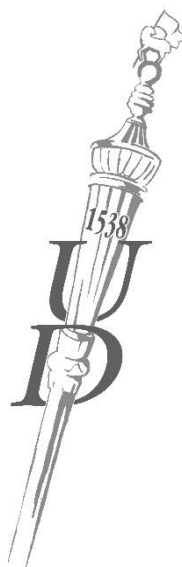


EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Nanopartikuláris szelénkészítmények farmakológiai vizsgálata – új lehetőségek a szelénpótlás területén

Ungvári Éva

Témavezető: Dr. Benkő Ilona



DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

**Nanopartikuláris szelénkészítmények farmakológiai vizsgálata
- új lehetőségek a szelénpótlás területén**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: **Ungvári Éva**, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Benkő Ilona, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Kiss Attila, PhD

Dr. Kiss Emese, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK,
Gyógyszerhatástani Tanszék Könyvtára
(Elméleti Tömb 5. emelet)
2015. május 7., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Kónya Attila, PhD

Dr. Szegedi István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Kiss Attila, PhD

Dr. Kiss Emese, az MTA doktora

Dr. Kónya Attila, PhD

Dr. Szegedi István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2015. május 7., 14 óra

1. BEVEZETÉS

A modernizáció negatív hatásai újabb és újabb veszélyforrást jelentenek a kor embere számára. A közlekedési eszközök által kibocsájtott gázok, vegyi anyagok, a gyárkémények és cigaretta füstje, növényvédőszeres, káros sugárzások fokozott környezeti stresszt jelentenek szervezetünknek. 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-lánctöréseket, membránsérüléseket, és fehérjefunkciók kiesését eredményezhetik. Az oxidatív stressz alattomos kórállapot, mely észrevétlenül alakul ki, ugyanakkor a legsúlyosabb, a mortalitási listák élén álló betegségek okozója lehet. Mára már bizonyított, hogy kardiovaszkuláris megbetegedések, daganatos elváltozások, diabetes mellitus, Parkinson-kór, valamint osteoporosis 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 fiziológias egyensúlyát.

A szelén egy esszenciális mikroelem, mely az egyik legjelentősebb antioxidáns tulajdonságú enzim, a glutathion-peroxidáz aktív centrumát képezi. Az étrend-kiegészítőként használt szelénvegyületek optimális dózistartománya igen szűk, a napi hatásos és toxikus dózis közel esik egymáshoz, emiatt problémás lehet biztonságos alkalmazásuk. A szelén táplálék útján történő bevitelére pedig hiba lenne hagyatkozni, ugyanis a talajok szelénellátottságától függően a növényi és állati termékek szelén koncentrációja igen széles tartományban mozoghat.

Az utóbbi években a szelénkutatások középpontjába a nanoméretű elemi szelén részecskék kerültek. Számos tanulmány arról számol be, hogy a szabadgyökök eliminálásában hatásosabbak, mint a szervetlen és szerves szelénvegyületek. Emellett élénken kutatják terápiás alkalmazási lehetőségeiket az onkológiában is. Toxicitásukról eltérő eredmények láttak napvilágot, mely mindenképpen tisztázásra szorul.

A nanopartikuláris elemi szelén előállításának, felhasználásának és alkalmazásának módjai mai napig kiaknázatlan területet jelentenek a kutatók számára.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során fő célom volt, hogy az eddigi szelénkészítményekhez képest legalább olyan hatásos, ugyanakkor kevésbé toxikus terméket állítsunk elő nanopartikuláris elemi szelén felhasználásával. A terméknek kényelmetlenségektől mentesen, per os adagolhatónak kell lennie, és illeszkednie kell a normál étrendhez.

I. Funkcionális élelmiszer előállítása

Először az állatok hújának *in vivo* nanoszelén szupplementációjára került sor. Választásom az emelkedett Se tartalmú hazánkban méltánytalanul népszerűtlen bárányhúsról esett, mely magas ásványi anyagtartalommal rendelkezik, és kiváló forrása a szelénnek. A bárányhús Se-koncentrációjának további emelésével olyan funkcionális élelmiszerhez jutnánk, mely hatásos módja lenne a Se-bevitelnek, ugyanakkor táplálék jellegéből adódóan nem lehetne túladagolni.

A környezeti oxidatív stressz modellezésére DMBA kezelést alkalmaztam, mely a policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) képviselője. Oxidatív stressz állapotában a felgyülemlett szabadgyökök károsítják a sejtek makromolekuláit. Ennek funkciókiesés vagy akár sejthalál is lehet a következménye.

Kísérleteim során az alábbi kérdésekre kerestem a válaszokat:

1. Fokozható-e a bárány hújának Se-koncentrációja per os bevitt nanoszelénnel?
2. Változik-e a hús Se-koncentrációja hőkezelés hatására?
3. Van-e hatása a bárányhúsnak illetve a Se-dús bárányhúsnak az egerek antioxidáns védelmi rendszerére fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban?
4. 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. A DMBA kezelés oxidatív károsodáson keresztül myelotoxikus hatású. A legsérülékenyebb sejtpopulációkat a progenitor sejtek képezik, melyek közül a GM-CFU progenitorok a granulocyták és macrophagok utánpótlását biztosítják. Ezen progenitorok pusztulása a granulopoézis zavarához, neutropeniás állapot kialakulásához vezethet. A súlyos következményekre való tekintettel vizsgálni

kívántam a DMBA-kezelés csontvelői működésre, azon belül a granulopoézisre kifejtett hatásait.

6. Vajon képes-e a bárányhús és a Se-dús bárányhús mérsékelni a DMBA-kezelés okozta csontvelőtoxicitást?

II. Étrend-kiegészítő előállítás

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

1. Milyen toxikológiai paraméterekkel rendelkezik a két nanopartikuláris szelénkészítmény? Extrémen magas dózisban adódnak-e különbségek az egyes szelénformák között túlélés, fehérvérsejtszám, ill. csontvelői működés tekintetében?
2. Adódnak-e hisztopatológiai elváltozások a máj szövetében toxikus mennyiségű szelén fogyasztása esetén a különböző készítmények alkalmazásakor?
3. Van-e különbség a szeléntartalmú antioxidáns enzim, a glutation-peroxidáz aktivitásában fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban?
4. Képesek-e mérsékelni a DMBA-okozta csontvelőtoxicitást? Van-e eltérés az egyes szelénkészítmények között?
5. 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. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Általános megfontolások

Kísérleteimet 2 fő részre osztottam. Először vizsgáltam a szelénrel dúsított báránnyal 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:

3.1.1. Kísérleti állatok

A 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. A csapvizet, standard rágcsálótápot és a speciális diétának megfelelő tápok az állatok *ad libitum* fogyaszthatták.

3.1.2. 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 dózissal DMBA oltást kaptak intraperitoneálisan.

FRAP-reagens összetevői:

- acetát puffer: 300 mM, pH 3,6
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin: 10 mM Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország)
- FeCl₂: 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).

3.1.3. Nanopartikuláris elemi szelén előállítása

A 100-500 nm átmérőjű NanoSe gömböcskék előállítását Dr. Prokisch József és mtsai végezték. A Se forrást és az inokulumot (probiotikus joghurt baktériumok) 1 L MRS médiumhoz (Oxoid Ltd., Hampshire, United Kingdom) adták. Se forrásként nátrium-hidroszelenit (NaHSeO₃) 10 g/L koncentrációjú törzsoldatot használtak. 20 ml szelenit törzsoldatot adtak 980 ml MRS médiumhoz, így a végső koncentráció 0,2 g/L lett. A 10 ml-nyi inokulum *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus casei* baktériumfajok keverékét tartalmazta. A szelénforrás 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.

3.1.4. Vérvétel

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.

3.1.5. Csontvelő kinyerése, sejtuszpenzió 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.

3.1.6. Kolónia esszé

A femoralis csontvelőből aszeptikus körülmények között nyert csontvelő szuszpenzióból speciális lágy-gél tenyészeteket készítettem. Petri-csészénként 2×10^5 /ml csontvelői sejtet oltottam le. 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. 7 napos inkubálást követően (SANYO CO₂ termosztát, SANYO Electric Co.,Ltd., Japán) kolóniának tekintettem a legalább 50 sejtet tartalmazó csoportokat.

A csontvelői funkciót a GM-CFU, azaz a granulocita-macrophag közös progenitorok jellemző paramétereinek vizsgálatával határoztam meg, úgymint:

- csontvelői cellularitás, melyet a csontvelői szuszpenzió sejtszáma és térfogatának szorzataként kaptam
- GM-CFU kolóniaszám előfordulási gyakorisága
- a femur teljes GM-CFU tartalma, melyet a cellularitás és a kolóniaszám szorzataként kaptam

3.2. Szelénnel dúsított bárányhús egerek antioxidáns védelmi rendszerére és csontvelői működésére kifejtett hatásainak vizsgálata

3.2.1. Bárányhús

A szárított bárányhúst a Debreceni Egyetem Agrártudományi Központ Karcagi Kutatóintézete biztosította. Előállításánál fontos szempont volt, hogy a formuláját tekintve beilleszthető legyen az egerek étrendjébe.

A bárányok ivóvíz útján jutottak szelénhez. Vizük 0,1% koncentrációban tartalmazott NanoSe-t, mely felszívódva az izomszöveteikben is kumulálódott. Az állatok levágása után húsuikat -a napsütés dehidratáló hatását imitálva- speciális berendezésben szárították. 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.

3.2.2. 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.

3.2.3. Teljes antioxidáns kapacitás meghatározása

A vizsgálat során FRAP-módszert (Ferric Reducing Ability of Plasma) alkalmaztam Benzie és Strain nyomán (1999), mely egy elektron-átmeneten alapuló kolorimetriás módszer, ahol a minták antioxidánsai viselkednek elektrondonorként, így alkalmas a vér teljes antioxidáns tartalmának meghatározására. A mérés vérplazmából történt. Ehhez az alvadégtól vett 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.

3.2.4. Kísérlet menete

60 db hím egeret (n=60) random módon 3 csoportba osztottam. 20 egér standard rágsálótápot fogyasztott, 20 állat szupplementálás nélküli szárított bárányhúst, 20 állat pedig NanoSe-nel dúsított bárányhúst kapott. Mivel az egerek étrendjében ritkán szerepel hús, úgy mindkét bárányhús diétán lévő csoportnak szalmát adtam rostforrásként, valamint ivóvizüket Neovit Forte (Kela Laboratoria N.V., Belgium) oldattal szupplementáltuk (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.

3.3. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata

3.3.1. LactoMicroSel® előállítása

A LactoMicroSel® néven bejegyzett készítményt Dr. Prokisch József és mtsai készítették. A Debreceni Egyetem által szabadalmaztatott, 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.

3.3.2. NanoSe és LactoMicroSel® Se-koncentrációjának mérése

Az elkészült termék Se-koncentrációját láng emissziós atomabszorpciós (Thermo ICE 3000) és atomfluoreszcens spektrométerrel (PSA Thermo, Excalibur) ellenőrizték. A tisztított NanoSe-mintákban 200-500 mg/L Se-koncentrációt mértek, míg a liofilizált LMS esetében 1000-3000 mg/kg Se-koncentrációt (Dr. Prokisch J. és mtsai).

3.3.3. További szelénkészítmények

A két nanopartikuláris szelénkészítmény hatásait -szupplementálási célból már régóta használt- szelén vegyületekkel, ill. készítménnyel kívántam összehasonlítani, melyek az alábbiak voltak: szervetlen Na-szelenát (Na_2SeO_4) és Na-szelenit (Na_2SeO_3), szerves Sel-Plex®(szelenometionin tartalmú).

3.3.4. Szeléntartalmú tápok készítése

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

3.3.5. A kísérletek menete

A vizsgálatokban BDF1 egereket használtam. Az állatok 2 héten keresztül kapták a szupplementált tápokot. Az etetési periódus letelte után a hatástani vizsgálatban szereplő csoportok felében oxidatív stresszt indukáltam ip. DMBA oltással.

3.3.5.1. Toxikológiai vizsgálatok

A túlélési vizsgálatot csoportonként 6 állaton végeztük. 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.

3.3.5.1.1. Szövettani minták előkészítése

A szövettani metszeteket Dr. Nagy Gábor és mtsai készítették. 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).

3.3.5.1.2. 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.

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

3.3.5.2.1. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások

Mivel a Se csak a szeléntartalmú antioxidáns enzimek expresszióját növeli, így a FRAP-módszernél specifikusabb mérésre volt szükség, ezért az antioxidáns státuszt hüén reprezentáló GPx aktivitását határoztam meg. A mérést Ransel kit 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 (50µl) volt. Az enzimaktivitás eredményeként létrejövő abszorbancia-változást FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Németország) microplate readerrel detektáltam.

3.3.5.2.2. *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 µl 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 szelén 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.

3.3.5.2.3. *Csontvelői funkcióra gyakorolt hatások*

A szeléntartalmú tápok csontvelői működésre gyakorolt hatásait a fentebb leírt kolónia esszé módszerrel vizsgáltuk.

3.4. *Statisztikai kiértékelés*

A statisztikai analízist GraphPad Prism szoftverrel végeztem (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Az eredményeket átlag±SEM formában tüntettem fel. A kiértékeléshez páratlan t-próbát, valamint egyszempontos variancia analízist (Ona-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 $p < 0,05$.

4. EREDMÉNYEK

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

4.1.1. *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).

4.1.2. *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 ($p < 0,001$)

Nagy dózisé, egyszeri intraperitoneális DMBA-oltással a csoportok felében oxidatív stresszt generáltam, mely mérsékelt csökkenést eredményezett a vér antioxidáns aktivitása tekintetében. Mind a Se-nel szupplementált, mind a szupplementálás nélküli bárányhús fogyasztása protektívnek bizonyult a DMBA károsító hatásaival szemben. Előbbi esetben ez a védelem még jelentősebb volt ($p < 0,01$ és $p < 0,001$). Habár az antioxidáns kapacitás csökkent a kezelt állatokban a kezeletlenekhez képest, a normál bárányhús és különösen a Se-nel dúsított bárányhús megakadályozta, hogy az antioxidáns kapacitás az abszolút kontroll állatok értékei alá csökkenjenek, így elősegítette, hogy a fiziológiás tartományban maradjanak.

4.1.3. *Fehérvérsejtszám*

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

Az egyes fehérvérsejt típusok abszolút számának meghatározása során fény derült arra, hogy a Se-dús bárányhússal 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. Az abszolút neutrophil szám a DMBA-oltás ellenére is a fiziológiás tartományban maradt.

4.1.4. Normál és szelénnel dúsított báránnyhús hatása a csontvelői működésre fiziológiás körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban

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 sejtől kinövő GM-CFU kolóniák számát, mely pontos indikátora a granulopoézis intenzitásának, a teljes GM-CFU tartalom pedig tükrözi a csontvelő regenerációs képességét.

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 báránnyhússal etetett állatok esetében kisebb mértékű, és a Se-dús báránnyhúst fogyasztók körében a legcsekélyebb sejtpusztulást láttam ($p < 0,05$). Az eredmények alapján elmondható, hogy a nanoszelénnel szupplementált báránnyhús közvetett módon képes mérsékelni a DMBA-okozta hemopoetikus zavarokat.

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. Magasabb intenzitású granulopoézist tapasztaltam a báránnyhúst fogyasztó csoportban a kontroll csoporthoz képest, azonban statisztikailag jelentős különbség csak a Se-dús báránnyhússal 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 báránnyhúsok fogyasztása védelmet jelentett az egerek számára, mivel szignifikánsan magasabb kolóniaszámokat számoltam mindkét báránnyhúst fogyasztó csoportban. ($p < 0,01$ és $p < 0,001$) A Se-szupplementáció fokozta a báránnyhús protektív hatását.

A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma. Fiziológias 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. 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.

4.2. Új nanopartikuláris szelénkészítmények összehasonlító vizsgálata

4.2.1. Toxikológiai vizsgálatok (50 ppm)

4.2.1.1. Túlélés

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 detektáltunk (17%).

4.2.1.2. 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.

4.2.1.3. 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. 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 legcsekélyebb károsító hatása a LMS-nek volt (-19%; $p < 0,05$). A *vesék* tömegében nem tapasztaltam változást a kontrollhoz képest.

4.2.1.4. Fehérvérsejtszám

Toxikus dózisban adagolt szelénkészítmények hatására az össz fehérvérsejtszám drasztikusan csökkent. A legsérülékenyebbek a lymphocyták és a monocyták bizonyultak. A vizsgált szelénkészítmények közül a legkisebb mértékű sejtpusztulást a LMS okozta.

4.2.1.5 Máj hisztopatológia

A kontroll máj szövettani képe egybefüggő, a szövet folytonos. 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, majd ezt követte a szelenit. Sel-Plex kezelést követően a szövet pórusos jellegűvé vált a sejtek közötti apró megszakítások miatt. NanoSe hatására kevés nagyobb sejtmentes terület alakult ki, míg a LMS esetében a kontrollhoz hasonló szövettani képet láttam.

4.2.1.6. Csontvelői működésre gyakorolt hatások

A toxikus dózisú Se-készítmények a csontvelőben is súlyos károsodást okoztak. 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, 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.

4.2.2. Hatástani vizsgálatok (5 ppm)

4.2.2.1. Vér paraméterek

A fehérvérsejtszám tekintetében nem adódtak szignifikáns különbségek a csoportok között. 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, 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.

4.2.2.2. Plazma Se-koncentrációjának meghatározása

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

4.2.2.3. Antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások fiziológiás 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 fiziológiás körülmények között, mind pedig oxidatív stressznek kitett állatokban. 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.

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

4.2.2.4.1. 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. A DMBA-kezelés jelentős sejtpusztulást eredményezett minden csoportban. A NanoSe és a LMS védő hatása ezen a területen is érvényesült, ugyanis a velük kezelt csoportokban a kontrollhoz képest magasabb sejtszámokat kaptunk.

4.2.2.4.2. GM-CFU kolóniák előfordulási gyakorisága

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

4.2.2.4.3. A femorális csontvelő teljes GM-CFU tartalma

Az előzőekből adódóan a femur teljes GM-CFU tartalmára sem voltak hatással a szelénkészítmények fiziológiás körülmények között. A DMBA-kezelés hatására kialakuló regenerációs potenciál-csökkenés mérséklésére csak a LMS volt képes.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. 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 CYP4501A1 enzim, a csontvelő sztróma sejtjeiben a CYP4501B1 enzim végzi. A PAH-vegyületek első lépésben transz-dihidrodioállá 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-dihidrodioall o-kinonokká alakítják, melyek képesek belépni a redox ciklusba, és nagy mennyiségű ROS képződését generálják. A képződő két végtermék a DMBA-t egyaránt alkalmassá teszi daganatos megbetegedések kialakulásának vizsgálatára, és oxidatív stressz modellezésére kísérletes körülmények között.

5.2. Szelénnel dúsított bányahús 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, míg mások csak táplálék útján vihetők be (E, C-vitamin, β -karotin). Antioxidánsok közé soroljuk azokat az enzimeket is, melyek a neutralizáló redox reakcióban közvetetten részt vesznek, illetőleg azokat, amelyek a szabadgyököket enzimatis úton bontják ártalmatlan végtermékekre (glutathion-peroxidáz). Számos vizsgálat igazolja, hogy antioxidáns molekulák per os bevitelével növeli a szervezet antioxidáns kapacitását. Kísérleteim első szakaszában ezt a megoldást választottam az antioxidáns tulajdonságú szelén bevitelére. Mind a normál bányahús, mind a Se-dús bányahús növelte az egerek antioxidáns kapacitását fiziológias körülmények között és oxidatív stressznek kitett állatokban egyaránt. Se-nel dúsított bányahús esetében az emelkedés jelentősebb volt.

5.3. Szelénnel dúsított bányahús fehérvérsejtekre gyakorolt hatása

A DMBA jelentősen csökkentette a fehérvérsejtek számát. 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. Neutrophil granulocyták körében a Se-dús bányahús kifejezettebb

protektív hatása érvényesült, vélhetően azért, mert a monocytákban az antioxidáns enzimek expressziója alacsonyabb, mint a neutrophilekben.

5.4. Szelénnel dúsított bárányhús csontvelői működése gyakorolt hatásai

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. A vérsejtek közül a neutrophil granulocyták töltik a legkevesebb időt a vérpályán, így utánpótlásuk nélkülözhetetlen az olykor életet veszélyeztető neutropeniás állapot kivédésében.

A csontvelői progenitor sejtek NADPH-oxidázt expresszálnak, 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. A ROS azonban kétélű fegyverek, a fiziológiás mennyiséget meghaladva a progenitorok pusztulását idézik elő.

Kísérleteimben a Se-dús bárányhús 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, valamint a GPx1, mely szelén szupplementáció hatására fokozott antioxidáns védekezést tesz lehetővé.

5.5. 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 szeléнен túl megtalálhatók a termelő baktériumok és a szerves tápközeg is. Munkám során ismert szervetlen (szelenát, szelenit) és szerves szelénformákkal (Sel-Plex), valamint nanoszelénnel (NanoSe) hasonlítottam össze -toxikológiai és hatástani szempontokat figyelembe véve.

5.6. Vizsgált szelénkészítmények toxicitása

Az 50 ppm szeléntartalmú 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 szelén 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 szelén 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 hisztopatológiai vizsgálat során szelenát okozta a legnagyobb károsodást a máj strukturális felépítésében. A LMS esetében gyakorlatilag a kontollal megegyező szövettani képet láttam. A mikroszkópiai vizsgálat alapján felállított toxicitási sorrend a következő: szelenát > szelenit > NanoSe > Sel-Plex > LMS.

Toxikus mennyiségű szelén 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.

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.

5.7. Hatástani vizsgálatok

A szelén szupplementáció a szelén 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. Irodalmi adatok szerint a szelenoproteinek fokozott expressziójának egyik kiváltó oka az oxidatív stressz, és feltétele az elegendő mennyiségű szelén jelenléte.

A csontvelői paramétereket (cellularitást, GM-CFU progenitorok előfordulási gyakoriságát és a femur teljes GM-CFU tartalmát) fiziológias körülmények között nem befolyásolta a szelén 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.

Kísérleteimben a NanoSe nem bizonyult hatásosabbnak sem a szervetlen, sem a szerves készítményeknél. Irodalmi adatok szerint a hatás és a toxicitás mértéke az elemi szelénrészecskék méretének függvénye.

Az LMS-t fogyasztó csoportban alacsony plazma Se-koncentrációt mértem, ugyanakkor a készítmény hatása legalább olyan jónak, ill. jobbnak bizonyult, mint a többi szelén species hatása. LMS tekintetében még nem rendelkezünk elég farmakokinetikai adattal, 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.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 dózírozása 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 alacsonyabb, mint az eddig alkalmazott szelénformák esetében. Az általam vizsgált funkcionális élelmiszer a szelén és a bányahús jótékony hatásait ötvözve növeli a szervezet ellenállóképességét, 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 szelénnel dúsított bárányhús és az eddig alkalmazott szelénforrásoknál szélesebb optimális dózistartománnyal rendelkező LactoMicroSel® készítmény új kapukat nyit meg a biztonságosabb szelénpótlás területén.

7. 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.

Segítőkészségükért 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 végig 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

8. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

Jelölt: Ungvári Éva
Neptun kód: D0BMQB
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., Jávor, 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.



Az értekezés témájában bemutatott poszter:

Ungvári Éva, Szabó Boglárka, Megyeri Attila, Bodnár Dóra, Szentesi Péter, Benkő Ilona:

Új, nanopartikuláris szelénkészítmények farmakológiai vizsgálata

A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa