holben, D. H., & Smith, A. M. (1999). The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc*, 99(7), 836-843.
46. Huang, Z., Rose, A. H., & Hoffmann, P. R. (2012). The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 16(7), 705-743.
47. Ikehata, H., & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*, 52(2), 115-125.
48. Islam, M. S., Stemig, M. E., Takahashi, Y., & Hui, S. K. (2014). Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells. *J Radiat Res*.
49. Katan, M. B. (1999). Functional foods. *Lancet*, 354(9181), 794.
50. Kim, J. E., Choi, S. I., Lee, H. R., Hwang, I. S., Lee, Y. J., An, B. S., Lee, S. H., Kim, H. J., Kang, B. C., & Hwang, D. Y. (2012). Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLETF rats via induction of fatty acid β -oxidation. *Biol Trace Elem Res*, 150(1-3), 360-370.
51. Kitts, D. D., Chen, X. M., & Broda, P. (2012). Polyaromatic hydrocarbons of smoked cured muscle foods prepared by Canadian Tl'azt'en and Llheidli T'enneh First Nation communities. *J Toxicol Environ Health A*, 75(21), 1249-1252.
52. Klapac, T., Mandić, M. L., Grgić, J., Primorac, L., Ikić, M., Lovrić, T., Grgić, Z., & Herceg, Z. (1998). Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. *Sci Total Environ*, 217(1-2), 127-136.
53. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*, 711(1-2), 193-201.
54. Kumar, H., Koppula, S., Kim, I. S., More, S. V., Kim, B. W., & Choi, D. K. (2012). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in Parkinson disease: a promising multi therapeutic target against oxidative stress, neuroinflammation and cell death. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11(8), 1015-1029.
55. Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2014). Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*, 94(3), 739-777.
56. Li, S., Xiao, T., & Zheng, B. (2012). Medical geology of arsenic, selenium and thallium in China. *Sci Total Environ*, 421-422, 31-40.
57. Li, Y. J., Li, L. Y., Li, J. L., Zhang, L., Gao, F., & Zhou, G. H. (2015). Effects of Dietary Supplementation with Ferulic Acid or Vitamin E Individually or in Combination on Meat Quality and Antioxidant Capacity of Finishing Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*.

58. Lijinsky, W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat Res*, 259(3-4), 251-261.
59. Lin, S. L., Wang, C. W., Tan, S. R., Liang, Y., Yao, H. D., Zhang, Z. W., & Xu, S. W. (2014). Selenium deficiency inhibits the conversion of thyroidal thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in chicken thyroids. *Biol Trace Elem Res*, 161(3), 263-271.
60. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-126.
61. Loscalzo, J. (2014). Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *N Engl J Med*, 370(18), 1756-1760.
62. Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 15(7), 1957-1997.
63. May, J. M., Mendiratta, S., Hill, K. E., & Burk, R. F. (1997). Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem*, 272(36), 22607-22610.
64. Metcalf D, Moore MA, Warner NL. 1969. Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells. *J Natl Cancer Inst*. 43:983-1001.
65. Michaelis, M., Gralla, O., Behrends, T., Scharpf, M., Endermann, T., Rijntjes, E., Pietschmann, N., Hollenbach, B., & Schomburg, L. (2014). Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(3), 905-910.
66. Miyata, M., Furukawa, M., Takahashi, K., Gonzalez, F. J., & Yamazoe, Y. (2001). Mechanism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. *Jpn J Pharmacol*, 86(3), 302-309.
67. Mohammadi, S., Movahedin, M., & Mowla, S. J. (2009). Up-regulation of CatSper genes family by selenium. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 126.
68. Molnár, J. (2013). [Selenium: its antioxidant effects and issues in selenium supply]. *Orv Hetil*, 154(41), 1613-1619.
69. Montgomery, J. B., Wichtel, J. J., Wichtel, M. G., McNiven, M. A., McClure, J. T., Markham, F., & Horohov, D. W. (2012). Effects of selenium source on measures of selenium status and immune function in horses. *Can J Vet Res*, 76(4), 281-291.
70. Moore, E. C., Reichard, P., & Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotids. V., Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* b. *J Biol Chem*, 239, 3445-3452.

71. Moriwaki, T., Kato, S., Kato, Y., Hosoki, A., & Zhang-Akiyama, Q. M. (2013). Extension of lifespan and protection against oxidative stress by an antioxidant herb mixture complex (KPG-7) in *Caenorhabditis elegans*. *J Clin Biochem Nutr*, 53(2), 81-88.
72. Mukherjee, S., Weiner, W. S., Schroeder, C. E., Simpson, D. S., Hanson, A. M., Sweeney, N. L., Marvin, R. K., Ndjomou, J., Kolli, R., Isailovic, D., Schoenen, F. J., & Frick, D. N. (2014). Ebselen inhibits hepatitis C virus NS3 helicase binding to nucleic acid and prevents viral replication. *ACS Chem Biol*, 9(10), 2393-2403.
73. Mustacich, D., & Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem J*, 346 Pt 1, 1-8.
74. Müller, L., Caris-Veyrat, C., Lowe, G., & Böhm, V. (2015). Lycopene and Its Antioxidant Role in the Prevention of Cardiovascular Diseases - A Critical Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 0.
75. N'jai, A. U., Larsen, M., Shi, L., Jefcoate, C. R., & Czuprynski, C. J. (2010). Bone marrow lymphoid and myeloid progenitor cells are suppressed in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) treated mice. *Toxicology*, 271(1-2), 27-35.
76. Nogueira, C. W., & Rocha, J. B. (2011). Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*, 85(11), 1313-1359.
77. Ortega, R. M., Rodríguez-Rodríguez, E., Aparicio, A., Jiménez-Ortega, A. I., Palmeros, C., Perea, J. M., Navia, B., & López-Sobaler, A. M. (2012). Young children with excess of weight show an impaired selenium status. *Int J Vitam Nutr Res*, 82(2), 121-129.
78. Page, T. J., O'Brien, S., Holston, K., MacWilliams, P. S., Jefcoate, C. R., & Czuprynski, C. J. (2003). 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced bone marrow toxicity is p53-dependent. *Toxicol Sci*, 74(1), 85-92.
79. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967a). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70(1), 158-169.
80. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967b). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70(1), 158-169.
81. Peng, D., Zhang, J., Liu, Q., & Taylor, E. W. (2007). Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J Inorg Biochem*, 101(10), 1457-1463.
82. Penning, T. M., Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., & Harvey, R. G. (1996). Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol*, 9(1), 84-92.

83. Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J. M., & Domingo, J. L. (2009). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, hexachlorobenzene and polycyclic aromatic hydrocarbons in various foodstuffs before and after cooking. *Food Chem Toxicol*, 47(4), 709-715.
84. Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, 53(2), 75-100.
85. Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A., & Capitanio, N. (2007). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 353(4), 965-972.
86. Pietschmann, N., Rijntjes, E., Hoeg, A., Stoedter, M., Schweizer, U., Seemann, P., & Schomburg, L. (2014). Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bones. *Metallomics*, 6(5), 1043-1049.
87. Plano, D., Baquedano, Y., Ibáñez, E., Jiménez, I., Palop, J. A., Spallholz, J. E., & Sanmartín, C. (2010). Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library. *Molecules*, 15(10), 7292-7312.
88. Prokisch J., (50%) Zommara M.: Process for producing elemental selenium nanospheres PCT/IB2008/052838 Date of Receipt: 15 July 2008 Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization Your Reference: P104315
89. Redman, C., Xu, M. J., Peng, Y. M., Scott, J. A., Payne, C., Clark, L. C., & Nelson, M. A. (1997). Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis*, 18(6), 1195-1202.
90. Rimmelé, P., Lofek-Czubek, S., & Ghaffari, S. (2014). Resveratrol increases the bone marrow hematopoietic stem and progenitor cell capacity. *Am J Hematol*, 89(12), E235-238.
91. Roberts, C. K., & Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*, 84(21-22), 705-712.
92. Rose, A. H., & Hoffmann, P. R. (2014). Selenoproteins and cardiovascular stress. *Thromb Haemost*, 113(2).
93. Rossner, P., Rossnerova, A., & Sram, R. J. (2011). Oxidative stress and chromosomal aberrations in an environmentally exposed population. *Mutat Res*, 707(1-2), 34-41.
94. Rumi, G., Imre, L., Sülle, C., Lassuné, M. Z., Sarudi, I., & Kelemen, J. (1994). [Selenium supplementation with bread]. *Orv Hetil*, 135(43), 2371-2372.

95. Sadeghian, S., Kojouri, G. A., & Mohebbi, A. (2012). Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. *Biol Trace Elem Res*, 146(3), 302-308.
96. Schneider, M., Förster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumüller, C., Deutsch, M. J., Walch, A., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W., Ursini, F., Roveri, A., Maleszewski, M., Maiorino, M., & Conrad, M. (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*, 23(9), 3233-3242.
97. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. (1999) *British Journal of Nutrition* (1999), 81, S1–S27
98. Sheck, L., Davies, J., & Wilson, G. (2010). Selenium and ocular health in New Zealand. *N Z Med J*, 123(1316), 85-94.
99. Shi, J., Krsmanovic, L., Bruce, S., Kelly, T., Paranjpe, M., Szabo, K., Arevalo, M., Atta-Safah, S., Debelie, F., LaForce, M. K., Sly, J., & Springer, S. (2011). Assessment of genotoxicity induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or diethylnitrosamine in the Pig-a, micronucleus and Comet assays integrated into 28-day repeat dose studies. *Environ Mol Mutagen*, 52(9), 711-720.
100. Shi, L. G., Xun, W. J., Yue, W. B., Zhang, C. X., Ren, Y. S., Wang, Q., Wu, X. Y., Shi, L., Yang, R. J., & Lei, F. L. (2010). Cloning, characterization, and expression analysis of goat (*Capra hircus*) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Int J Biol Sci*, 6(4), 316-326.
101. Sinha, R., Cross, A. J., Graubard, B. I., Leitzmann, M. F., & Schatzkin, A. (2009). Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people. *Arch Intern Med*, 169(6), 562-571.
102. Słowińska, M., Jankowski, J., Dietrich, G. J., Karol, H., Liszewska, E., Glogowski, J., Kozłowski, K., Sartowska, K., & Ciereszko, A. (2011). Effect of organic and inorganic forms of selenium in diets on turkey semen quality. *Poult Sci*, 90(1), 181-190.
103. Stockler-Pinto, M. B., Malm, O., Moraes, C., Farage, N. E., Silva, W. S., Cozzolino, S. M., & Mafra, D. (2015). A Follow-up Study of the Chronic Kidney Disease Patients Treated with Brazil Nut: Focus on Inflammation and Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res*, 163(1-2), 67-72.
104. Sugamura, K., & Keaney, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 51(5), 978-992.
105. Tam, K., Ho, C. T., Lee, J. H., Lai, M., Chang, C. H., Rheem, Y., Chen, W., Hur, H. G., & Myung, N. V. (2010). Growth mechanism of amorphous selenium nanoparticles synthesized by *Shewanella* sp. HN-41. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(4), 696-700.

106. Todd, S. E., Thomas, D. G., Bosch, G., & Hendriks, W. H. (2012). Selenium status in adult cats and dogs fed high levels of dietary inorganic and organic selenium. *J Anim Sci*, 90(8), 2549-2555.
107. Touat-Hamici, Z., Legrain, Y., Bulteau, A. L., & Chavatte, L. (2014). Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 289(21), 14750-14761.
108. Urao, N., & Ushio-Fukai, M. (2013). Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med*, 54, 26-39.
109. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*, 6(2), 445-462.
110. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.
111. Vayndorf, E. M., Lee, S. S., & Liu, R. H. (2013). Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Funct Foods*, 5(3), 1236-1243.
112. Vernie, L. N. (1984). Selenium in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 738(4), 203-217.
113. Wang, H., Zhang, J., & Yu, H. (2007a). Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med*, 42(10), 1524-1533.
114. Wang, H., Zhang, J., & Yu, H. (2007b). Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med*, 42(10), 1524-1533.
115. Warner NL, Moore MA, Metcalf D. 1969. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst*. 43:963-982.
116. Weeks, B. S., Hanna, M. S., & Cooperstein, D. (2012). Dietary selenium and selenoprotein function. *Med Sci Monit*, 18(8), RA127-132.
117. Wingler, K., Müller, C., Schmehl, K., Florian, S., & Brigelius-Flohé, R. (2000). Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology*, 119(2), 420-430.

118. Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem*, 52(2), 255-260.
119. Yoshida, T., Watanabe, M., Engelman, D. T., Engelman, R. M., Schley, J. A., Maulik, N., Ho, Y. S., Oberley, T. D., & Das, D. K. (1996). Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 28(8), 1759-1767.
120. Zachara, B. A., Gromadzińska, J., Wasowicz, W., & Zbróg, Z. (2006). Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol*, 53(4), 663-677.
121. Zeng, H., Jackson, M. I., Cheng, W. H., & Combs, G. F. (2011). Chemical form of selenium affects its uptake, transport, and glutathione peroxidase activity in the human intestinal Caco-2 cell model. *Biol Trace Elem Res*, 143(2), 1209-1218.
122. Zhang, J., Wang, H., Yan, X., & Zhang, L. (2005). Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sci*, 76(10), 1099-1109.
123. Zhang, J. L., Li, J. L., Huang, X. D., Bo, S., Rihua, W., Li, S., & Xu, S. W. (2012). Dietary selenium regulation of transcript abundance of selenoprotein N and selenoprotein W in chicken muscle tissues. *Biometals*, 25(2), 297-307.
124. Zhang, J. S., Gao, X. Y., Zhang, L. D., & Bao, Y. P. (2001a). Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*, 15(1), 27-38.
125. Zhang, J. S., Gao, X. Y., Zhang, L. D., & Bao, Y. P. (2001b). Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*, 15(1), 27-38.
126. Zhang, Z., Gao, X., Cao, Y., Jiang, H., Wang, T., Song, X., Guo, M., & Zhang, N. (2015). Selenium Deficiency Facilitates Inflammation Through the Regulation of TLR4 and TLR4-Related Signaling Pathways in the Mice Uterus. *Inflammation*.

12. TÁRGYSZAVAK

antioxidáns

bárányhús

DMBA

funkcionális élelmiszer

glutathion-peroxidáz (GPx)

granulocyta-macrophag progenitor (GM-CFU)

LactoMicroSel

nanopartikulum (NanoSe)

oxidatív stressz

szelén

táplálék-kiegészítő

toxicitás

KEYWORDS

antioxidant

lamb meat

DMBA

functional food

glutathione-peroxidase (GPx)

granulocyte-macrophage progenitor (CFU-GM)

LactoMicroSel

nanoparticle (NanoSe)

oxidative stress

selenium

dietary supplement

toxicity

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Benkő Ilonának, aki széleskörű ismereteivel, és céltudatos iránymutatásával segítette munkámat, és biztosította számomra a feltételeket a kutatásaim elvégzéséhez.

Köszönet illeti Szilvássy Zoltán Professzor Urat, a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet igazgatóját, hogy lehetővé tette számomra az intézetben végzett munkát.

Segítőkésztségükért külön köszönet illeti a munkacsoportom jelenlegi tagjait, Dr. Megyeri Attilát hasznos tanácsaiért, Nagy Kingát, a kísérletes munka során nyújtott segítségéért, és egykori munkatársamat, Géresi Krisztinát, aki munkájával segítségemre volt kísérleteim kivitelezésében, és aki mindig példaként járt előttem. Köszönet továbbá Szabó Katának és az intézet valamennyi dolgozójának.

Hálás köszönettel tartozom Édesanyámnak, aki szeretetével töretlenül támogatott céljaim elérésében.

Köszönet illeti az alább felsorolt személyeket a kísérletekhez való hozzájárulásukért:

- Dr. Prokisch József, Eszenyi Péter, Sztrik Attila
- Dr. Monori István
- Dr. Nagy Gábor, Tánczos Bence
- Baranyai Edina, Tóth Csilla Noémi, Harangi Sándor, Keresiné Vári Judit
- Dr. Miszti-Blasius Kornél

14. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/42/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ungvári Éva
Neptun kód: D0BMBB
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047629

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ungvári, É.**, Monori, I., Megyeri, A., Csiki, Z., Prokisch, J., Sztrik, A., Jávör, A., Benkő, I.:
Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity.
Food Chem. Toxicol. 64, 298-306, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.004>
IF:2.61 (2013)
2. Benkő, I., Nagy, G., Tánczos, B., **Ungvári, É.**, Sztrik, A., Eszenyi, P., Prokisch, J., Bánfalvi, G.:
Subacute toxicity of nano-selenium compared to other selenium species in mice.
Environ. Toxicol. Chem. 31 (12), 2812-2820, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.1995>
IF:2.618



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: www.lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Benkő, I., Rajta, I., Csik, A., Tóth, J., Benkő, K., Géresi, K., **Ungvári, É.**, Szabó, B., Sarkadi, G., Paripás, B., Takács, I., Tőkési, K.: Major and trace elements in mouse bone measured by surface and bulk sensitive methods.
Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 279, 223-226, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2011.10.059>
IF:1.266

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,494

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,228**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.02.23.

