

PhD értekezés tézisei

Selenium, antioxidáns státus és lipoproteinek juvenilis, insulin dependens diabetes mellitusban és egészséges gyermekekben

Dr. Cser Mária Ágnes

Magyarországi Református Egyház Bethesda Gyermekkórháza

Budapest

1998

I. Bevezetés és tudományos előzmények

1.1. A selenium (Se) essentialis nyomelem az ember számára

A selenium (Se) humán medicinában betöltött szerepére vonatkozóan az elmúlt két évtizedben igen sok új felismerés történt. Csupán 1997-ben több ezer publikáció látott napvilágot, melyek tárgya a Se nyomelemmel kapcsolatos kutatás kémiai, biokémiai, biológiai, in vivo és in vitro kísérleti eredményeinek ismertetése vagy klinikai megfigyelések leírása. A nyomelemek kutatási területén jelenleg a legtöbb figyelem a Se felé fordul a carcinogenesisben és tumor preventióban feltételezett pozitív, protektív hatásai miatt.

Berzelius 1817-ben fedezte fel a Se-t, mint új nyomelemet. 1975-ig másfél évszázad telt el, mikor Awasthi és munkatársai emberi vörösvérsejtekből izoláltak glutathion peroxidázt (GSH-Px), azaz az első humán selenoenzymet. Ezzel igazolódni látszott, hogy a Se essentialis nyomelem az emberi testben is. A GSH-Px enzim minden szövetünkben jelen van, a Se selenocysteinként épül az enzymbé és mint cystein analóg a kén helyét elfoglalhatja. Ez a biokémiai tulajdonság magyarázza a Se fontos szerepét szervezetünk oxidáció elleni védőrendszerében, mert könnyebben redukálódik, mint a kén.

1980-ban Chen és munkatársai, Kínában élő kutatók jöttek rá arra a tényre, hogy Keshan tartományban, egy már évtizedek óta ismert, szívelégtelenség képét mutató, halálos kimenetelű betegség, mely főleg gyermeket váró anyákat, csecsemőket és kisgyermekeket érintett, Se adagolással uralható. 1984-ben Günzler leírta a GSH-Px enzim aminosav sequentiáját, 1986-ban két munkacsoport egy időben fedezte fel az enzim génjét, 1987-ben japán kutatók dolgozták ki a humán plazma GSH-Px mérési módszerét és 1992-ben deklarálták amerikai kutatók, hogy a selenocystein a 21. kódolt aminosav. 1996-ban amerikai rákkutatók bizonyították, hogy Se hiányban az addig avirulens kórokozó virulenssé válhat.

1.2. A Se biológiai funkciójáról, a legfontosabb selenoproteinekről, a glutathion peroxidázokról

A Se legmélyrehatóbb funkciójaként a szabad gyökök elleni védelem tekinthető, azaz celluláris, subcelluláris, membrán és plazma antioxidáns kapacitás részeként működik. Aktív része a glutathion peroxidáz enzimeknek, a sejtmembrán phospholipid-hydroperoxid-glutathion peroxidáznak, synergista hatású az E vitaminnal és aktív része a pajzsmirigy I. típusú jódthyronin-5-dejodináz enzimnek, mely az inaktív T₄ hormont aktív T₃-á alakítja. Legújabb ismeretek szerint nemcsak a hidrogénperoxidok, organikus peroxidok (lipid peroxidok, steroidok, nukleinsavak, prostaglandinok, t-butyl és cumen peroxidok), de a peroxynitritek képződését is csökkenti (Sies, előadás, Helsinki NADH'98 kongresszus).

Négyféle glutathion peroxidáz enzyment ismerünk. A klasszikus, celluláris GSH-Px a vörösvérsejtekből és a májban képződik, rutinszerűen mérhető. A plazmában előforduló GSH-Px valószínűleg a vesékben szintetizálódik a legnagyobb mennyiségben, szintén könnyen mérhető. A bélrendszerből izolált gastrointestinalis GSH-Px mérése nem tartozik a rutin klinikai vizsgálatok közé. A sejtmembránból, Ursini olasz kutató által izolált phospholipid-hydroperoxid-GSH-Px enzim mérését csak néhány kutatócsoport tudja mérni. A Se számos más selenoproteinnek is fontos része. Ilyenek a selenoprotein P, mely feltehetően a Se transportban játszik szerepet, antioxidáns-redox funkcióval rendelkezik, a selenoprotein W, melynek pontos biológiai funkciója nem ismert, a Se sejtbe beépülést reguláló folyamatban lehet jelentősége. Több szervspecifikus selenoproteint ismerünk, így a prostata epitheliális sejtjeiben, placentában, ovariumban képződőket. A Se immunmodulátornak is

tekinthető, mind in vitro szövettényészeteken tett megfigyelések, mind in vivo vizsgálatok emellett szólnak. A steroidok, prostaglandinok synthesisének is részese a Se nyomelem.

1.3. Se státus az egészség - betegség viszonylatában

Az egészség - betegség viszonylatában mind állatokban, mind emberben a Se szerepét négy nagy csoportra oszthatjuk: toxicitás, hiányállapotok, infekciók és örökletes betegségek. Az élettani és toxicus szintek között mindössze egy nagyságrendű a különbség. Az **acute Se mérgezés** tünetei a szem-, orr-, torok- nyálkahártya irritabilitása, hányinger, hányás, emésztési zavarok és psychoneuroticus jelenségek. A betegnek feltűnő fokhagymára emlékeztető, kellemetlen szaga van. Intenzív selenuria kísérí, veseelégtelenség vezethet gyors halálhoz. A **chronicus Se intoxicatio** tünetei hasonlóak, vezető tünetek az étvágytalanság, hajszálak töredezése, hajhullás, intenzív foetor. Sem az acute, sem a chronicus Se intoxicatiót nem könnyű felismerni, mert sokféle és nem specifikus tünet kíséri a klinikai képet. Ipari foglalkozási ártalom kapcsán mind acute mind chronicus selenosis napjainkban is előfordul. Spallholz (Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. Biomedical and Environmental Sciences 1997,10.(N2-3) 260-271.) vizsgálatai felhívják a figyelmet a prooxidáns Se-vegyületekre. Ezek a természetben is előfordulnak a Se-t accumuláló növényekben és különböző Se-sókban, olyan Se vegyületek, melyek szabad gyököket produkálnak, cytotoxicusak, valószínű apoptosist is indukálnak.

A **hiányállapotok** csaknem minden állattörzsben előfordulnak, a változatos tünettan sokban elősegítette a humán kutatások előrelépését.

Infectiókban primer és secunder Se hiány is szerepet játszik.

A Se hiánnyal járó **örökletes betegségek** között a phenylketonuriát, jávorfászpórbetegséget, cystás fibrosist, cerebrális lipofuscinosist, Down syndromát kell kiemelni.

1.4. Se hiány a hazai haszonállat állományban

Vizsgálataink tervezésekor abból a hypothesisből indultunk ki, hogy hazánk alacsony, nagyrészt 0.1 ppm alatti talaj Se tartalma miatt a hiányállapot kategória valószínű érinti nemcsak a haszonállatokat, de a lakosságot is.

A hazai haszonállat állományban egyértelműen Se hiányra utaló tüneteket írtak le bárányban, malacban, szarvasmarhában, csirkében. A hiánytünetek leginkább szaporodásbiológiai rendellenességek, alacsony fertilitás, congenitális malformációk, immunválasz csökkenése, a neutrophil sejtek bactericid képességének csökkenése, exsudatív diathesis, súlyosabb esetekben szívizomzat és vázizomzat károsodása, úgynevezett fehér izom betegség tüneteiben mutatkoztak meg. A legsúlyosabb hiánytünetek az állatok elpusztulását okozták, különösen az újszülött állatok mortalitása volt magas. Emiatt a hazai állatállomány rendszeres, a Magyar Takarmánytáblázat szerinti Se pótlást kap a hiánytünetek preventiója céljából másfél évtizede.

Ezen tényből arra következtethetünk, hogy növényi eredetű Se forrásaikban biztosan nem elegendő a Se kínálat az ember számára sem. Hazai élelmiszeriparunk húsféléinek Se tartalma nem ismeretes, halfogyasztásunk messze a európai átlag alatt van. A legutolsó kiadású magyar Tápanyagtáblázat nem tartalmazza élelmiszereink Se koncentrációit.

1.5. A Se hiányról és az ezzel összefüggésbe hozható humán betegségekről

Az emberben észlelt hiányállapotokat 3 nagy csoportra oszthatjuk. Primer, vagy endemiás, iatrogen és secunder, konkrét betegségeket kísérő Se hiányt ismerünk.

A primer, endemiás Se hiánybetegségek száma az elmúlt években bővült. A Keshan betegség vezető tünete a súlyos, Se pótláson kívül mással nem megelőzhető cardiomyopathia. 1996-es kínai adatok szerint a betegség előfordulása lényegesen csökkent, amióta seléneztet asztali sót használnak az érintett földrajzi régióban, Keshan tartományban. A **Kashin-Beck betegség** klinikai leírása már a múlt század vége óta ismert, Kína északi tartományaiban, Tibetben, Szibériában. Főleg a nagyizületek közelében zavart a csontosodás, a hosszú csőves csontok rövidek és torzák, az ilyen beteg gnómként szenved az életet. Egyre kevesebb ilyen beteg látható az érintett földrajzi területeken, mert másfél évtizede pótolják a Se hiányt. 1990-ben írták le közép Afrikában, észak Zaire területén a **myxoedemás cretenizmust**, ahol nemcsak jó, de Se hiány is együttesen fordulnak elő és feltehetően emiatt endemiás itt a kórkép. Hasonló megfigyelést nem észleltek pl. Kína jóhiányos területein. A WHO 1996-os adatai szerint Európában teljesen megoldott a J hiány pótlása, közép Afrikában azonban még folyik a preventív küzdelem.

A **iatrogen Se hiány** kórképei közé soroljuk a totális parenterális tápláláskor, TPN-ban kialakuló Se hiányt, mely egyértelműen orvosi hibaként fordulhat elő. Többféle infúziós oldal áll rendelkezésünkre. A Se hiány kezelése nem egyszerű, mert a hatékony supplementáláshoz folyamatos vér Se koncentráció monitorizálás és legalább egy glutathion peroxidáz enzim aktivitás követés szükséges, amelynek ma még nincsenek meg a klinikai eszközös feltételei Magyarországon.

A **phenylketonuria** (PKU) egy örökletes aminosav anyagcsere-betegség, melyben speciális diétát kap a beteg, amiből hiányzik a Se vivő protein, így a Se is. A PKU-s gravid anyákat feltétlenül kezelni kell, a Se hiányt pótolni kell, mert az újszülött intrauterin és gyors postpartum agyi fejlődéséhez elengedhetetlen a Se is. Természetesen a beteg PKU-s gyermekek kezelése is csak Se és GSH-Px monitorizálással oldható meg. Nincs elegendő adat, klinikai megfigyelés arra vonatkozóan, hogy milyen rizikót szenved a Se-el nem pótoltt PKU-s beteg.

A **jávorfaszörp betegség** hazánkban nagyon ritkán előforduló betegség. A nemzetközi irodalmi adatok nem egyöntetűek a Se pótlás szükségességét illetően. Egyes szerzők a **vegetariánizmust** is a iatrogen módon kialakulható Se hiányt elősegítő klinikai állapotnak tartják. Hús, tojás és tejtermékek fogyasztása nélkül nem mindig biztosítható elegendő Se bevitel csak gabonatermékekkel, magvakkal és gyümölcs-zöldséffélékkel.

A secunder Se hiánnyal járó betegségek közé soroljuk az örökletes **cystás fibrosist** (CF), mely súlyos tüdőelváltozásokkal jár, sok gyermek nem érheti meg a felnőtt kort. A coeliakia a gluténnel (liszt fehérje) szembeni érzékenység szintén jól ismert gyermekgyógyászati kórkép, melyet Se hiány kísérhet. A Crohn betegség gyermek- és felnőttkorban egyaránt előforduló immunkórkép, és ide sorolható mindenféle felszívódási zavar bármely életkorban, melyeket gyakran kísér elégtelen Se bevitel.

A **feltételezhetően Se hiánnyal összefüggő betegségek** sora szintén évről évre bővül, és ezekkel kapcsolatban szélsőséges, néha egymásnak ellentmondó álláspontok vannak, nincs egységes vélemény. Ezen csoportba tartoznak a protein-kalória hiányos kwashiorkor, a cardiovascularis megbetegedések széles skálája, leukaemiák, tumorok, a Duchenne féle izomdystrophia, a juvenilis neuronális ceroid lipofuscinosis, a Down syndroma, más néven mongol idiotia, a juvenilis chronicus arthritis, az insulin dependens **diabetes mellitus**, anaemiák, bölcsőhalál és az AIDS.

Emelkedett Se igényről beszélhetünk az alábbi állapotokban: terhesség, szoptatás, koraszülöttség, chronicus betegségek, alkohol abusus, szervtransplantatio és geriátriai állapotok. Rizikó csoportként is említi az irodalom a fentieket.

Csökkenő glutathion peroxidáz aktivitással járó kórképeket is ismerünk, ahol nem feltétlenül a Se koncentráció alacsony vér vagy plazma szintje az első laboratóriumi jel, hanem az alacsony selenoenzym aktivitások. Ebbe a csoportba tartoznak a myocardialis infarctus, az érelmeszesedéssel járó klinikai képek, malignus tumorok, immunfunkció zavarok, az asthma bronchiale és neuro-geriátriai kórképek.

1.6. A Se hiány tünetei emberben

A Se hiány klinikai tünetei a következők lehetnek: dilatativ cardiomyopathia, vázizomzat gyengeség, osteoarthropathia, cretenismus, macrocytosis a vörös-vérsejtekben, pseudoalbinismus, fehér foltok megjelenése a bőrön, hajritkulás, hajhullás. Jól látható, hogy egyik tünet sem specifikus, ezért Se paraméterek mérése nélkül nem is tanácsos értékelni, több tünet együttes előfordulásakor azonban gondolhatunk Se hiányra.

A humán Se státus legjobb megítélését szolgáló paramétereket felsorolva, Se koncentráció mérhető teljes vérben, plazmában, vörösvérsejtekben, thrombocytákban, hajban, körömben, vizeletben, székletben, spermában és biopsziával nyert szövetmintákban is. A betegség milyenségének megfelelően selenoenzymek aktivitásának mérésével egészíthetjük ki és értékelhetőbbé tehetjük a Se ellátottság megítélését. Több paraméter együttes meghatározása, egyidejű mérése ad támpontokat az acut és tartós Se ellátottság megítéléséhez.

1.7. A humán Se státus milyenségének megítélése

Az elmúlt évtizedben számos tanulmány jelent meg különböző országok népességének Se státusáról, melyek a geológiai környezettől függően széles skálát mutatnak az egészséges populációkban is. Az egészséges lakosság Se szintjeinek ismeretére feltétlenül szükségünk van egy adott földrajzi régióon belül, ha a betegcsoportok adatait értékelni kívánjuk. Kutatási témánk indításakor igen kevés adat állt rendelkezésre az egészséges magyar lakosság Se ellátottságára vonatkozóan. 1990 óta ismert, hogy Magyarország jellemző közet-talaj rendszerét a közepesnél alacsonyabb Se szint - 20-400 ppb jellemzi, ez Európa vonatkozásában alacsony talaj Se szintnek felel meg. Alacsony Se kínálat a növényekben és állatokban is alacsonyabb Se felvételt tesz lehetővé, a tápanyaglanc minden szakaszát érinti és értelemszerűen alacsony humán Se ellátottságot eredményez.

A WHO 1996-os adatai szerint 22 európai ország közül Magyarországon a legmagasabb a mortalitás, 14.6 ezrelék. Míg Ausztriában 0.16 ezrelék a férfiakban, 0.34 ezrelék a nőkben az atherosclerosis miatt meghaltak száma, addig Magyarországon ötször több férfi (0.91 ezrelék) és háromszor több nő (1.2 ezrelék) hal meg ezen betegség csoportban. A daganatok mortalitása szintén kiemelkedően magas hazánkban mind a gyermekkorban (0.051 ezrelék) mind felnőttekben (3.87 ezrelék).

Mind az atherosclerosis, mind a malignus tumorok kialakulását és a betegségek kimenetelét az elégtelen Se ellátottság negatív irányba befolyásolja. Ennek ismeretében indokolt és szükséges a magyar lakosság Se ellátottságával behatóan foglalkozni és táblatokban a riasztó statisztikai adatokkal összefüggést keresni a preventív medicina részeként.

1.8. Az egészséges magyar lakosság Se státusának vizsgálata

1990 és 1993 között 161 egészséges, 5-től 15 éves korú magyar és 67 egészséges, azonos korú német gyermek, valamint 147, 16 - 60 éves korú egészséges magyar felnőtt Se státusát vizsgáltuk. A következő paramétereket mértük egy időben: Se koncentrációt a teljes vérben, plazmában, vörösvérsejtekben és glutathion peroxidáz enzim aktivitásokat a plazmában és vörösvérsejtekben.

A selenoenzimek méréséhez ma még nem léteznek nemzetközi standardok, az eredmények értékelhetőségét belső standardokkal és két különböző országból származó minták összehasonlításával végeztük. Mivel ugyanazon düsseldorfi laboratóriumban történtek az enzimaktivitás mérések mind a magyar, mind a német gyermekeknél azonos módszerekkel, az eredmények összehasonlíthatók, statisztikailag értékelhetők.

A vörösvérsejt Se koncentráció tartós Se ellátottságot jelez, mivel a vvs élettartama 120 nap körül van, tehát a mintavétel megelőző 3 hónap Se bevételre utal. A teljes vér Se koncentrációja átlagos Se ellátottságra utal, míg a plazma Se tartalma a mintavétel előtti néhány nap Se bevételére enged következtetni.

1.9. Insulin dependens diabetes mellitusban (IDMM) szenvedő gyermekek Se státusa

Az insulin dependens diabetes mellitus leegyszerűbben az insulin synthesis zavarát követő hyperglycaemiával és glucosuriával jellemezhető. Multicausalis kórkép, élesen nem különíthető el az I. és II. típus, a szabad gyökök képződése nemcsak kíséri a kórképeket, de a betegség kialakulásában is szerepet játszik. A betegség jól ismert rizikó faktorai a szövődményekként megjelenő kísérő kórképek. A diabetesesnek 25-ször nagyobb esélye van a vakságra, 20-szor gyakoribb a veseelégtelenség vagy végtag amputáció, 5-ször magasabb a coronaria vagy agyi erek ischemiája okozta károsodás. Mindezen szövődmények kialakulása pathológias biokémiai folyamatok láncolataival magyarázhatók.

A hyperglycaemia a szöveti proteinek glycatiójához vezet, a glucose autooxidatio hydrogén peroxidok, hydroxi-gyökök, fehérje-reaktív ketoaldehidek képzését segítik elő. Ezeket Maillard képződményeknek vagy "browned" proteineknek nevezzük. A hyperglycaemia emelkedett cholesterolin és egyéb lipid képződést indukál, emelkedett lipid peroxidáció, superoxid képződés, a lipoproteinek glycatiója mellett oxidatív DNA károsodást eredményezhet. A thrombocyták aggregatioja fokozott thromboxán synthesist és a prostacyclin aktivátorok képződésének a csökkenését eredményezheti.

A szabad gyökök okozta károsodások elleni védelem, azaz antioxidáns kapacitásunk magában foglalja a szövetek E vitamin (tocopherol), C vitamin (ascorbinsav), A vitamin (beta-carotin-retinol), a különböző metalloenzimek, így a glutathion peroxidázok és a Se szintjeit. Ezek biológiailag fontos hydrogén donorok és a thiol rendszer részét képező glutathion, melyek gyökfogyó képességgel rendelkeznek.

1.10. Selenium státus és zsíryanagcsere kapcsolata juvenilis insulin dependens diabetes mellitusban

Diabeteses és nem diabeteses gyermekekben egymástól eltérő biokémiai összefüggések észlelhetők. A diabetesesek között is jelentős különbségek vannak a therápia hatékonyságától, életkortól, tápláltsági állapottól, kísérő betegségektől függően. A plazma triglycerid koncentráció magasabb a diabetesesben, mint egészségesben, Se tartalommal

azonban csak az egészségesekben mutatkozik összefüggés. Pathológiás vérszír értékeket alacsony vér Se koncentrációk kísérik felnőtt diabetezesekben vagy atherosclerosisban szenvedőkben. Gyermekkorban ezen összefüggésekre vonatkozóan igen kevés adat létezik.

1.11. Szénhidrátokkal történő Se bevitel és teljes napi Se ürités a vizelettel diabetes mellitusos és egészséges gyermekekben

A humán táplálkozás legfontosabb Se forrásai a fehérjék. Ezen belül is a gabonafélékben, cereáliákban, szénhidrát alapanyagú élelmiszereinkben lévő Se-nek van a legmagasabb biológiai felhasználhatósága. A diabeteses étrend megkívánja az egészségesekénél magasabb szénhidrát és fehérje bevitelt, valamint alacsony zsírfogyasztást. A teljes Se bevitel mérésére nem volt módunk a Tápanyagtáblázatban hiányzó adatok miatt. Saját méréseket végeztünk a szénhidrát alapú legfontosabb élelmiszeripari termékeink Se koncentrációinak a meghatározásával. Az így kapott eredmények a napi Se bevitelnek közel egyharmadát tükrözik.

Jó Se ellátottság esetén a vizelettel ürülő Se mennyisége a táplálkozási szokásoktól függően viszonylag állandó. Nagyfokú Se bevitel esetén a vizelettel történő Se ürités emelkedik, intoxicatio esetén az uraemia megjelenéséig nő a selenuria. Hiányállapotokban értelemszerűen csökken a Se kiválasztás. Proteinuria növeli a vizelettel ürülő Se mennyiségét. A glucosuria Se üritést befolyásoló hatására nincsenek adatok.

II. Vizsgálati módszerek

2.1. Selenium meghatározás atomabsorptiós spectrophotometriával (AAS)

2.1.a. Biológiai mintavétel, mintaelőkészítés:

A vérvételek reggeli órákban, étkezés előtt, egészséges tanácsadón vagy szűrővizsgálatokon megjelenteknél vagy kisebb sebészeti beavatkozás előtt állóknál történtek. A diabetes mellitusos betegektől anyagszere biokémiai paramétereik ellenőrzésekor végeztük a mintavételeket. A felnőttek és a gyermekek szülei írásos beleegyezésüket adták a mintavételhez. Az érintett intézetek etikai bizottságai hozzájárulásukat adták. A minták egyszer használatos, nyomelemek mérésére alkalmas, Greiner típusú, polystirol, EDTA-t tartalmazó csövekben, a mintavételt követően legkésőbb 2 órán belül, hűtött körülmények között kerültek a laboratóriumba. A mintaelőkészítés lépései: a plazma centrifugálással történő szeparálása, több frakcióra osztása egyszer használatos, műanyag pipetták segítségével Eppendorf polystirol csövekbe, ezt követően a vörösvérsejtek háromszori mosása 0.9%-os NaCl-al. A minták tárolása $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt az analysis időpontjáig.

2.1.b. Se standard oldat: $c(\text{Se}) = 1.000 (0.002\text{ g/L, azaz SeO}_2\text{ 0.5mol/L-es HNO}_3\text{-ban oldva (Merck Darmstadt, Németország), 1000 (g/L-es koncentrációt), azaz 1000 ppm-et jelentett. Millipor desztillált vízzel ezen törzsoldatból 100 ppb-s hígítással oldatot készítetünk, mely egy héten belüli felhasználáskor stabil maradt. 20, 10, 7.5, 5, 2.5 és 1.25 ppb-s hígítási sort alkalmaztunk a kalibrációs görbe felvételéhez, triplikátban, minden mérési napon.$

2.1.c. Mintaelőkészítés, roncsolás az atomabsorptiós Se mérési módszerhez

A standard és vak minták azonos procedúrán estek át, mint a minták. 100- 100 μl vért vagy plazmát és 1-1 ml vizelet mintákat duplikátban analizáltunk. Perklórsav és salétomsav keverékéből (2 rész HClO_4 +5 rész HNO_3 , mindkettő Merck suprapur) 2-2 ml-t adtunk a mintákhoz a roncsolásos feltáráshoz magas hőtűrésű kvarcüveg, 10 ml volumenű csövekben. Melegítő blokkba helyeztük az összes mintát $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, 3 órás időtartamra. További hevítést végeztünk 1 óra alatt $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, ismét egy óra alatt $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra növeltük a hőmérsékletet, majd 30 perc alatt $195\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot értünk el, 20 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk a mintákat, majd hőálló állványokba helyeztük őket a teljes lehűlésig. 1 ml 15%-os HCL (Merck suprapur) hozzáadása után 10 percre $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hevítettük a mintákat, a reakció alatt a 6 vegyértékű Se 4 vegyértékűre redukálódott. 10 ml 1.5%-os HCL hozzáadása után került a minta az atomabsorptiós spectrophotometer analysisre.

2.1.d. Se mérés atomabsorptiós spectroscopiával

Perkin Elmer 1100 B atomabsorptiós spectrophotometert használtunk Perkin Elmer MHS-20-as hidrid feltétellel. EDL (electrodless discharge lamp) energiaforrással a sensitivitás növelése, alacsony koncentrációk pontos mérése érdekében. Paraméterek: hullámhossz: 196 nm, SBW: 2 nm, felfűtési hőmérséklet: $925\text{ }^{\circ}\text{C}$. Atomizáció előtti redukció: 3%-os bórhidriddel (NaBH_4 , Merck pro analysis) NaOH (Merck suprapur)-ban oldva.

A hidrid reakciós program: 35 secundum átáramoltatás hydrogennel, 8 secundumos reakcióidő, 30 secundumos öblítés argonnal, kvarcküvetta hőmérséklet $925\text{ }^{\circ}\text{C}$. Az atomizáció alatt a következő reakció zajlik:

$\text{Se}^{4+} + \text{BH}_4$ ($\text{SeH}_2 + \text{H}_2 + \text{B}_2\text{H}_6$) végül a SeH_2 , Se-re és H_2 -re bomlik. A minták Se koncentrációit a standard extinkciók alapján (csúcs alatti terület), Windows alapú software segítségével számítottuk ki.

2.2. Ételminták Se tartalmának mérése instrumentális neutron aktivációs analysissel (INAA) és gamma-spectroscopiával

2.2.a. Mintavétel, mintaelőkészítés:

A neutronaktivációs analitikai vizsgálatokhoz - tekintettel a besugárzás helyén fennálló hőmérsékleti és sugárzási viszonyokra - a biológiai eredetű mintákat vízmentesíteni kell. Ennek a követelménynek a liofilizálással történő mintaelőkészítés eleget tesz. A gabonaféléket, liszteket, kenyérmintákat, tesztaféléket, rizst 100-150 g-os aliquot részletekben homogenizáltuk (Homogenizátor BLENDER HGB 50-E, WARING, USA) majd meghatároztuk azok nedvességtartalmát, amely 0.5-2 % között változott.

A liofilizált, finomszemcse eloszlású mintákat szárítószekrényben $80\text{ }^\circ\text{C}$ -on 48 órán keresztül, majd ezt követően $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on 8 órát tömegállandóságig szárítottuk. A mintákat a besugárzásokhoz nagytisztaságú SUPRASYL kvare mintatartó tokba mértük be, amelyet előzőleg 10%-os HF-os maratással illetve ioncserélt vízzel történő mosással tisztítottunk. A vizsgálatokhoz felhasznált minták tömege 200 -250 mg között változott. A besugárzás után a kvarc tokokat felületi (10%-os HF-os) maratással tisztítottuk, majd ezt követően történt az aktivált minták gamma-spektroszkópiai mérése.

2.2.b. Se mérés INAA módszerrel

Neutronbesugárzás: A selenium aktivációs analitikai meghatározására alkalmas lehetőségek közül a ^{75}Se hosszú felezési idejű ($T_{1/2} : 119.8$ nap; $E_\gamma : 136.0$ keV, 264.7 keV, a legjellemzőbb energiaértékek) izotópot felhasználva, roncsolásmentes neutronaktivációs analitikai módszert alkalmaztunk a Se tartalom meghatározására. A besugárzásokat a **KFKI Atomenergia Kutató Intézet Kutatóreaktorában** (WWR-M típusú, 10 MW) végeztük. A vizsgálatokhoz 24-48 órás aktiválási időket választottunk. A besugárzásokhoz a reaktorzóna két külső függőleges csatornáját használtuk a gyorsneutronok zavaró hatásának mérséklése céljából. A besugárzási pozíciókban a termikus neutronfluxussűrűség átlagosan 8.1×10^{13} $\text{n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a termikus/epitermikus neutronfluxus-arány: 52 volt, amelyet Zr fluxusmonitorral határoztunk meg. A Se koncentráció meghatározására egyidejűleg, a mintákkal azonos körülmények között, ismert tömegű ($w=100$ ng) szelén standardot (Merck, Darmstadt, Németország) is felaktiváltunk.

Gamma-spektroszkópiai mérés: A biológiai eredetű minták általában nagy koncentrációban tartalmaznak nátriumot, clórt, brómot és phosphort. Az általunk vizsgált minták esetében, elsősorban a neutronbesugárzás hatására keletkező ^{32}P izotóp zavaró aktivitásával kell számolni. A ^{32}P izotóp ($T_{1/2} : 14.28$ nap) nagyenergiájú ($E_\beta : 1.72$ MeV) béta-sugárzásából származó fékezési röntgensugárzása zavarhatja a ^{75}Se mérését és kiértékelését. Mivel a ^{75}Se felezési ideje többszöröse a ^{32}P izotóp felezési idejének, optimális mérési és hűtési idők alkalmazásával a Se roncsolásmentes, nagyérzékenységű meghatározása elvégezhető.

A minták **gamma-spektroszkópiai mérését** 40 - 90 napos hűtési idők után végeztük, 15 illetve 20 órás mérési időket alkalmaztunk. A zavaró hatás jelentős mértékben csökkenthető a detektorra helyezett 20 mm vastagságú absorbens (plexi-szűrő) alkalmazásával. A gamma-spektroszkópiai méréseket CANBERRA Ge(Li) félvezető

detektorral (energia-felbontása 1.82 keV a ^{60}Co izotóp 1332.5 keV-es vonalára) és hozzá kapcsolódó gamma-spektrométerrel végeztük. A spektrométer holtidejéből eredő számlálási veszteségeket pulzertechnika alkalmazásával korrigáltuk.

Gamma-spektrumok kiértékelése, koncentráció számítás: A gamma-spektrumok kiértékelése a HYPERMET-PC programmal történt. Ez a kiértékelés magában foglalja az automatikus csúcskeresést, energia-kalibrálást, a háttérrel korrigált csúcsterületek és azok hibáinak számítását. A mintában lévő Se koncentrációt ismert tömegű szelén standard aktivitásának ismeretében számítottuk.

2.3. Referencia anyagok mindkét Se mérési módszerhez

Human teljes vér: Seronorm TM Nycomed, Oslo, Norvégia. Referencia érték: 90 $\mu\text{g Se/L}$, általunk mért érték ($M \pm SD$): 90.4 \pm 1.2 $\mu\text{gSe/L}$, n=115)

Wheat Flour NIST SRM 1567a (US Department of Commerce): Referencia érték: 1100 \pm 200 $\mu\text{gSe/kg}$, általunk mért érték: 1195 \pm 78 $\mu\text{gSe/kg}$ (n=16)

Rice Flour NBS SMR 1568 (Gaithersburgh, MD, USA): Referencia érték: 400 \pm 100 $\mu\text{gSe/kg}$, általunk mért érték: 369 \pm 21 $\mu\text{gSe/kg}$ (n=5).

Total Diet NIST SRM 1548 (US Department of Commerce): Referencia érték: 245 \pm 5 $\mu\text{gSe/kg}$, általunk mért érték: 240 \pm 14 $\mu\text{gSe/kg}$ (n=5)

Bovine Liver NBS 1577a, (Gaithersburgh, MD, USA). Referencia érték: 710 \pm 70 ng Se/g, általunk mért érték: 707 \pm 11 ng Se/g (n=63)

Bovine Liver NBS 1577, (Gaithersburgh, MD, USA). Referencia érték: 1140 \pm 60 ng Se/g, általunk mért érték: 1100 \pm 100 ng Se/g (n=5)

IAEA A-13 Freeze-dried Animal Blood (Nemzetközi Atomenergia Ügynökség, Bécs, Ausztria) Referencia érték: 240 ng Se/g, általunk mért érték: 238 \pm 18 ng Se/g (n=8)

Freeze-Dried Urine (NIST SRM 2670, Gaithersburgh, MD, USA) Referencia érték: 0.030 \pm 0.008 ($\mu\text{gSe/ml}$, általunk mért érték: 0.032 \pm 0.009 $\mu\text{gSe/ml}$ (n=18)

Non-Fat Milkpowder NBS (Gaithersburgh, MD, USA). Referencia érték: 0.11 \pm 0.01 $\mu\text{gSe/g}$, általunk mért érték: 0.114 \pm 0.003 $\mu\text{gSe/g}$ (n=22)

2.4. Belső pool minták Se meghatározáshoz

Humán, kevert teljes vér: 85.6 \pm 4.23 ngSe/ml koncentrációval 2.8 %-os variációs koefficienssel adott egy mérési napon belül (n=15) és 4.1%-ot ért el meghatározások között (n=152).

Humán, kevert plazma: 75.4 \pm 3.41 ngSe/ml koncentrációnál 2.9 %-os variációs koefficienssel eredményezett egy napon belül (n=12) és 3.9%-ot ért el különböző mérési napok között (n=156).

2.5. Összehasonlító Se mérések INAA és AAS módszerrel

Az OTKA I/3 (nytsz:2983) és az OMF (Projekt 28) támogatásában a Düsseldorf Heinrich-Heine Egyetem Gyermekklinikájának anyagcsere laboratóriumával való együttműködés során összehasonlító Se méréseket végeztünk azonos mintákból instrumentális neutron aktivációs analysissal és atomabsorptívós spectroscopiai módszerrel. A kétféle mérés eredményei között szoros lineáris összefüggést tapasztaltunk, az r értéke 0.83-nak adódott. Az ugyanazon

mintából Düsseldorfban és Budapesten, kétféle módszerrel végzett mérésekkel kapott értékek között az elérések 10% alattinak bizonyultak.

2.6. Glutathione peroxidáz enzim (E.C.1.11.1.9.) meghatározás

A plazmában Flohé és Günzler (1984) módszere szerint végeztük, az aktivitás értékeit U/L értékben adtuk meg. A vörösvérsejtekben Wendel (1981) módszerét alkalmaztuk, az aktivitási értékeket 1 g haemoglobinra vonatkoztattuk (U/gHb). Mindkét módszer úgynevezett kapcsolt test rendszernek tekinthető, mely 37 °C-on stabil. Plazma esetében a hígítás 1:20-hoz, a vörösvérsejt lyzátumot cyanmethaemoglobinná alakítva 1 g Hb/L-re állítottuk be. A donor substrát glutathion (GSH, $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ Boehringer GmbH Mannheim, Németország) koncentrációt 1 mMol/L-re állítottuk be. Az akceptor substrát t-BOOH (Sigma) volt a plazma aktivitás mérésekor és H_2O_2 (Sigma) a vörösvérsejt analysisikor. A koncentrációkat 1.2 és 2.5 mMol/L-re állítottuk be. Indikátor substrátként NADPH-t ($C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$, Boehringer GmbH Mannheim, Németország) alkalmaztunk 0.25 mMol/L koncentrációban. Az indikátor enzim glutathion redukáz (élesztő suspensio, Boehringer GmbH Mannheim, Németország) volt mindkét mérési módszerben, a plazmában 240 U/L, a vörösvérsejtekénél 600 U/L koncentrációban.

2.7. Belső pool-ok a glutathion peroxidáz enzimaktivitások méréséhez

Sem a klasszikus celluláris, sem a plazma glutathion peroxidáz mérésekhez nem létezik még nemzetközi standard referencia anyag. Emiatt kétféle (magas és alacsony) kevert pool mosott vörösvérsejt és plazma aliquotokat készítettünk, saját standardként alkalmaztuk minden assayben. A plazmában 85 ± 4.2 és 121 ± 5.1 U/L értékek egy napon belül 3.3 % (n=25 és 17), napok között 5.1% (n=116 és 108) variációs koeficiienst mutattak. A vörösvérsejt pool-ok 4.8 ± 0.5 és 6.7 ± 0.3 U/gHb értékei egy napon belül 3.4% (n=19 és 28), mérési napok között 5.6 % (n=102 és 121) variációs koeficiienst eredményeztek.

2.8. Biokémiai paraméterek mérési módszerei

A plazma glucose meghatározást glucose oxidáz módszerrel, a plazma triglycerideket, cholesterint, phospholipideket kit-ek (Boehringer GmbH Mannheim, Németország), a vizelet creatinint Merkotest (Merck, Darmstadt, Németország) segítségével határoztuk meg. A HDL-cholesterint phospho-wolframát és $MgCl_2$ segítségével precipitáltuk (Sera-pack Reanal-Miles Olaszország), centrifugálást követően supernatánst spectrophotometeren mérjük (Unicam, Anglia). Minőségi kontrollként Precilip E.L. (Boehringer GmbH Mannheim, Németország) kit-et alkalmaztunk. A retinol és tocopherol szinteket HPLC (Water model 501) U6K injektorral, 30 cm-es oszlopokon mértük.

2.9. Statisztikai analysis

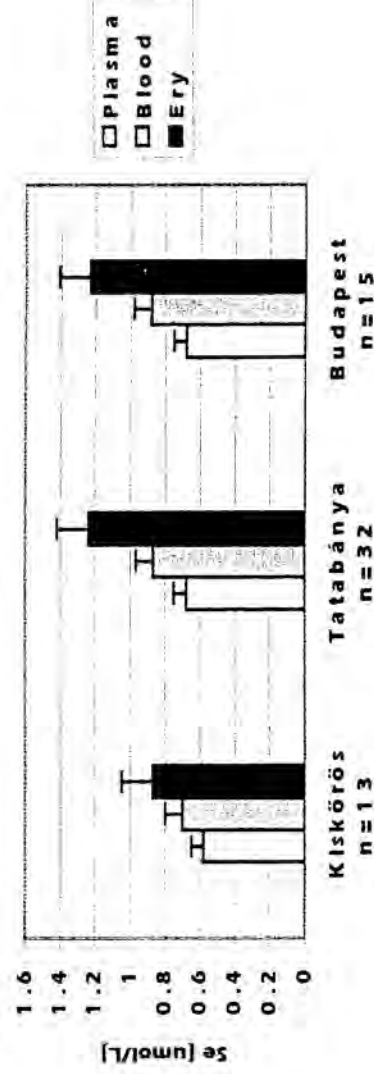
Az adatok matematikai kiértékelését SpSSTM computer programmal végeztük, melyben páros és páratlan Student T testeket, Wilcoxon testeket, lineáris regressziós analysiseket alkalmaztunk.

III. Vizsgálati eredmények

3.1. Egészséges gyermekek Se státusának összehasonlítása három, magyar földrajzi régióban

5-től 15 éves korú Budapesten, az iparilag szennyezett levegőjű Tatabányán és egy mezőgazdasági kisvárosban, Kiskőrösön élő gyermeket vizsgáltunk. Teljes vérben és plazmában mértük a Se koncentrációt. A vörösvérsejtek Se koncentrációit a haemoglobinin és haematokrit értékek ismeretében számoltuk ki. A haematológiai indexek normális, kornak megfelelő értékeket mutattak mindhárom városban élőkkben. Irodalmi adatok amellett szólnak, hogy a vér Se státust a geológiai környezet, az életkor és a nem befolyásolhatja. Az eredményeket három korcsoport szerint 1-5, 6-10 és 11-15 éves korúaknál analizáltuk. A 6-10 éves és 11-15 éves kiskőrösi gyermekek mindhárom vör Se paramétere szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Tatabányán vagy Budapesten élőké. A humán Se státust elsősorban a táplálékkal felvett Se mennyisége határozza meg. Felmerül annak a lehetősége, hogy a Se kínálat alacsonyabb lehet az alföldi régióban, mint a hegyekkel körülvett, más talaj Se koncentrációt mutató földrajzi régiókban. A következő ábrán (1.ábra) a 6-15 éves korcsoportú, 3 különböző régióban élő gyermekek Se paramétereit mutatjuk be.

Vörösvérsejt, teljes vér és plazma Se koncentrációk egészséges gyermekekben



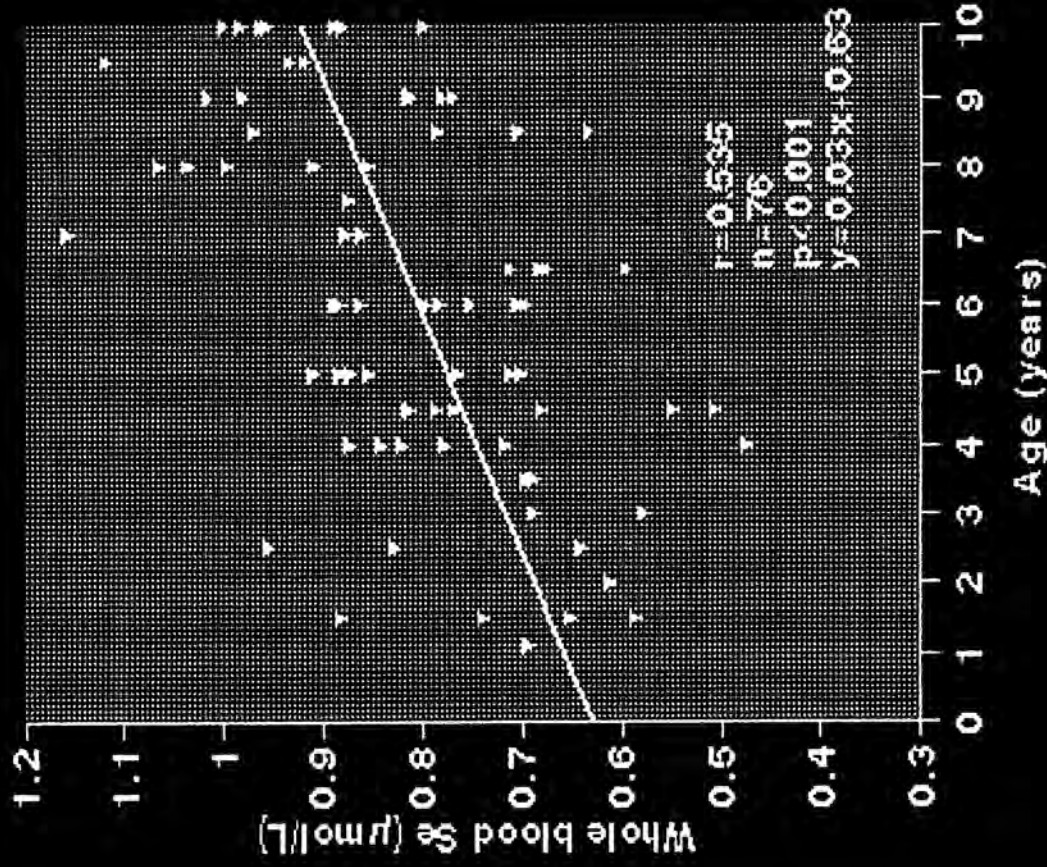
1. ábra

A fiúk Se értékei magasabbak voltak, mint a lányoké, a különbségek azonban nem érték el a szignifikancia fokát. Egy és 10 éves kor között az életkorral egyenes arányban emelkedett mind a teljes vér (2. ábra), mind a plazma Se (3. ábra) koncentrációja a budapesti és tatabányai gyermekekben. A legalacsonyabb Se értékeket mutató kiskőrösi csoportban ilyen összefüggést nem találtunk.

3.2. Egészséges magyar gyermekek Se státusának összehasonlítása európai adatokkal

Nemzetközi adatokhoz hasonlítva az egészséges magyar gyermekek Se státusa hasonló a Zágrábban, Skopjében, Belgrádban, Splitben, Tesselonikiben élő gyermekekéhez és szignifikánsan alacsonyabb, mint német (saját megfigyelés), angol, finn, francia, belga, holland és olasz gyermekekben.

Children from Tatabánya and Budapest

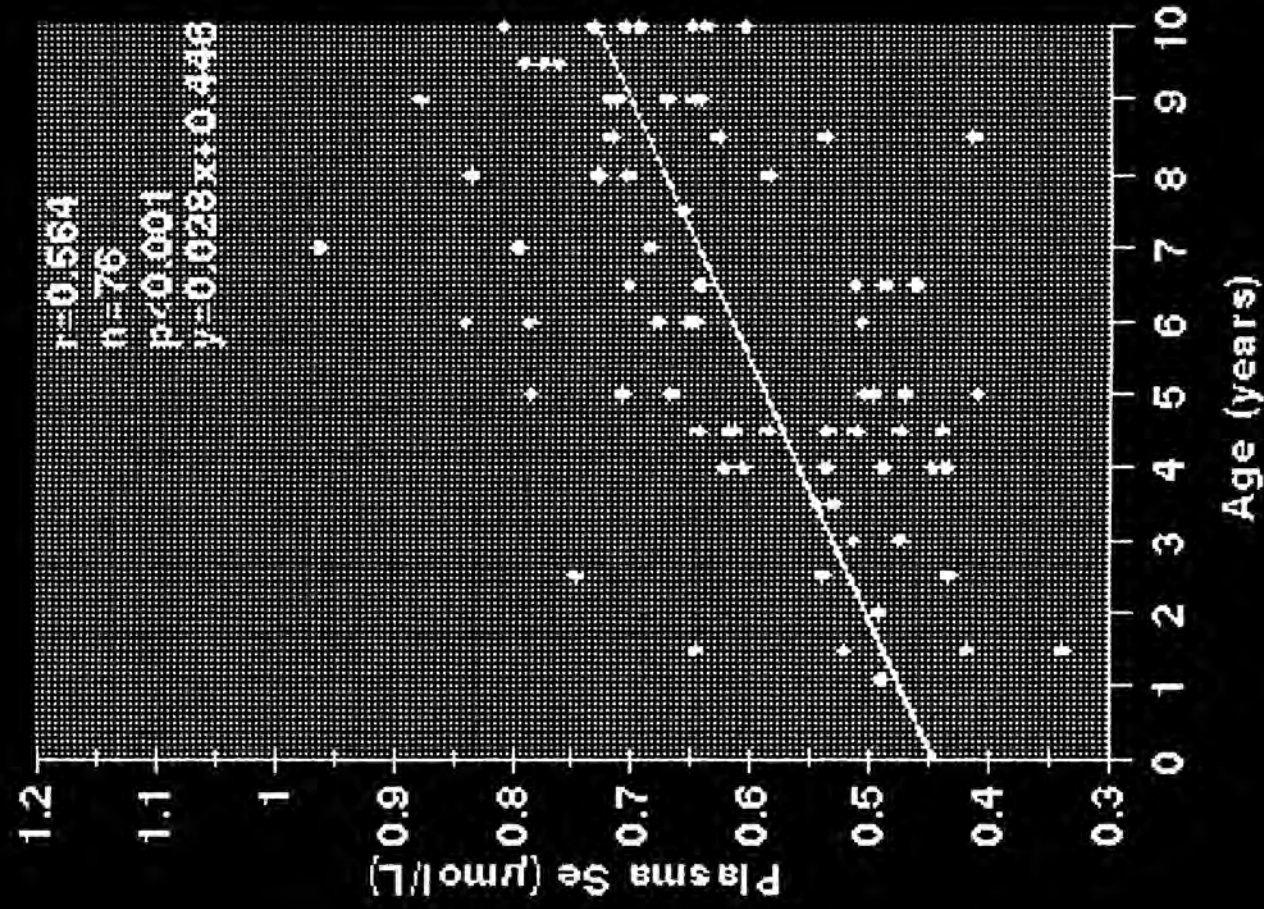


2. ábra

3.3. Egészséges gyermekek plazma és vörösvérsejt glutathion peroxidáz (GSH-Px) aktivitásainak összehasonlítása három, magyar földrajzi régióban

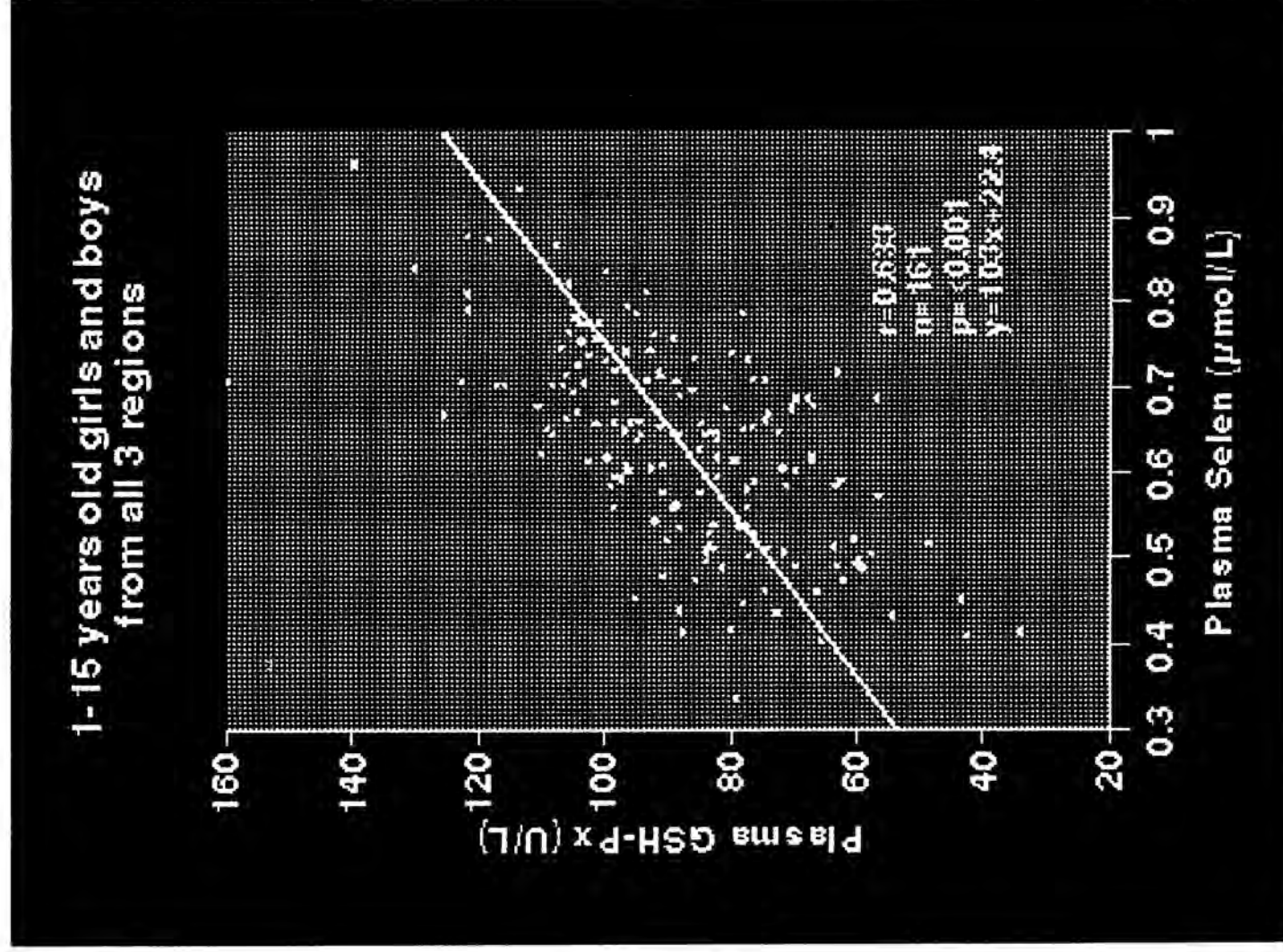
Mindkét enzim aktivitása az életkorral növekedett, a legfiatalabb gyermekek értékei significánsan alacsonyabbak voltak, mint a 6-15 éves korúaké. A fiatalabb korcsoportok között regionális különbséget nem észleltünk. A másik két korcsoportban a kiskorú gyermekek vörösvérsejt GSH-Px értékei voltak a legmagasabbak, akiknél a legalacsonyabb Se paramétereket mértük. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy ezek a gyermekek feltehetően huzamosabb ideig kevesebb Se-t vettek magukhoz, vagy az ezen régióban használt élelmiszerek biológiai hasznosulása alacsonyabb. Mindhárom régióban élő gyermekekénél a plazma Se koncentrációja és a plazma GSH-Px aktivitása között szoros lineáris összefüggést észleltünk (4. ábra). Ilyen összefüggést egészséges

Children from Tatabánya and Budapest



3. ábra

emberekben csak szelénhiányos talajjal rendelkező országokban, alacsony Se kínálat esetén írták le, pl. Kínában, Újzélandban. Megerősíti ezt az a tény is, hogy szoros összefüggés észlelhető a tatabányai és budapesti gyermekek vörösvérsejt Se tartalma és enzimaktivitása között is (5. ábra).



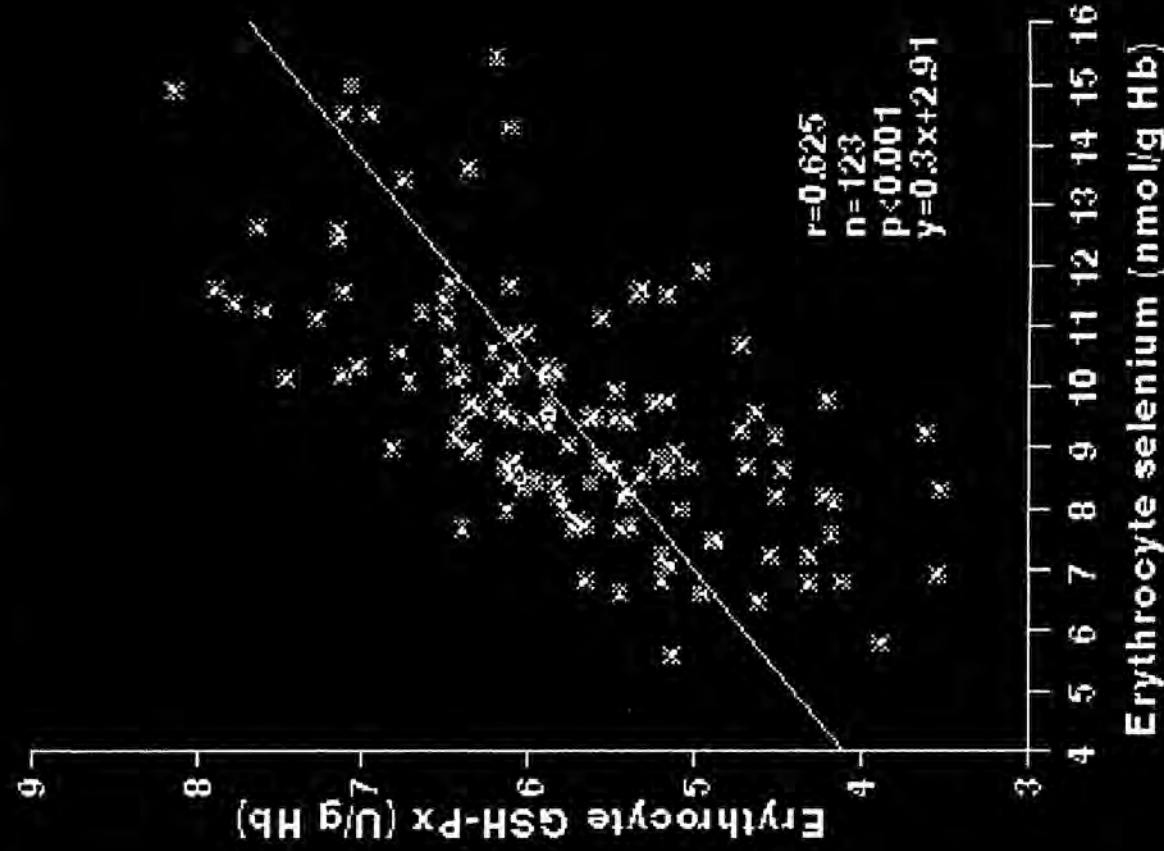
4. ábra

3.4. Egészséges magyar és német gyermekek plazma és vörösvérsejt GSH-Px aktivitási értékeinek összehasonlítása

Az enzimaktivitás számszerű értékeit nemzetközi standardok hiánya miatt nem lehet összehasonlítani más országban élő gyermekek adataival. Hasonlítást végezhetünk azonban az általunk mért, azonos mérési módszer (konstans redukált GSH koncentráció) és azonos belső pool referenciák alkalmazásával hasonló korú német gyermekek enzimaktivitási értékeivel. Ezek minden korcsoportban signifikáns különbséget mutattak a magyar gyermekek rovására. Az összes, azonos nemzethez tartozó gyermekeket egy csoportnak véve a plazma

GSH-Px 90 ± 19 U/L (n=161) volt a magyarokban és 122 ± 23 U/L (n=67) a németekben (p<0.01). A vörösvérsejt GSH-Px aktivitás 5.8 ± 0.9 U/gHb (n=161) volt a magyarokban és 6.5 ± 1.4 U/gHb a német gyermekekben (p<0.05). Az eredmények arra utalnak, hogy alacsonyabb Se státusz alacsonyabb enzimaktivitásokat eredményez.

1-15 years old girls and boys from Tatabánya and Budapest



5. ábra

3.5. Az egészséges, 16 - 60 év közötti lakosság Se státusa

3.5.1. Se paraméterek és ezek hasonlítása más európai országok felnőtt lakosságának értékeivel

A vér/plazma Se arány 1.28 ± 0.13 -nak adódott, mely hasonló a lengyelekben mért értékekhez de lényegesen alacsonyabb, mint német felnőttekben. A vörösvérsejtekben mért Se koncentrációk minden életkorban alacsonyabbak a vártánál és abszolút értékekben hasonlóak, mint más európai országok lakosságának a teljes vér Se értékei. A magyar felnőttek átlagos teljes vér Se koncentrációja 1996-ban a legalacsonyabb volt Európában. Ami az életkorral történő változást illeti a 21-30 évesek Se paraméterei a legmagasabbak és feltűnő csökkenés észlelhető 50 éves kor felett. Az átlagos plazma Se koncentrációk Bulgáriában és közép Szerbiában hasonlóan alacsonyak, mint a mi adataink, a többi európai országban magasabb koncentrációkat mértek. Míg gyermekkorban a nemek között nem volt különbség, az egész populációra vonatkozóan a férfiak-fiúk mindhárom Se paramétere magasabb, mint a leányoké-nőké.

3.5.2. Az egészséges, 16-60 éves lakosság GSP-Px aktivitási értékei

A plazma GSH-Px enzim aktivitás a 16- 20 éves korban a legmagasabb, 20-40 éves kor között nem változik, majd csökkenés észlelhető. A felnőttek értékei átlagosan 35 %-al magasabbak, mint a gyermekekben mért értékek. 16-50 éves kor között a nők plazma enzim aktivitási értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a férfiaké. A vörösvérsejt GSH-Px aktivitás szintén magasabb a felnőttekben, mint a gyermekekben. A nők értékei magasabbak, mint a férfiaké hasonlóan más országok megfigyeléséhez. Indirekt Se hiánya, magasabb Se igényre utal azonban a 21-30 éves, reproduktív életkorban lévő nők vörösvérsejt GSH-Px aktivitás értékei, melyek alacsonyabbak, mint a hasonló korú férfiaké.

IV. Insulin dependens diabetes mellitus

4.1. Diabetes mellitusban szenvedő és egészséges gyermekek klinikai paramétereinek összehasonlítása

A klinikai paraméterek között nincs különbség, a control csoport kiválasztása megfelelőnek bizonyult (1. táblázat).

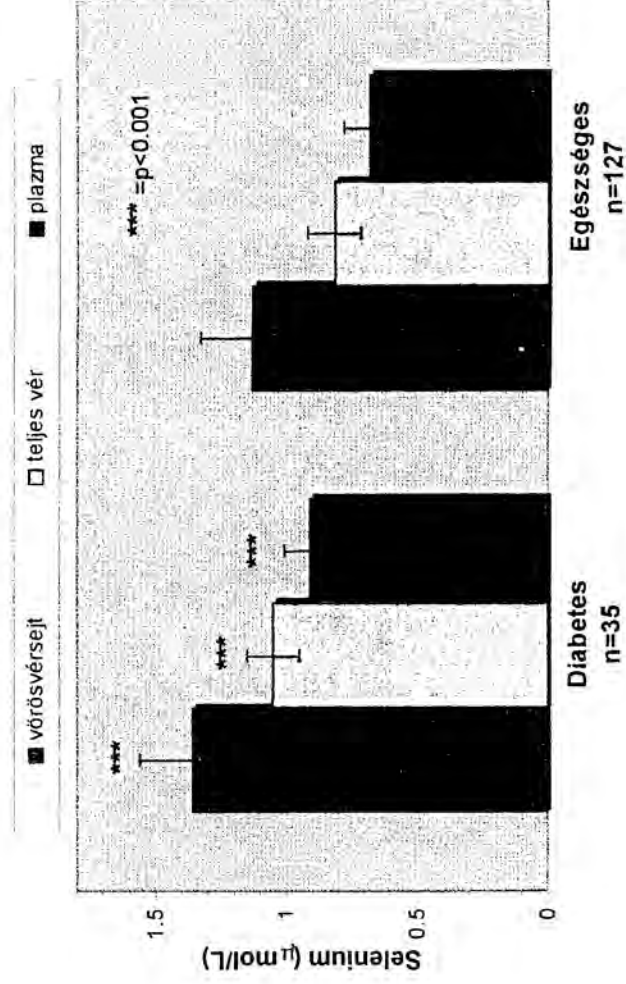
Paraméterek	Diabetesesek	Egészségesek
Esetszám	35	127
Medián életkor (évek)	13.2	12.9
Életkor range (évek)	6 -17	6 -17
Fü / leány n=	18 / 17	67 / 60
Testsúly percentilis	25 - 97.5	25 - 90
Testmagasság percentilis	25 - 97.5	25 - 90
Haemoglobin g/L M±SD	136 ± 7.8	134 ± 3.2
Haematokrit % M±SD	40.4 ± 2.5	38.5 ± 2.9

1. táblázat

4.2. Insulin dependens diabetes mellitusban szenvedő és egészséges gyermekek Se státusának összehasonlítása

A 6. ábra a vörösvérsejtek, teljes vér és plazma Se koncentrációk átlagait és SD értékeit mutatja a diabeteses (n=35), valamint kor és nem szerint kiválasztott egészséges (n=127) gyermek csoportokban. A diabetesesek értékei szignifikánsan magasabbak, mint a nem diabeteseseké. Korábban német gyermekeken tett megfigyelések ugyanilyen különbségeket mutattak a diabetesesek javára.

Se koncentrációk (M±SD) összehasonlítása diabetes mellitusos és egészséges, 6-17 éves gyermekek vérparamétereiben



6. ábra

4.3. Insulin dependens diabetes mellitusban szenvedő és egészséges gyermekek GSH-Px aktivitásainak összehasonlítása

A plazma GSH-Px aktivitása 110 ± 21 U/L olt a diabetesesekben, significánsan magasabb ($p < 0.001$), mint az egészségesekben, ahol ez 90 ± 19 U/L volt csupán. Vörösvérsejtekben az enzimaktivitás statisztikailag nem volt különböző.

4.4. Lipid és lipoprotein paraméterek insulin dependens diabetes mellitusos és egészséges gyermekekben

A vérzsír értékek milyenségét a testsúly döntően befolyásolja. Diabetesesek között obes nem volt, egy gyermek hossz és súly adatai 10 % alattiak voltak. Az egészségesek ($n=127$) testsúly értékei 25-90 % között változtak, normál distribúciót mutatva. Az összlipid értékek normál határon belüliek voltak és nem mutattak különbséget a beteg és egészséges csoportok között. Ebből arra lehet következtetni, hogy a diabeteses gyermekek insulin kezelése megfelelőnek ítéltető meg. A plazma koleszterin és phospholipid szintek nem különböztek, diabetesesekben a trigliceridek magasabb, a HDL-cholesterinek alacsonyabb értékeket mutattak. (2.táblázat)

4.5. A és E vitamin szintek diabeteses és egészsége gyermekekben

Az A vitamin (retinol) és E vitamin (tocopherol) szinteket 35 diabeteses és 38 hasonló korú és nemű gyermeknél határoztuk meg. Az E vitamint az étrendben előforduló egyik leghatékonyabb, természetes, zsírban oldódó antioxidánsnak tartják, mely a sejtmembrán

többszörösen telítettlen zsírsavak oxidációját gátolja, protonokat nyújt a szabad gyökökhoz, meggátolva az oxidatív stressz indukálta sejtmembrán károsodást, vagy lysis-t. A Se antioxidáns, protektív hatásaihoz hasonlóan az E vitamin is gátolja a lipid peroxidációt, a celluláris antioxidáns kapacitás részének tekintendő. Mind a microangiopathia mind a macroangiopathia pathogenesisében szerepet játszik a vér tocopherol koncentrációja, a diabeteses retinopathia és atherosclerosis megelőzésének egyik faktora. A diabeteses gyermekek E vitamin koncentrációja magasabbnak bizonyult, mint az egészségeseké (2. táblázat).

Paraméterek (M ± SD)	Diabetesesek	Egészségesek
Cholesterin (mmol/L)	4.51 ± 0.89	4.22 ± 0.71
HDL- cholesterin (mmol/L)	1.78 ± 0.37***	2.02 ± 0.34
Triglycerid (mmol/L)	0.62 ± 0.04***	0.39 ± 0.11
Phospholipid (mg/dl)	204 ± 50	197 ± 29
Total lipid (mg/dl)	434 ± 89	387 ± 53
Retinol (µmol/L)	1.66 ± 0.48*	1.87 ± 0.51
Gamma tocopherol (µmol/L)	1.22 ± 0.51*	1.07 ± 0.34
alpha tocopherol (µmol/L)	18.01 ± 4.71***	12.76 ± 2.59
Total tocopherol (µmol/L)	19.21 ± 4.89***	13.92 ± 2.69
alpha tocopherol/ total lipid (mg/g)	1.86 ± 0.37	1.44 ± 0.35
Total tocopherol/ total lipid (mg/g)	1.97 ± 0.38***	1.56 ± 0.25

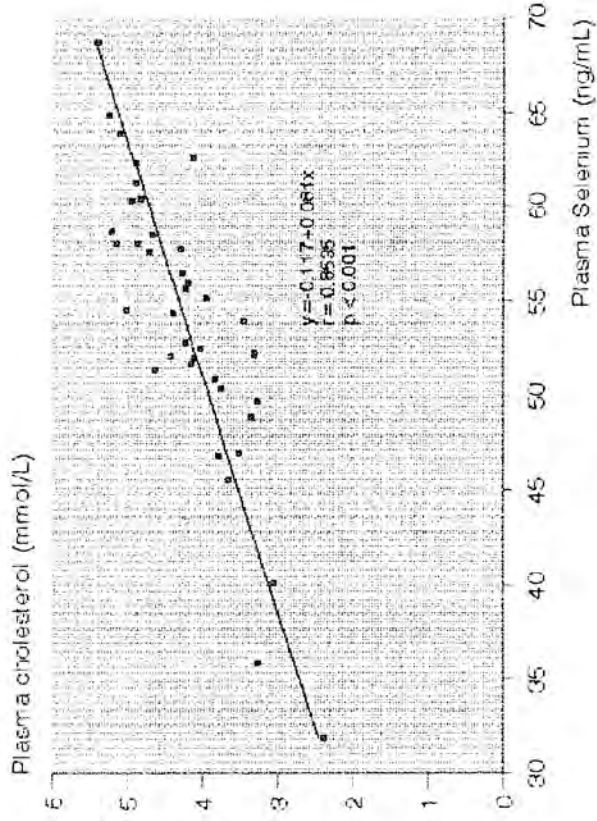
signifikancia * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ diabeteses egészségeshez hasonlítva

2. táblázat

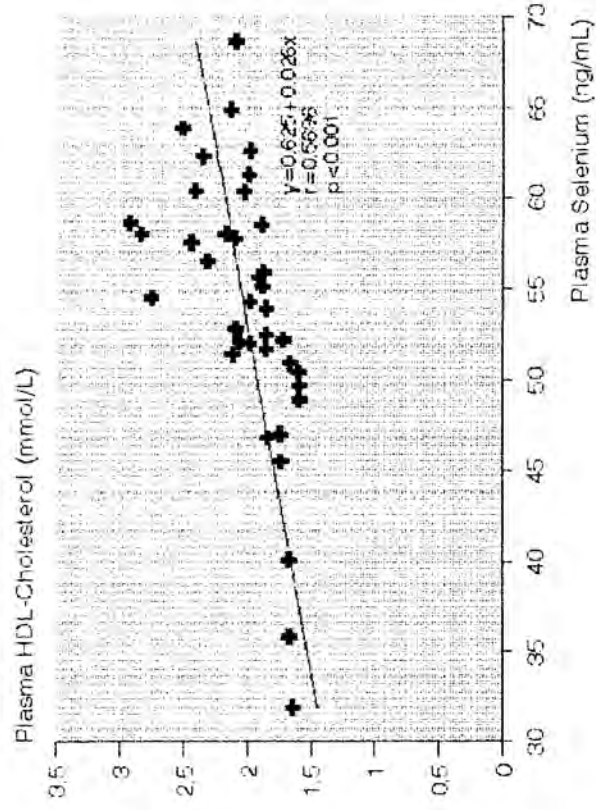
Magyar referenciaként egy csupán 10 egészséges gyermek adatait tartalmazó pécsi közlemény áll rendelkezésre (Decsi T., Molnár D., Koletzko B.: Reduced plasma concentrations in alpha-tocopherol and beta-carotene in obese boys J.Ped.1997,30), melyhez hasonlítva a saját egészségeseink átlagos E vitamin szintje alacsonyabb. Mindezek alapján csupán az a következtetés vonható le, hogy a diabeteses diéta magasabb E vitamin vér szinteket eredményezett. Az összlipid koncentrációra vonatkoztatott tocopherol arány is emellett szó, a teljes lipid és tocopherol koncentrációk között szoros lineáris összefüggést észleltünk ($r = 0.61$ $n=35$, $y=0.29x+197$). Az A vitamin (retinol) biológiai funkciói sokrétűek, növekedésben, reprodukcióban és a látásélesség folyamataiban történő részvétele a legismertebb. Valószínűleg funkciója van a cukor residuumok transzportjában, a sejt differenciálódásban (glycoprotein szintézist stimulál) és a cukrok catalysisében, sejtmembránok interakciójában. A diabetesesek A vitamin koncentrációja alacsonyabb volt, mint az egészségeseké, melynek a hátterében különböző összetételű zsírok és olajok fogyasztása feltételezhető. A 2. táblázatban feltüntettük a számszerű eredményeket.

4.6. Lipidek, lipoproteinek, glucose, Se és GSH-Px-ek kapcsolata egészséges és diabeteses gyermekekben

Szoros, lineáris összefüggést észleltünk az egészséges gyermekek plazma Se koncentrációja és cholesterin tartalma ($r=0.85$, $n=38$, $p < 0.001$, 7.ábra), HDL-cholesterin szintjei ($r=0.56$, $n=38$, $p < 0.001$, 8.ábra) valamint triglycerid tartalma ($r=0.77$, $n=38$, $p < 0.001$) között.

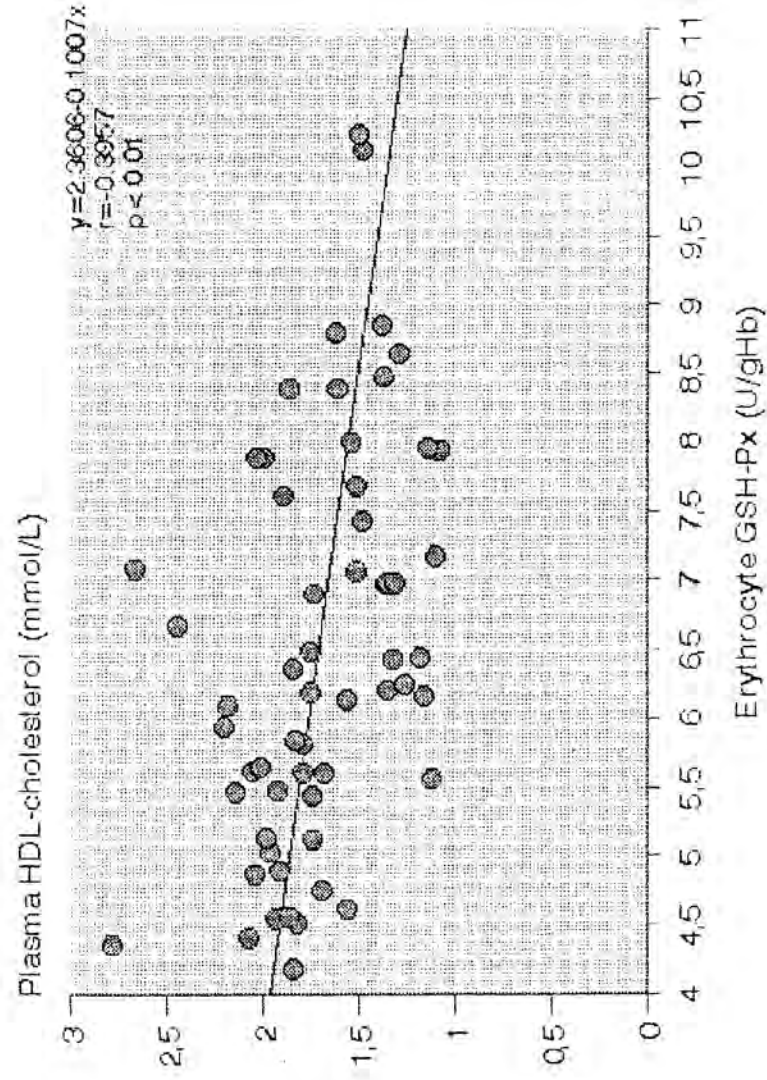


7. ábra



8. ábra

Hasonló összefüggéseket a betegekben nem észleltünk. Diabetesekben a plazma GSH-Px aktivitás nemcsak a plazma Se koncentrációval ($r=0.59$, $n=35$, $p<0.01$), de a mintavétel napján mért vércukorprofil értékekkel is ($r=0.56$, $n=56$, $p<0.001$) pozitív, lineáris összefüggést mutatott. A vörösvérsejt GSH-Px aktivitás pozitívan korrelált a triglyceridekkel és negatív korrelációt mutatott a HDL-cholesterin szintekkel (9. ábra). Következtetésként megállapíthatjuk, hogy a diabeteses egyénekben a Se-lipid kötődés és az enzimaktivitások mértéke lényegesen különbözik az egészségesekben észleleltétől. A Se transportban és a GSH-Px-ek szintézisében résztvevő lipoproteinek viselkedését a glycatió mértéke minden valószínűséggel jelentősen változtatja.



9. ábra

V. Élelmiszer analízisek

5. Szénhidrát alapú élelmiszerek Se tartalma

Az alacsony humán Se status alapján feltételezhető, hogy tápanyagaink Se tartalma is alacsonyabb a kívántnál. Ismeretes, hogy a Se status a Se bevitel, elsősorban az élelmiszerek Se kínálata nagymértékben meghatározza. Az élelmiszerek Se tartalmát több tényező is befolyásolja, növényi eredetű élelmiszerek esetén alapvetően a termőtalaj Se tartalma illetve a Se kémiai formája a meghatározó. Az átlagos talajokat 0.1-2 mg/kg, a Se hiányosnak tartottakat pedig 0.1 mg/kg koncentráció jellemzi. Vonatkozó irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a hazai talajminták több mint 90%-ában 0.1 mg/kg -nál kisebb a Se tartalom. A talaj alacsony Se tartalma miatt a haszonnövények és az alapvető élelmiszerek Se tartalma is alacsony. Növényekben a Se hiányt általában 0.1 mg/kg alatti koncentráció jelzi. A gabonafélékben, fűvekben rendszerint a 30 mg/kg-ot nem haladja meg a Se tartalom, átlagosan azonban 0.05-1 mg/kg koncentrációk mérhetők.

A tanulmány keretében első lépésként a magyar étkezési szokásokhoz igazodva a napi kalóriabevitel zömét jelentő szénhidrátok Se tartalmát vizsgáltuk. A vizsgálatokat kiterjesztettük néhány jellegzetes, az állati takarmányozásban is jelentős mezőgazdasági termék, a különböző búzafélék, árpa, rozs, lucerna, zab, repce, kukorica, napraforgó és szója selénszintjének meghatározására is.

Az eredményeinket több európai ország adataival összehasonlítva megállapítható, hogy a termények nagy része Se-ben szegény. Az élelmiszereket tekintve egyik legfontosabb Se forrásnak a gabonafélék és az ebből készült termékek tekinthetők, ugyanis a Se biológiai hasznosulása az emberi szervezet számára a gabonafélék fogyasztásával igen magas, közel 80 %. Mivel a magyar lakosság táplálkozásban a legfontosabb helyen szerepel a különböző kenyér- és tésztafélék fogyasztása, ezért tartottuk fontosnak, hogy elsőként ezen termékek szeléntartalmát mérjük. Az alapvető szénhidrát tartalmú élelmiszer alapanyagokban alacsony Se tartalmat mértünk. Gabonaféléink, egyéb mezőgazdasági termények, különböző kiőrlésű búza- és rozslisztek, kenyerek, tésztafélék Se koncentrációi szintén alacsonyabbak az európai átlagnál (3. táblázat). A táblázatban az egyes mintákban mért Se koncentrációk átlagértékeit, valamint a mérési eredmények hibáit (SD%) tüntettük fel. Ha feltételezzük, hogy a humán táplálékfelvételnél körülbelül a fele szénhidrát, akkor a számított napi Se bevitel kevesebb, mint 20 µg. A nemzetközi ajánlás (Recommended Daily Allowance, National Research Council Washington DC, National Academy of Sciences 1980) 50 - 200 µg napi Se bevitelt javasol.

Más országok tápanyagainak Se koncentrációra vonatkozó adatokkal való összehasonlítás nagyon nehéz, hiszen mind a növényi, mind az állati eredetű élelmiszerek Se tartalmát a földrajzi (talaj Se tartalom), kémiai, biokémiai, és a nemzeti élelmiszertechnológiai sajátosságok igen különbözővé tehetik.

Mérési eredményeinket a kielégítő Se ellátottságú európai országok hasonló adataival összehasonlítva megállapítottuk, hogy a különböző búza- illetve rozslisztek, valamint az ezekből készült kenyérfélék Se tartalma szintén alacsony. Az 1995-ben kiadott, legfrissebb magyar "Tápanyagtáblázat" -ban közölt élelmiszerek mikroelem tartalmára vonatkozó adatok között Se értékek nem szerepelnek. Így saját adataink eredeti megfigyelésként értékelendők.

**Hazai szénhidrát alapú élelmiszerek Se tartalmának ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
($M \pm SD$ vagy/és tartomány)összehasonlítása európai országok adataival**

Minta	Magyarország (saját adatok)	Európai országok	Év
	$M \pm SD$	$M \pm SD$	Tartomány
Búzalisztek			
Teljes kiőrlésű rozs	3.8 ± 0.7	Ausztria 2.5	1996
Graham	1.8 ± 0.7	Finnország 13.9	1996
"		Németország 2.5	1996
"		Németország 1.9	1996
"		Svédország 1.8	1996
"		Svájc 21.3	1996
"		Törökország 7.2	1996
Rozslisztek			
Teljes kiőrlésű rozs	6.6 ± 0.6	Németország 1.1	1993
Láng rozs RL-60	4.4 ± 0.8		0.6 – 1.1
Búzakenyerek			
Féhr kenyér	2.1 ± 0.7	Finnország 1	1987 / '75-'77
"		Németország 5	1988
"		Németország 1.9 ± 0.5	1989
"		Németország 3.1	1993
Búzakorpás	1.5 ± 0.6	Olaszország 7.7	1989
Szézám magas	7.5 ± 1	Finnország 19	1987
		Németország 11.1	1993
Rozskenyerek			
Teljes rozs	5.2 ± 0.7	Finnország 2	1987 / '75-'77
"		Finnország 14	1987 / '83
Teljes barna	6.8 ± 0.9	Finnország	
Búza és rozs	5.6 ± 0.4	Németország	7.4 – 8.4
		Németország	1989
Tésztafélék	8.2 ± 0.7		
6 és 8 tojásos	6.7 ± 0.6		
Spagetti			1993

3. táblázat

VI. Balance vizsgálatok

A táplálékkal bevitt Se mennyiség egészséges és diabetese gyermekekben

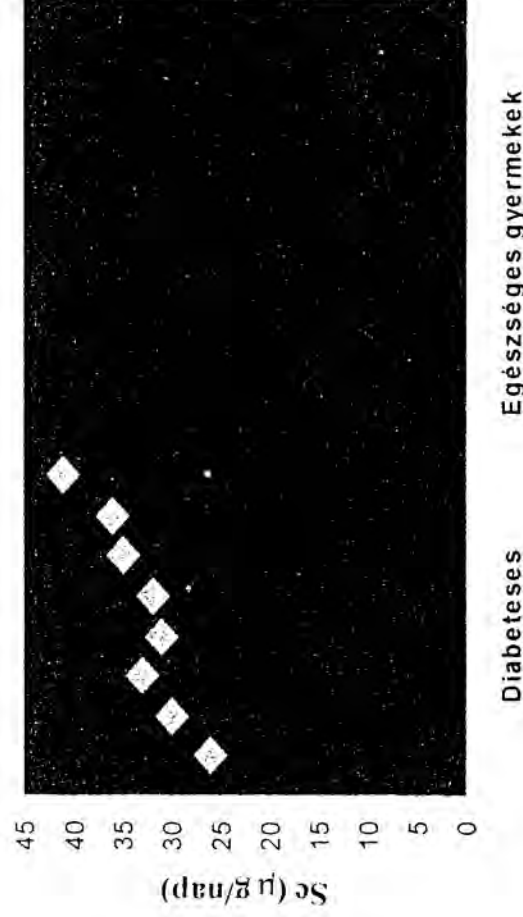
6.1. Klinikai paraméterek és a tápanyagbevitel jellemzői diabetese és egészséges gyermekekben

Nyolc egészséges és nyolc diabetese gyermeket választottunk ki, akik három teljes napi étrendjükről pontos feljegyzést készítettek a mennyiségek feltüntetésével. A gyermekek azonos életkorúak voltak (13.4 ± 0.3 és 13.2 ± 0.4 év), mindkét csoportot 4 fiú és 4 leány alkotta. Test súlyban, testmagasságban, haemoglobinn és haematokrit értékekben és a teljes napi kalória bevitelben nem volt különbség. Az egészségeseknél a leányok 2320 ± 80 , a fiúk 2760 ± 95 Kcal-t, a diabeteseekben leányok 2210 ± 63 , a fiúk 2670 ± 48 Kcal-t fogyasztottak. A diabetesek jelentősen több fehérjét (1.2 ± 0.32 versus 0.66 ± 0.18 g/kg nap), több colloid szénhidrátot (7.2 ± 0.33 versus 5.5 ± 0.11 g/kg nap) és kevesebb zsírt (1.7 ± 0.18 g/kg nap versus 2.6 ± 0.3 g/kg nap) fogyasztottak, mint egészséges kortarsaik.

6.2. Se bevitel diabetese és egészséges gyermekekben

Az elemiszerminták Se tartalmának meghatározása és az elfogyasztott élelmiszer mennyiségek ismerete alapján kiszámítottam az étkezés során elfogyasztott Se mennyiségeket mind a 16 gyermeknél. Diabetese gyermekekben ez 33.25 ± 3.5 (range 26 - 41) microgramm Se nap, egészségesekben durván a fele, 17 ± 2.75 (range 9-25) microgramm Se nap-nak adódott (10. ábra). A valódi, teljes 24 órás Se bevitelt nem tudjuk kiszámítani, mert a jelen munka élelmiszerminta mérési eredményeim kívül nincsenek hazai Se mérési adatok a többi élelmiszerfajta illetően. A diabetesek több fehérjét fogyasztottak, ebből következtetni lehet arra, hogy a napi teljes Se bevitel is valószínűleg magasabb ebben a csoportban, hiszen a zsírok Se tartalma elenyésző, a fehérjéké viszont magas.

Se bevitel ($\mu\text{g}/\text{nap}$) kolloid szénhidrátokkal

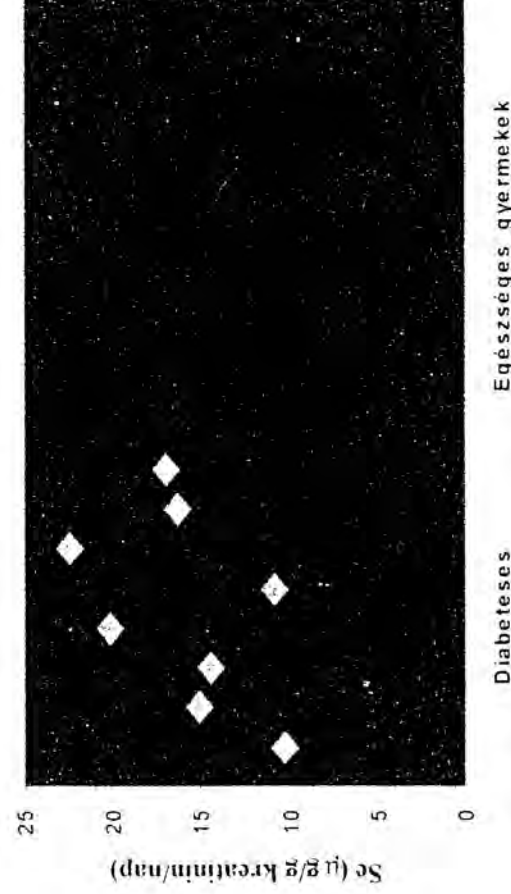


10. ábra

6.3. Se vér státus diabetes mellitusos és egészséges gyermekekben dokumentált étkezés kapcsán

Hasonlóan az 5.1. pontban leírtakhoz, ahol 35 diabeteses és 127 egészséges gyermek Se vér státusa között szignifikáns különbséget észleltünk a diabetesesek javára, a 8-8 gyermekek esetében is ugyanezre a következtetésre jutottunk. A vörösvérsejt Se koncentráció 1.57 ± 0.14 versus 1.29 ± 0.13 $\mu\text{mol/l}$, a teljes vér Se 1.23 ± 0.07 versus 0.96 ± 0.07 , $\mu\text{mol/l}$, a plazma Se 0.99 ± 0.05 versus 0.75 ± 0.07 $\mu\text{mol/l}$ volt, szignifikánsan magasabb a diabetesesekben, mint az egészséges gyermekekben.

Napi Se kiválasztás ($\mu\text{gSe/g}$ kreatinin/nap)



11. ábra

6.4. Se ürítés a vizelettel

A nem abszorbeált Se kiválasztása legnagyobb részt a vesékben keresztül történik, az irodalmi adatok szerint 90-95-t is eléri, tehát jól tükrözi a Se ürítést. A maradék töredéknyi mennyiségű Se a széklettel távozik. Ennek mérése sem az AAS sem az INAA módszer nem alkalmasak, stabil izotópok alkalmazásával is kevesen próbálkoztak. Realitásnak tekinthető a reggel ürített első vizeletminta értéke, de pontosabb eredményt ad, ha teljes 24 órás gyűjtött vizeletmintákat analizálunk. Minden szerző azonos véleményre, hogy különböző egyének, betegcsoportok Se ürítésének összehasonlítására nem az abszolút vizelet Se koncentrációs értékeket, hanem a creatininre vonatkoztatott adatokat jogos használni. Ezzel elkerülhető a vizelet bekoncentráció vagy hígulás, azaz a vízhozartás és ásványi anyagcsere-termékek ürülésének lényeges különbségeiből adódó Se koncentráció változás. Saját vizsgálatunkban a teljes 24 órás vizeletmennyiségből, 1 g creatininre vonatkoztatott Se értékeket hasonlítottuk.

A 11. ábrán az individualis értékeket tüntettük fel, a két csoport átlagos Se ürítése között nem volt jelentős különbség. A Se glycoproteinekhez kötve ürül a vizelettel, a pontos frakció identifikálása még nem ismert. Saját megfigyeléseink szerint a glucosuria fokozódása emelkedett Se ürítéssel járt. ($r=0.87$, $n=8$, $y=0.68x-1.47$, $p<0.001$). Ugyanígy szoros, lineáris, pozitív korreláció észlelhető a glucose és Se ürítés között, ha 3-szor 8 órás vizeletfrakciókat analizálunk ($r=0.89$, $n=24$, $y=5.7x-8$, $p<0.001$). Tehát rosszul beallított cukorbeteg gyermek sok Se-t veszíthet a vizelettel, jól beallított, a glucosuriás, vagy minimális glucoset ürítő betegnél kevesebb Se ürül a vizelettel. Saját vizsgálatunkban csupán egy beteg

volt, aki napi 15 g felett ürített glucose-t. Feltehetően jelentős proteinuria is befolyásolhatja a Se ürítést, a mi betegeink között macroproteinuria nem fordult elő.

VII. Az új tudományos eredmények összefoglalása

7.1. Selenium státus egészséges magyar gyermekekben

1. Vizsgálataink eredeti megfigyelések Magyarországon, melyekben hazánk három, földrajzilag különböző régiójának gyermek lakosságában első alkalommal történt a vörösvérsejt, teljes vér és plazma Se paraméterek, valamint vörösvérsejt és plazma glutathion peroxidáz enzimek mérése egyidejűleg a Se státus reális megítélhetősége céljából.
2. Az ország keleti részében lévő Kiskőrösön élő gyermek populáció vér paramétereinek Se koncentrációi alacsonyabbak, mint a fővárosban vagy az iparilag erősen szennyezett levegőjű Tatabányán élő gyermekeké.
3. Mind a plazma mind a teljes vér Se tartalma az első 10 életévben a korrall egyenes arányban növekedést mutatott.
4. A plazma glutathion peroxidáz aktivitása szintén életkor függő.
5. A plazma Se tartalma és glutathion peroxidáz aktivitása között szoros lineáris összefüggést észleltünk. Hasonló megfigyeléseket csak Se hiányos talajú országokban figyeltek meg, ahol alacsony a Se kinálat, emiatt alacsony a lakosság Se ellátottsága, mely tükröződik az alacsony vér Se státusban.
6. A vörösvérsejtek Se koncentrációja és GSH-Px aktivitása között is összefüggés volt látható, kivéve a legalacsonyabb Se koncentrációkkal rendelkező kiskőrösiekben. Ezen megfigyelés arra utal, hogy extrém alacsony vér Se paraméterek esetében a vörösvérsejt GSH-Px aktivitás maximális aktivitással próbál védekezni és a Se minden formáját biológiailag hasznosítani igyekszik.
7. Nemzetközi adatokhoz hasonlítva a magyar gyermekek Se státusa alacsony

7.2. Selenium státus egészséges magyar felnőttekben

1. Vizsgálataink eredeti megfigyelések, melyekben a felnőtt magyar lakosságban első ízben történtek egyidejűleg vér Se paraméter és selenoenzym mérések a Se státus megítélése céljából.
2. A felnőtt magyar lakosságban a vér Se paraméterek a korrall egyenes arányban emelkednek, 20-30 év között észlelhetők a legmagasabb értékek, majd fokozatos csökkenés tapasztalható. 50 év felett a gyermekekben észleltekhöz hasonló, igen alacsony szinteket mértünk.
3. A plazma glutathion peroxidáz aktivitása 20 éves korig növekedik, majd az 5. évtizedtől csökkenést mutat.
4. A plazma Se tartalma és a plazma GSH-Px aktivitása között szignifikans, pozitív, lineáris correlatio észlelhető az 1-60 éves magyar lakosságban, mely elégtelen Se státusra utal.

5. A vörösvérsejtek Se koncentrációi és GSH-Px aktivitásai között szintén szignifikans, pozitív, lineáris correlációt figyeltünk meg az gyermek és felnőtt korú lakosságban, mely egyértelműen alacsony Se ellátottságra utal. Ilyen összefüggést csak Se-ben szegény földrajzi régiókban élő, alacsony Se státusú egyénekből figyeltek meg.
6. A magyar felnőtt lakosság vér Se paraméterei jelentősen alacsonyabbak, mint az európai átlag és hasonlítanak a geológiailag hozzánk közelálló országokban élőkéhez, pl. az osztrákok, szlovákok értékeihez.
7. A magyar felnőttekben mért GSH-Px aktivitások referencia értékeknek tekinthetők. Nemzetközi standardok hiányában és a kevés nemzetközi adat miatt külön figyelmet érdemelnek.
8. A reprodukív életkorban lévő nők vörösvérsejt GSH-Px aktivitásai magasabbak, mint az azonos korú férfiaké. Ez a tény arra utal, hogy a nőkben rizikó faktorként értékelendő az alacsony Se státus.

7.3. Selenium státus insulin dependens diabetes mellitusos gyermekekben

1. Diabetesek gyermekekben a vörösvérsejtek, a teljes vér és a plazma Se koncentrációi is magasabb, mint az azonos korú egészséges gyermekekben mért értékek. Magyarországon ezek az első adatok diabetesek Se státusára vonatkozóan.
2. Diabetesekben a plazma GSH-Px aktivitás magasabb, mint az azonos korú nem diabetesek gyermekekben. A vörösvérsejt enzim aktivitás magasabb, mint egészségesekben, feltehetően magasabb esetszámnál szignifikans lenne a különbség.
3. A magyar diabetesek gyermekekben észlelt magasabb vér Se paraméterek és GSH-Px aktivitásokhoz hasonlóan a jobb Se státussal rendelkező német diabetesek gyermekekben ugyancsak magasabb értékeket mértünk, mint az egészséges német gyermekekben.
4. A plazma triglyceridek magasabbak, a HDL-cholesterin szintek alacsonyabbak voltak a diabetesekben, mint az egészségesekben, megegyezően az irodalmi adatokkal.
5. Egészségesekben pozitív összefüggés van a plazma Se és cholesterin valamint triglycerid szintek között, ilyen összefüggés a diabetesekben nem észlelhető.
6. A plazma retinol szintje alacsonyabb, de az alpha és gamma tocopherol szintek magasabbak voltak a diabetesekben, mint az egészséges gyermekekben.
7. A plazma antioxidánsok összességében magasabbak voltak a diabetesek gyermekekben, mint az egészségesekben, mely megállapítás részben megegyezik, részben ellentmond az irodalmi megfigyelésekben. A contradictio feltehetően az életkor és a jó egyensúlyban tartott betegség szoros figyelembe vételével nem észlelhető. Saját megfigyeléseink szerint jól beállított diabetesek beteg antioxidáns státusa jobb, mint a rossz anyagcseréjű betegek.

7.4. Élelmiszereink Se tartalma

Gabonaféléink, lisztféléink, kenyereink, tesztaféléink, cereáliáink Se tartalma alacsonyabb, mint sok európai államban mért értékek.

7.5. Se bevitel, Se vér státus és Se ürítés a vizelettel diabeteses és egészséges gyermekekben

1. A szénhidrát alapú élelmiszereinkkel történő Se bevitel magasabb a diabetesekben, mint az egészséges gyermekekben, mert a diabetesek szénhidrát fogyasztása magasabb.
2. Feltehetően a teljes napi Se bevitel is magasabb diabeteseben, mint egészségesben, mert a diabetesek több fehérjét és szénhidrátot, de kevesebb zsírt fogyasztanak, mint az egészséges magyar gyermekek.
3. Dokumentált diéta fogyasztásakor is magasabb volt a diabetesek Se státusa, azaz a vörösvérsejtek, teljes vér és plazma Se paraméterek valamint a vörösvérsejtek és plazma GSH-Px aktivitásai, mint az azonos korú egészséges gyermekeké.
4. A vizelettel ürülő Se mennyisége hasonló a diabeteses és egészséges gyermekekben.
5. Glucosuria és proteinuria növeli a selenuria mértékét.

VIII. Eredményeink gyakorlati használhatósága

A vizsgálati eredmények hiányokat pótolnak és eredeti megállapításokra engednek következtetni. Vizsgálatainkat megelőzően nem voltak adatok a magyar lakosság Se státusára vonatkozólag. A legfrissebb kutatási eredmények arra utalnak, hogy magas morbiditással és mortalitással járó betegségek, mint atherosclerosis és malignus tumorok preventióját és terápiáját pozitív irányban segíti a megfelelő Se státus. Adataink felhívják a magyar orvostársadalom figyelmét, hogy a preventív medicina gyakorlásakor nem feledkezhetnek el a Se státus vizsgálatáról.

Módszereket dolgoztunk ki és belső, hazai standard értékeket adtunk mind Se paraméterek, mind a glutathion peroxidáz aktivitások méréséhez.

Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a Se meghatározás INAA és AAS technikáinak alkalmazásával, erre vonatkozóan sem volt semmi korábbi eredmény hazánkban.

További vizsgálatok szükségesek országunk minden geológiai régiójában élő lakosságának Se státusát illetően, melyek különösen fontosak a rizikó csoportok egészségének megtartása és számos betegség preventiója érdekében.

A juvenilis korú diabetesek Se státusa csak akkor ideális, ha jól vannak beállítva, sem jelentős glucosuria, sem proteinuria nem kíséri a betegséget. A szövődmények megelőzése céljából fontos a kielégítő Se státus fenntartása.

Eredményeink alapján megfelelő antioxidáns kapacitás csak helyes diéta alkalmazásával érhető el a diabetes mellitusban szenvedő gyermekekben.

Hazai élelmiszereink Se koncentrációinak meghatározása szintén hiánypótló, első mérések hazánkban. Ezeket a méréseket ki kell terjeszteni a jövőben. Ahogyan hazai szállalat állományunk rendszeres Se pótlásra szorul és Se pótlást kap, félmerül a humán substitutio szükségességének a kérdése is.

Megjegyzés

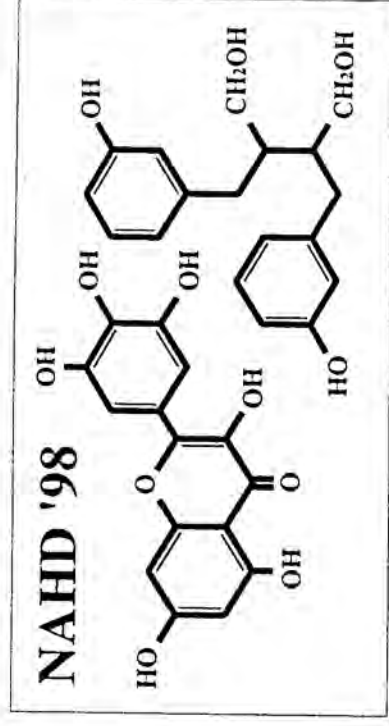
Az idézett irodalmi munkák az értekezés alapjául szolgáló közleményekben megtalálhatók, kivételt képez néhány friss adat, melynek forrását a szövegben pontosan megadtuk.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

1. Bacsó J., Uzonyi J., Cser M.Á.: Correlations between hair bioelements and clinical parameters in Hungarian diabetic children. ATOMKI Annual report 1989, pp.76-77
2. Cser Á., J.Bacsó, I.Uzonyi: Correlations between hair bioelements and clinical parameters in Hungarian diabetic children. Seventh Interational Symposium on Trace Elements in Man and Animals TEMA 7, Dubrovnik, 1990, May 20-25.
3. Soltész G., Madácsi L., Békefi D., Dankó J., and the Hungarian Childhood Diabetes Epidemiology Group (incl. Cser Á): Rising incidence of type 1 diabetes in Hungarian Children (1978-1987) Diabetic Medicine, 1990.7.111-114.
4. Cser Á., László-Sziklai I., Menzel H., Lombeck I.: Selen bei jugendlichen Diabetikern. In: Mengen und Spurenelementen Ed. Friedrich-Schiller Universität Jena, Leipzig, Düsseldorf, Gebrüder Mugler GmbH, Sachsen 1991, pp1-8.
5. László-Sziklai I., Cser Á., Lombeck I.: Determination of selenium in biological materials by NNA. 33.IUPAC Congress Budapest 1992, Book of abstracts pp.1088
6. Sziklai L.I., Cser Á., Lombeck I.: Analytical procedure for selenium determination in biological materials by NAA "3-rd International Conf. on Nuclear and Radiochemistry" Book of Abstract 1992, pp 54.
7. Cser M.Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Elevated selenium and glutathione peroxidase activities correlate with HDL-cholesterol and triglycerides in juvenile diabetics. Fifth International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, 20-23 July 1992, Nashville, Tennessee, USA, Book of Abstracts, pp. 127.
8. Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selen status egészséges gyermekekben és felnőttekben. (Selenium status in healthy children and adults). III. Környezeti Ártalmak és Környezetegészségügyi Következmények Konferencia (III. Hungarian Conference on Environmental Harms and their Consequences on Health) Tata, Hungary 1993, in: Környezeti ártalmak és a légzőrendszer. III. Kötet, pp 12-17.
9. Sziklainé László Ibolya, Cser Á., Rausch H., Lombeck I.: Nyomelemek a környezetben és az emberi szervezetben (Trace elements in the environment and in the human). III. Környezeti Ártalmak és Környezetegészségügyi Következmények Konferencia (III. Hungarian Conference on Environmental Harms and their Consequences on Health) Tata, Hungary 1993, in: Környezeti ártalmak és a légzőrendszer. III. Kötet pp 306-313.
10. Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. J.Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 1993, 7, 205-210.

11. Sziklai-László I., Cser Á., Lombeck I.: Selenium determination in biological materials by NAA. *J. Radioanal. and Nuclear Chemistry* 1995, 190, 23-30.
12. Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selenium status és lipoproteinek egészséges és diabeteses gyermekekben. *Lege Artis Medicinae* 1995, 9, pp. 708.
13. Cser M.Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selenium, glutathione peroxidases in healthy Hungarians. Selenium content of basic food ingredients. Abstract book of the Sixth International Symposium on SELENIUM in Biology and Medicine, 18-22, August 1996 Peking, China, pp. 47.
14. Sziklai-László I., Cser Á., Lombeck I.: Determination of selenium in blood and food samples from Hungary by AAS and INAA. Abstract book of the 4-th International Conference on Nuclear and Radiochemistry, 8-13 September 1996, St. Malo, France Vol.2. pp11-14.
15. Cser M. Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children. *J Trace Elem. in Medicine and Biology* 1996, 10, 167-173.
16. Cser Mária Ágnes, Sziklai-László Ibolya, Menzel Helmut, Lombeck Ingrid: Szelén és glutathion peroxidázok egészséges gyermekekben és felnőttekben. (Selenium and glutathione peroxidases in healthy Hungarian children and adults) *Gyermekgyógyászat (Paediatrics, Hungarian language with English abstract)*, 1996, 47 (No.5) 384-394.
17. Sziklai-László I., Cser M. Á., Lombeck I.: Determination of selenium in blood and food samples from Hungary by AAS and INAA. *J. Radioanal. and Nuclear Chemistry*, 1998 in press
18. Cser M.Á.: A selenium (Se) nyomeletről, a magyar lakosság Se ellátottságáról (Selenium (Se), a trace element, selenium status of the Hungarian population. *Nestlé Magazin*, 1997 II.3. 2-3.
19. Cser M.Á.: A selenium (Se) nyomeletről, a magyar lakosság Se ellátottságáról (Selenium (Se), a trace element, selenium status of the Hungarian population. *A házi Gyermekorvosok Országos Érdekvédelmi Egyesületének Lapja (Journal of the Association for the Protection of Family Paediatricians. Vezércikk (Leading article) 1997 II.3 pp.10.*
20. Cser M.Á., Sziklai-László I., R. Snyder.: Selenium (Se) intake, blood status and urinary Se excretion in diabetic and healthy Hungarian children. 16-th International Congress of Nutrition. Montreal, Canada , 27-31 July 1997, Abstract Book pp. 227.
21. Cser M.Á., Sziklai-László I.: A szelén szerepe a human medicinában (The role of selenium in the human medicine. In: *Book on the First Selenium Congress in Hungary*. eds.: Cser, Sziklai-László Frag.BT., Budapest in press

- 22. Sziklai-László I., Cser M.Á.:**
Szelén meghatározás neutron aktivációs analysissel, egyéb módszerekkel biológiai mintákban. (Selenium determination by instrumental neutron activation analysis and other methods in biological samples). In: Book on the First Selenium Congress in Hungary. eds.: Cser, Sziklai-László Frag.BT., Budapest in press.
- 23. Cser M.Á., Sziklai-László I., R. Snyder:**
Selenium bevitel, vér státus és selenium ürtés juvenilis, insulin diabetes mellitusban. Hungarian Diabetes Society, Annual Congress, 17-19.April, 1998 Eger. Abstract book. pp. 35.
- 24. Cser M.Á., Sziklai-László I.Menzel H., Lombeck I.:**
Szelén és glutathion peroxidáz aktivitás magyar gyermekekben (Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children) *Lege Artis Medicinae*, 1998 5. pp.280.
- 25. Sziklai-László I., Cser M.Á.:**
Evaluation of selenium content of food, infant formulas and human milk samples from Hungary by INAA. *Journal of the Royal Society for Chemistry*, 1998 in press.
- 26. Cser M.Á., Sziklai-László I., Laryea M.D., Lombeck I.:**
Antioxidant status of insulin dependent diabetics. *Journal of the Royal Society for Chemistry*, 1998 in press.



Second International Conference on

Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease

June 24 - 27, 1998
Helsinki, Finland

Programme and Book of Abstracts

Antioxidant status of insulin dependent diabetics

M.Ágnes Cser, I.Sziklai-László¹, Maurice F. Laryea², Ingrid Lombeck²
Bethesda Children's Hospital of the Hungarian Protestant Church, Budapest,
KFKI Atomic Energy Research Institute, Budapest, Hungary (1),
Children's Hospital, University of Düsseldorf, Federal Republic of Germany (2)

ABSTRACT

Hungarian soil is low in selenium (Se) nearly 90 per cent contains less than 0.1 ppm Se. The soil-food chain resulted in low Se concentrations (measured by Atomic Absorption Spectroscopy AAS with hydride generation) of erythrocytes ($1.13 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$), whole blood ($0.82 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$) and plasma ($0.68 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$) in healthy, 6-17 years old Hungarian children ($n=127$) compared to published European data. There is growing but conflicting evidence of an association between Se status and diabetes mellitus.

Se concentrations in type I diabetics ($n=35$) of the same age range were higher in erythrocytes ($1.36 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$, $p<0.001$), in the whole blood ($1.05 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$, $p<0.001$) and in plasma ($0.91 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$, $p<0.001$) compared to healthy children of similar age range. **Glutathione peroxidase activity** in the plasma proved to be significantly higher in diabetics than that of healthy controls, in erythrocytes it did not reach significance. Plasma cholesterol (4.6 ± 0.9 v. $4.3 \pm 0.7 \text{mmol/L}$) and phospholipids (204 ± 50 v. $197 \pm 29 \text{mg/dl}$) concentrations were similar in diabetics and healthy but triglycerides (0.64 ± 0.2 v. $0.39 \pm 0.1 \text{mmol/L}$) were higher in diabetics. **Vitamin A (retinol)** and **E (alpha tocopherol)** were measured by HPLC. Retinol concentrations were similar but both alpha tocopherol and total tocopherol concentrations were significantly higher in diabetics compared to healthy children. In order to judge **Se balance** eight diabetic and non diabetic (age and sex matched) healthy children were documented their diet and collected urine for 24 hours. Colloid carbohydrate intake was $59 \pm 8\%$ of the total calories in diabetics and $42 \pm 10\%$ in non diabetics per day. Se content was calculated based on own measurements (Instrumental Neutron Activation Analysis) on Hungarian grain crops and commercially available wheat, bread, noodles, spaghetti sorts. **Se intake** in forms of carbohydrates was $33 \pm 7 \mu\text{g/day}$ in diabetics and only $17 \pm 8 \mu\text{g/day}$ in non diabetic children ($p<0.05$). **Urinary Se output** was $10.7 \pm 1.7 \mu\text{gSe/g}$ creatinine in healthy and $15.8 \pm 1.5 \mu\text{gSe/g}$ creatinine in diabetic children, difference did not reach significance.

We conclude that diabetics consume carbohydrates of better quality with higher Se content. Major part of the **antioxidant capacity involving selenium, vitamin A and E concentrations as well as glutathione peroxidase activities were higher in diabetics** compared to healthy children. There are sporadic national data on local food Se contents and no data on basal or normative Se requirement

Keywords:

diabetes, child, selenium, glutathione peroxidase, vitamin A, vitamin E, antioxidants

INTRODUCTION

Diabetes mellitus could be best characterized by insufficient insulin synthesis leading to hyperglycaemia and glycosuria. However it is a multicausal disease, there is not a clear separation between type I and type II diabetes, free radicals may play a role in the cause of the disease (24). Diabetes mellitus has been associated to well defined risk factors. It induces an increased rate of cardiovascular complications, affecting the kidneys, the retina, the peripheral nerves, the lens and the skin. Diabetics have a 2.5-fold increase in the risk of blindness, a 20-fold increase in risk of renal failure and in the risk of amputation of legs, over 5-fold increased risk of coronary and brain ischemic damage. Hyperglycaemia can lead to the glycation of tissue proteins (17). Glycation and glucose autooxidation (18) is generating hydrogen peroxides, hydroxyl radicals and protein-reactive ketoaldehydes, called Maillard products or "browned" proteins (37,38). Hyperglycaemia can also increase the synthesis of cholesterol and other lipids, leading to increased lipid peroxidation, superoxide production (1), glycation of the lipoproteins (19) leading to oxidative DNA damage in mononuclear cells (8), increased platelet aggregation induced by increased thromboxane synthesis (32) and decreased production of the prostacyclin activators (3,15). Defense against free radical damage include tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), beta carotene - retinol (vitamin A), several metalloenzymes including glutathione peroxidase - selenium (20).

The nutritional factors have great influence in the management of diabetes mellitus and in the early prevention of such complications. Selenium (Se) being an integral, essential part of the glutathione peroxidase has a protecting role against oxidative tissue damage (12). The biologically important hydrogen donors include thiol systems such as glutathione (23). In addition to functioning as radical savangers, tocopherols (vitamin E) and beta-carotene, the major carotenoid precursor of vitamin A are known to react with singlet molecular oxygen mainly in cellular membranes (29). Blood selenium state can be different insulin dependent diabetics compared to healthy children (6) but these do not correlate with many parameters characteristic to diabetic state (fasting blood glucose, glycosylated haemoglobin levels). Although blood Se levels may not reflect tissue Se levels necessarily. The major nutritional sources of food Se for the human are some forms of proteins and plant-derived foods. Se in most animal-derived foods possesses low to moderate bioavailability while grain crops, cereals high in carbohydrates have nearly 80% Se absorption rates (34, 39).

We questioned the role of Se intake, their effects on blood Se status and urinary Se excretion in insulin dependent juvenile diabetics. At present no data exists on the total daily Se intake of diabetic children. Our aim was to analyse the Se content of the basic carbohydrate food sorts in Hungary in order to calculate the Se intake and urinary output in relation to glucosuria. Selenium state, glutathione peroxidase activities, vitamin A and E concentrations were estimated to detect the major part of antioxidant capacity of diabetics compared to healthy children.

MATERIALS AND METHODS

Two consecutive studies were carried out. In the first study 35 diabetic and 127 healthy children were investigated in order to measure selenium and glutathione peroxidase status. In the second study eight diabetic and eight healthy children were selected and asked to record their total daily diet and collect urine over 24 hours in three consecutive days. We used the mean values of the three days results. Diabetics were investigated at their regular check-ups as outpatients, the healthy children were candidates for minor surgery. All children were within normal body weight and height range (percentiles 2.5-97.5 percentile), none of them was

obese. 4 ml EDTA blood was taken in fasting state. Informed consent was obtained from one or both parents and of each child. Protocols were approved by the local Ethical Committee on Research.

Selenium was measured with direct analysis in whole blood, plasma and urine by atomic absorption spectrophotometry with hydride generation (AAS Perkin Elmer 1100, MHS 20 HG system). Indirect analysis of erythrocyte Se was calculated from blood and plasma values with the help of the individual haemoglobin and haematocrit levels. The following **reference materials** were used: Bovine liver (NBS 1577a, Gaithersburg, MD, USA) recommended value: 710 ± 70 ng Se/g, we found: 707 ± 15 ng Se/g ($n=21$). Human reference blood (Seronorm TM Nycomed, Oslo) given value was $90 \mu\text{g Se/L}$, we found $90.9 \pm 1.4 \mu\text{gSe/L}$ ($n=28$). Freeze-Dried Urine (NIST SRM 2670, Gaithersburg, MD, USA) certified value was $0.030 \pm 0.008 \mu\text{gSe/ml}$, we found: $0.032 \pm 0.009 \mu\text{gSe/ml}$. In each assay there were pooled plasma and whole blood measured for precision. The coefficients of variance were 3.6% within day and 4.6 % between test days.

Glutathione peroxidase (EX.1.11.1.9) activity (GSH-Px) was estimated in plasma according to (11) and in erythrocytes by the method of (36). Two different plasma and erythrocyte pools were used. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.3% and 5.4 % in measuring plasma and 3.4% and 5.7% in measuring erythrocyte GSH-Px activity.

Biochemical parameters: plasma glucose was measured by glucose oxidase, plasma triglycerides, cholesterol, HDL-cholesterols by kits (Boehringer, Mannheim, Germany), urine creatinine by Meckotest (Merck, Darmstadt, Germany). Retinol (vitamin A) and tocopherols (vitamin E) were determined by HPLC Waters model 501 with U6K injector, Waters 30 cm columns.

Analyses of food samples were performed by instrumental neutron activation analysis (INAA) and gamma spectroscopy. Grain crops, flours and bread samples were homogenised and dried for 48 hours at 80°C to constant weight, 100 to 300 mg samples were weighed and irradiated in high purity Suprasil quartz ampoules, aliquots of selenium standard solution (MERCK) were irradiated together with the samples. The irradiations were done in the WWR-M type 10 MW nuclear research reactor of the KFKI Atomic Energy Research Institute with a thermal neutron flux at the irradiation position: $8.1 \cdot 10^{13}$ n/cm².s. The irradiation times were 24 to 48 hours, the cooling times were 40 to 90 days and the measuring times were 5, 15 and 20 hours. Measurement of the gamma-rays of ⁷⁵Se ($T_{1/2}$: 119.76 d; $E\gamma$: 136.0, 264.65 keV) was performed by an IBM PC/AT - 486 based spectrometer equipped with an own developed KFKI PCA-4KN type MCA card. Canberra Ge(Li) detector (with energy resolution of 1.82 keV and efficiency of 13.6% for the 1332.5 keV ⁶⁰Co line) was used. Gamma spectra evaluations and calculation of element concentrations were done by Hypermet-PC program for automatic peak evaluation, energy calibration, isotope identification and INAA/CNC program for concentration computation. For quality control the following SRMs were used: NIST SRM 1567a Wheat Flour, NBS SRM 1568 Rice Flour, NIST SRM 1548 Total Diet, NBS SRM 1577a Bovine Liver.

RESULTS

Clinical parameters were similar in both healthy and diabetic groups of children (Table 1.). Age, gender ratio, body weight, height and haematological parameters were normal and not different. Plasma cholesterol mean levels were also similar, but HDL-cholesterols were lower and triglycerides were higher in diabetics compared to healthy children of the same age and gender ratio. There were strong linear correlations observed between plasma Se and total cholesterol ($r=0.86$ $n=35$ $p<0.001$), between plasma Se and HDL-cholesterol ($r=0.57$, $n=38$,

$p < 0.001$) and between plasma Se and triglycerides ($r = 0.77$, $n = 38$, $p < 0.001$) in healthy children. No such correlations were found in diabetics.

Table 1. Clinical parameters of children investigated for selenium status

Parameters	Diabetics	Healthy
Numbers	35	127
Age median (years)	13.2	12.9
Age range (years)	6 - 17	6 - 17
Males/Females	18/17	67/60
Body weight (percentile) range	25 - 97.5	25 - 90
Body height (percentile) range	25 - 97.5	25 - 90
Haemoglobin (g/L) M \pm SD	136 \pm 7.8	134 \pm 3.2
Haematocrit (%) M \pm SD	40.4 \pm 2.5	38.5 \pm 2.9
Pl. cholesterol (mmol/L) M \pm SD	4.51 \pm 0.89	4.22 \pm 0.71
Pl. HDL-cho. (mmol/L) M \pm SD	1.78 \pm 0.37***	2.02 \pm 0.34
Pl. triglyceride (mmol/L) M \pm SD	0.62 \pm 0.04***	0.39 \pm 0.11

level of significance ***= $p < 0.001$ diabetics compared to healthy

Vitamin A levels in plasma were lower in diabetics, but vitamin E concentrations were higher in diabetics compared to healthy controls (Table 2.). Significant, positive correlations were found between plasma Se and alpha tocopherol concentrations both in healthy children ($r = 0.83$, $n = 25$, $p < 0.001$) and diabetics ($r = 0.65$, $n = 35$, $p < 0.01$). Total lipids correlated with total tocopherols only in the diabetic patients ($r = 0.61$, $n = 35$, $p < 0.01$), but not in the healthy group.

Table 2. Vitamin E (tocopherol) and A (retinol) concentrations in plasma

Parameters	Diabetics	Healthy
Numbers	35	25
γ tocopherol ($\mu\text{mol/L}$) M \pm SD	1.22 \pm 0.51*	1.07 \pm 0.34
α tocopherol ($\mu\text{mol/L}$)	18.01 \pm 4.71***	12.76 \pm 2.59
Total tocopherol ($\mu\text{mol/L}$)	19.21 \pm 4.89***	13.92 \pm 2.69
Retinol ($\mu\text{mol/L}$)	1.66 \pm 0.48 *	1.87 \pm 0.51

level of significance * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ diabetics compared to healthy

Selenium content of erythrocytes, of whole blood and of plasma was significantly higher in diabetics than in non-diabetic children (Fig.1.).

The glutathione peroxidase activity in the plasma was 93 ± 12 U/L in healthy children and 118 ± 17 U/L, significantly higher in diabetics. Plasma GSH-Px activity increased with enhanced blood glucose levels in diabetics ($r = 0.56$, $n = 35$, $p < 0.001$). The erythrocyte glutathione peroxidase activity was 6.4 ± 0.8 U/gHb in the healthy children and 6.89 ± 1.32 U/gHb, somewhat higher in diabetics. There was a negative correlation between plasma triglyceride concentrations and erythrocyte GSH-Px activities in the diabetic children ($r = 0.65$, $n = 35$, $p < 0.001$). Characteristic parameters of the selected groups for diet recording and urine collection are described separately (Table 3).

Fig. 1. Comparison of Se concentrations (M±SD) in different blood compartments in diabetic and healthy children aged 6-17 years

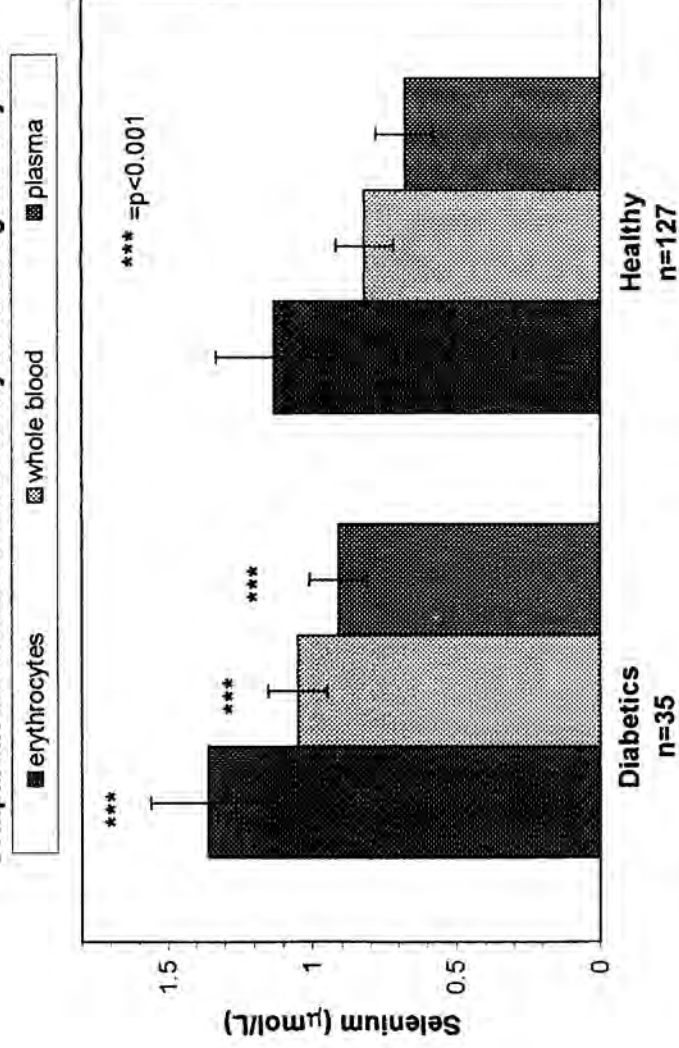


Table 3. Clinical parameters of children who recorded total diet

Parameters	Diabetics	Healthy
Numbers	8	8
Age (years) M ± SD	13.2 ± 0.4	13.4 ± 0.3
Males/Females	4 / 4	4 / 4
Body weight (kg)	54 ± 6 / 49 ± 4	51 ± 3 / 48 ± 2
Body height (cm)	166 ± 5 / 158 ± 3	162 ± 7 / 156 ± 4
Haemoglobin (g/L) M±SD	138 ± 9.2	137 ± 5.1
Haematocrit (%)M±SD	41.1 ± 3.4	39.2 ± 4.2
Total calory intake (kcal/day)	2670 ± 48 / 2210 ± 63	2760 ± 95 / 2320 ± 80
Intake in proteins (kcal/day)	252 ± 11 / 244 ± 12**	140 ± 16 / 172 ± 15
Intake in colloid CH (kcal/day)	1612 ± 20 / 1340 ± 17**	1136 ± 12 / 1076 ± 19
Intake in christ.CH (kcal/day)	-	248 ± 28 / 272 ± 24
Intake in fats (kcal/day)	810 ± 45 / 635 ± 42	1337 ± 35 / 964 ± 28
Protein intake (g/kg/day)	1.2 ± 0.32**	0.66 ± 0.18
Colloid CH intake (g/kg/day)	7.2 ± 0.33***	5.5 ± 0.11
Fat intake (g/kg/day)	1.7 ± 0.18***	2.6 ± 0.30

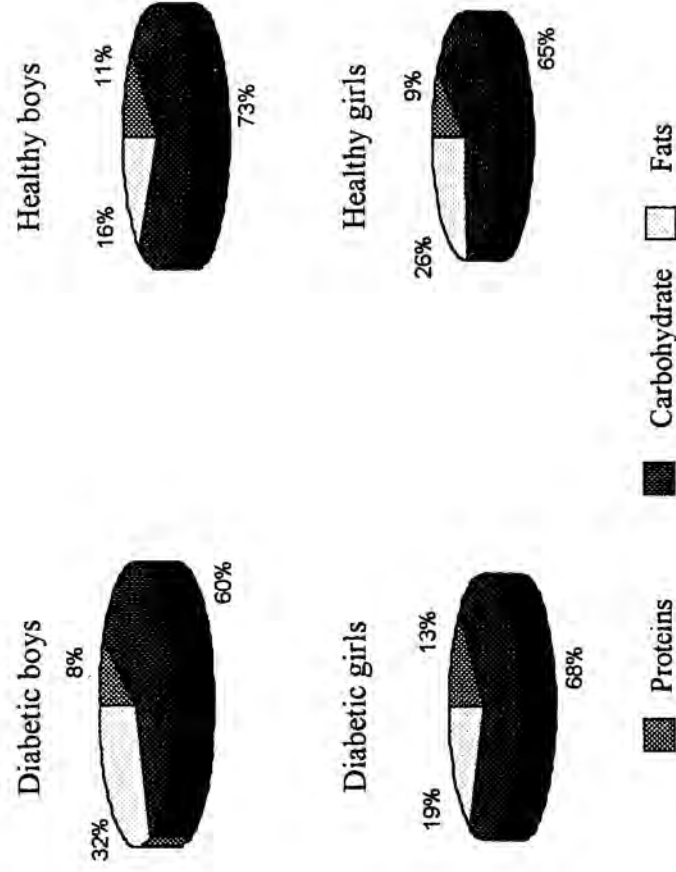
level of significance ** =p<0.01, ***= p<0.001 diabetics compared to healthy

Total calory intakes were not different, but diabetics consumed significantly more proteins, more colloid carbohydrates and less fat in absolute amount or calculated for kg body weight (Table 3.) The percentual distribution of food consumption showed the same tendency both in boys and girls (Fig.2.).

Fig. 2. Total dietary intake (g/day) M±SD

	Proteins	Carbohydrates	Fats
Diabetic boys	63±2.8	403±5	90±4
Diabetic girls	61±3.2	335±4	91±3
Healthy boys	35±4.2	284±3	147±2
Healthy girls	38±3.7	269±5	107±2

Percentual distribution of food components



The selenium intake from carbohydrate sources was significantly higher in diabetics (Table 4.) compared to healthy, non-diabetic children. The Se content of food samples produced in Hungary and ready for consumption, such as breads, rice, noodles, spaghetti sortes, potato etc. are separately described (31). The urinary Se output was similar (Table 5.) in the diabetic and healthy group of children.

Table 4. Selenium intake ($\mu\text{g}/\text{day}$) with carbohydrate based food in children

Patients	Healthy	Diabetics
1.	9.11 \pm 0.58	26.2 \pm 1.01
2.	16.6 \pm 1.12	35.3 \pm 0.96
3.	15.4 \pm 0.92	31.1 \pm 0.88
4.	19.2 \pm 0.76	36.5 \pm 1.12
5.	17.8 \pm 0.83	32.4 \pm 0.79
6.	25.0 \pm 1.31	41.0 \pm 2.50
7.	16.1 \pm 0.68	34.9 \pm 0.89
8.	17.2 \pm 0.73	30.1 \pm 0.71
M \pm SD	17.05 \pm 0.87	33.4 \pm 1.10***

level of significance ***= $p < 0.001$

Table 5. Urinary Selenium output ($\mu\text{g Se/g creatinin}$) in children

Patients	Healthy	Diabetics
1.	7.2 \pm 1.9	10.3 \pm 1.7
2.	9.1 \pm 0.8	15.1 \pm 0.5
3.	8.3 \pm 0.6	14.5 \pm 0.4
4.	13.4 \pm 0.5	20.2 \pm 0.6
5.	12.1 \pm 0.4	10.9 \pm 0.9
6.	13.5 \pm 0.7	22.5 \pm 0.5
7.	10.4 \pm 0.9	16.3 \pm 0.4
8.	11.3 \pm 0.8	17.1 \pm 1.2
M \pm SD	10.7 \pm 1.7	15.8 \pm 1.5

DISCUSSION

When selenium intake is very low because of low Se content on food ingredients resulted by low soil Se concentrations, the well-balanced diet of diabetic patients could allow them to consume more Se than that of the healthy population. This could explain our observations on diabetics who had a higher Se intake than the healthy children. Grain products are the primary sources for selenium in the infant and childhood diet (26,27). However we measured only a fraction of the total Se intake, those which originated from carbohydrate based food samples, differences were significant. This can be explained by the fact, that the diabetics consumed 20% more carbohydrates than the healthy children. Moreover the diabetics consumed significantly more protein, first of all meat, known to be rich in Se and less fat which has negligible Se content (25). Therefore we suggest that the absolute total daily Se intake would also be higher in the diabetics than in the healthy children. There are no data in the literature to support or contradict our hypothesis. The blood Se parameters of diabetic children were higher than that of the controls. Our results (5) are in agreement of Swedish (13,14) and Finnish authors (35). In Finland diabetics had higher blood Se status when Se intake was low, and the difference between healthy and diabetic children disappeared after Se was supplemented by soil fertilization (35) resulted in much higher blood Se status. German diabetics had higher Se blood status than the healthy Germans, similar to Hungarian diabetics who had also higher Se status than the Hungarian healthy children. (5). Plasma Se concentrations in young German juvenile diabetics in other studies were not different than in healthy controls (16,28). Our results demonstrated that diabetics had more Se both in cellular and extracellular compartment of blood, opposite of the findings of authors reporting results in adult diabetics with decreased erythrocyte GSH-Px activities. (16). Erythrocyte Se content of healthy erythrocytes were lower than that of diabetics but lower than that of healthy German children (5). Plasma GSH-Px activity proven to be an appropriate marker of short-term changes of Se intake (33). Both plasma and erythrocyte GSH-Px activities were dependent of plasma or erythrocyte Se concentrations in healthy children (7). This findings indicating a low Se state observed in Hungary similar to other geographical regions low in Se (21). This was not the case in the diabetics, who had plasma GSH-Px activities higher, than that of healthy children. This observations suggest, that diabetics had significantly better Se state than healthy children, which could be explained only by different diet regimes. Blood glucose levels seems to alter the GSH-Px activities in plasma of the diabetic children.

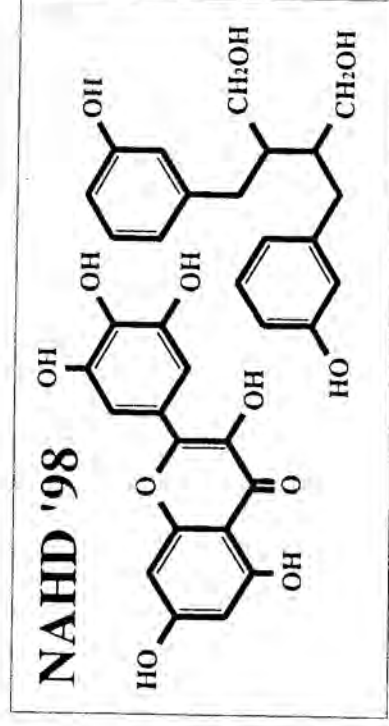
Whether the hyperglycaemia could induce an increase of plasma GSH-Px activity is an open question, no data of literature support or opposite our findings. We believe that good glycaemic control support the optimal use of the present micronutrient status. The antioxidative effective vitamin all-trans-retinol and alpha tocopherol levels depend on the intestinal absorption (10). In vivo studies revealed that Se was bound to high density lipoproteins shortly after ingestion in the form of dimethyl selenide and lipoprotein apoproteins used selenomethionine (2). The distinct differences in associations between Se status and lipids and lipoproteins in diabetics and healthy children can only be explained by the difference between their general metabolic states. Selenium as an integral part of the glutathione peroxidase has a protective role against tissue damage caused by peroxides produced from lipid metabolism (30). Further biochemical details are still missing and waiting for explanations. Defences against free radical damage include tocopherol and retinol concentrations. Natural alpha-tocopherols are potentially beneficial antioxidants of the prevention of oxidative damages. Our results on vitamin E are in accordance to American (9) investigators who have found that diabetics had higher plasma tocopherol levels than healthy normal subjects. It is likely that diabetics may attempt to compensate for the increased adhesiveness of diabetic platelets. The status of vitamin A in diabetic patients is not well studied. At low concentrations vitamin A stimulates insulin release while at high concentrations it has an inhibitory effect which may be mediated in part by impairment of intracellular glucose oxidation (4). At present, there is no evidence to suggest that diabetic patients may have vitamin A deficiency that may be involved to impaired immunologic reactions (22). The Se intake of diabetics seems to be higher than that of healthy children of the same age at least in geographical areas low in Se (7,35). Urinary Se output was not different in diabetic or healthy children. Proteinuria increases Se output, our diabetic patients did not have macro albuminuria and their creatinine clearance were also normal. In conclusion we could say that the antioxidant capacity of insulin dependent diabetic patients were higher than that of healthy children.

LITERATURE

1. Baynes J.W.: Role of oxidative stress in development of complications of diabetes mellitus. *Diabetes* 1991,40, 405-412.
2. Burk R.F.: In vivo ⁷⁵Se binding to human plasma proteins after administrations of ⁷⁵SeO₃²⁻ *Biochimica Biophysica Acta* 1974. 372, 255-265.
3. Butkus A., Skrinska V.A., Schumacher O.P.: Thromboxane production and platelet aggregation in diabetic subjects with clinical complication. *Thromb. Res.* 1980, 19, 211-216.
4. Chertow B.S., Buschmann R.J.H., Kaplan R.L.: Cellular mechanism of insulin release. Effect of retinol on insulin release and islet ultrastructure. *Diabetes* 1979, 28, 754-761.
5. Cser Á., László-Sziklai I., Menzel H., Zaß R., Lombeck I.: Selen bei jugendlichen Diabetikern. in: Mengen- und Spurenelemente 11. Arbeitstagung 1991, Gebrüder Mugler GmbH, Oberlungwitz, Sachsen 1991, pp. 1-8.
6. Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.: Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993,7, 205-210.
7. Cser M. Á., Sziklai-László I., Menzel H., I. Lombeck: Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children. *J.Trace Elements Med. Biol.* 1996, 10, 167-173.
8. Dandona P., Thusu K., Cook S., Snyder B., Makowski J., Armstrong D., Nicotera T.: Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *The Lancet* 1996, 347, 444-445

9. Darby W.J., Ferguson M.E., Furman R.H., Lemley J.M., Ball C.T., Meneely G.R.: Plasma tocopherols in health and disease. *Ann. NY.Acad.Sci.* 1994. 52, 328-333.
10. Favier A.: Selenium metabolism. In: *Selenium in Medicine and Biology*. Néve J.A. Favier eds., Walter de Gruyter, Berlin 1989. pp. 29-50.
11. Flohé L., Günzler W.A.: Assay of glutathione peroxidase. In: *Methods of Enzymology* Vol 105 ed. Packer L. Academic Press Inc. London pp.114-121.
12. Ganther H.E., Hafeman D.G., Lawrence R. A., Serfass R. E., Hoekstra W. G.: Selenium and glutathione peroxidase in health and disease - a review. In: *Trace elements in human health and disease. Vol.II*.eds. Prasad A.S., Oberlas D. Acad. Press New York, 1985, pp.165-234.
13. Gebre-Medhin M., Ewald U., Platin L.O., Tuvemo T.: Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Paediatr. Scand.* 1984. 73, 109-114.
14. Gebre-Medhin M., Ewald U., Tuvemo T.: Serum selenium is related to low- density lipoproteins in healthy children but not in children with diabetes. *Uppsala J. Med. Sci.* 1988. 93, 57-62.
15. Gerarad J.M., Stuart M.J., Rao G.H.R., Steffes M.W., Mauer S.M., Brown D.M., White J.C.: Alterations in the balance of prostaglandins and thromboxane synthesis in diabetic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 1980.95, 950-954.
16. Holler C.F., Ulberth W., Osterode K., Irsigler K.: Selenium status and serum levels of the antioxidant vitamins all-trans retinol, ascorbic acid and alpha tocopherol in diabetic patients with and without retinopathy. *Bioavailability, Ettlingen*, 1993. May 9-12. , pp. 235-238.
17. Hunt J.V., Wolff S.P.: Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Rad. Res.Comms.* 1991. 12-13. 115-123.
18. Hunt J.V., Dean R.T., Wolff S.P.: Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. *Biochem. J.* 1988. 256, 205-212.
19. Koschinsky T.: Do lipoprotein glycation and peroxidation play a role in the development of macrovascular disease in young patients with diabetes ? In: *Abnormalities in Subclinical Diabetic Angiopathy*. Eds.: Weber B., Burger W., Danne T., *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.* Basel, Karger 1992. 22, 32-43
20. Machlin L.J., Bendich A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB.* 1987. 1, 441-445.
21. McKenzie R.L., Rea H.M., Thomson C.D., Robinson M.F.: Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand infants and children. *Am J. Clin. Nutr.* 1978. 31, 1423-1418.
22. Moradian A.D., Moirley J.E.: Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987. 45, 877-895
23. Niki E.: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys. Lipids* 1987. 44, 227-253.
24. Oberley L.W.: Free radicals and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* 1988. 5. 113-124.
25. Pennington J.A., Hendricks T.C., Douglass J.S., Petersen B., Kidwell J.: International interface standard for food database. *Food Addit. Conram.* 1995. 12, 809-820.
26. Pennington J.A.T., Schoen S.A.: Contribution of food groups to estimates intakes of nutritional elements. Results from the FDA Total Diet Studies, 1982-1991. *Internat. J.Vit. Nutr. Res.* 1996. 66, 342-349.
27. Pennington J.A.T., Schoen S. A.: Total diet study: Estimated intakes of nutritional elements, 1982-1991. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 1996.66, 350-362.
28. Rückgauer M., Zeyfang A., Krusae-Jarres J.D.: Essentielle Spurenelemente bei Diabetes Mellitus. *Clinische Chemie*, 1997. 12, 805- 809.

29. Sies H., Murphy M.E., DiMascio P., Stahl W.: Tocopherols, carotenoids and the glutathione system. In: Lipid-soluble antioxidants. Biochemistry and Clinical Applications. A.S.H.Ong & L.Parker 1992 Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland pp. 160-165.
30. Sundee R.A., Hoekstra W.G.: Structure, synthesis and functions of glutathione peroxidase. *Nutr. Rev.* 19980. 38, 265-273.
31. Sziklai- László I., Cser M.A.: Evaluation of selenium content of food, infant formulas and human milk samples from Hungary by INAA. In press 1998.
32. Thomas G., Skrinska V., Lucas F.V., Schumacher P.: Platelet glutathione and thromboxane synthesis in diabetes. *Diabetes* 1985.34, 951-954.
33. Thomson C.D., Rea H.M., Doesburg V.M., Robinson M.F.: Selenium concentration and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br. J. Nutr.* 1977, 37, 457-460.
34. Thomson C.D., Robinson M.F.: Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *Am.J.Clin. Nutr.* 1980, 33, 303-323.
35. Wang W.C., Mäkelä A.L., Nántó V., Mäkelä P.: Serum selenium levels in diabetic children. *Biol. Trace Element. Res.* 1995. 47, 355- 364.
36. Wendel A.: Glutathione peroxidase. In: *Methods of Enzymology*. Vol.77, ed. Jacoby W.B., Academic Press Inc. London, pp. 325-333.
37. Wolff S.P., Dean R.T.: Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of "autooxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem. J.* 1987. 245, 243-250.
38. Wolff S.P., Jiang Z.Y., Hunt J.V.: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 1991. 10, 339-352.
39. World Health Organization Geneva : Trace elements in human nutrition and health. Macmillan-Ceuterick, India-Belgium 1996.



Second International Conference on

Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease

June 24 - 27, 1998
Helsinki, Finland

Programme and Book of Abstracts

EVALUATION OF SELENIUM CONTENT OF FOOD, INFANT FORMULAS AND HUMAN MILK SAMPLES FROM HUNGARY BY INAA

I. Sziklai-László, M. Á. Cser¹

KFKI Atomic Energy Research Institute, Budapest, Hungary
¹Bethesda Children Hospital, Budapest, Hungary

ABSTRACT

Our former results showed that the selenium (Se) status of the Hungarian population is low compared to that of several other European countries. The Hungarian Food Composition Table does not contain yet the Se concentrations of the locally produced foods. The aim of the study was to investigate some representative grain crops from the agricultural regions of Hungary. Se concentrations in wheat, barley, oat, rye, rape, soya bean, corn, sunflower and lucerne and some basic nutrients such as, wheat and rye flours and different kinds of bread samples were measured by Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA). Se levels were also determined for commercial infant formulas and human milk samples. The accuracy of the Se determinations was tested by co-analyses of standard reference materials.

INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential nutrient for humans. Se plays important biochemical roles as antioxidant, as a modulator of inflammatory and immune responses, as a regulator of thyroid hormone, etc. (2). In Se deficient state, avirulent coxsackie virus acquires virulence due to genetic mutation (5). There are still considerable debates about human Se requirements in different countries. The recommended safe and adequate daily Se intake in adults is reported to be 75 and 60 $\mu\text{g Se/day}$ for British (12), 70 and 55 $\mu\text{g Se/day}$ for North American (26), 85 and 70 $\mu\text{g Se/day}$ for Australian males and females (13). The intake for European countries ranges from 30 to 60 $\mu\text{g Se/day}$ but recommendations for several countries are not established yet.

Selenium status depends mainly on dietary intake of this element, which is determined by its concentration in locally grown and produced food (36). Se intake shows large geographical variation according to different Se contents of soil. Hungarian rock-soil systems with most of the agricultural activity have a very low content of available Se with concentrations between 100 and 420 $\mu\text{g/kg soil}$ (17). Nearly 90 per cent of samples originating from different geographical regions in Hungary had less than 100 $\mu\text{g/kg Se content}$. The regulation for the quality of fodders in Hungary specifies a minimum Se content of 100 $\mu\text{g/kg}$ in the feeds, in order to prevent the muscular dystrophy and other Se and vitamin E deficiency disorders, used to be common in livestock in regions poor in Se (Hungarian Codex of Fodder, 1984).

Epidemiological studies have suggested that low selenium intakes may be related to an increased incidence of cancer and cardiovascular disease (8,28,32). The high mortality in young and middle-aged Hungarian adults from cardiovascular diseases could be the result of nutritional imbalances including a low Se supply. Low selenium levels in serum or plasma of young Hungarian adults have been reported, and the Se concentrations of both fingernails and toenails were low in children (1). Our former results also showed that the Se status of the Hungarian children is low compared to that of other European countries (9,10,35). The Hungarian Food Composition Table (1995) does not contain yet the Se concentrations of the locally produced foods. There are only sporadic data on food Se contents and practically no data are available on basal or normative Se requirement in Hungary. The Se requirements

of infants are higher due to their rapid growth. Since the newborn's food is generally limited to breast milk, or frequently, infant formula milk, adequate Se intake from these sources is necessary. The Se content of breast milk is affected by maternal dietary Se intake, which depends on the food selenium content (23). Thus, the aim of the present study was to evaluate the Se concentrations in some representative grain crops from Hungary and some basic nutrients such as, wheat and rye flours and different kinds of bread samples. Besides this, the Se content of some human milk samples and commercial infant formulas were investigated.

MATERIALS AND METHOD

Sampling and sample preparation

To get some information on the Se intake in Hungary, the representative grain crops from the agricultural areas of the North-West and South regions of Hungary were investigated. Barley, corn, lucerne, oat, rape, rye, soya-bean, sunflower and wheat were selected for analysis and collected from agricultural firms. The samples were washed with distilled water prior to analysis, lucerne, rape and soy-bean samples were homogenized in a blender and dried for 48 hours at 80 °C and thereafter for 8 hours at 100°C to constant weight and were analyzed in duplicates. For the other crops the whole seeds were investigated. Flours and different kinds of bread products were purchased in food stores. Several (various brands from Egis Nutricia Hungary, Milupa Austria, Nestlé Denmark, Domo Foods Netherland) commercially available powdered cow milk based infant formula were selected for analysis. Ten healthy lactating mothers provided milk samples. Sampling was carried out from 4 to 8 weeks after birth. Milk samples of about 5 mL were freeze-dried and the dry weight of each sample was determined and the Se content in the milk referred to it.

Selenium analysis by INAA

For neutron irradiation sample masses of 100-300 mg from each were sealed in irradiation vials of high purity quartz (Suprasil, Heraeus, Germany). The samples together with selenium standards (Merck, Darmstadt, Germany) were irradiated with a geometry, identical to that of the samples, for 24 to 48 hours at a neutron flux density of $8 \times 10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in the WWR-M type nuclear research reactor of the KFKI Atomic Energy Research Institute (Budapest, Hungary). **For gamma spectroscopy** measurements a CANBERRA Ge(Li) detector (with energy resolution of 1.82 keV and efficiency of 13.6% for the 1332.5 keV ^{60}Co line), CANBERRA linear electronics and an IBM PC/AT/486 -based MCA (Multichannel Analyzer) were used. The γ -spectra were measured for 5, 15 and 20 hours, after a decay time of 40-90 days. **Gamma spectra evaluations** were performed by the HYPERMET-PC program. The selenium content was estimated by measuring the gamma rays of ^{75}Se isotope ($T_{1/2}$: 120 d, E_{γ} : 136.0, keV, 264.7 keV, the main gamma-lines). The accuracy of the Se determination by INAA was tested by co-analyses of biological standard reference materials. NIST SRM 1567a Wheat Flour: the value found $1195 \pm 78 \mu\text{g Se/kg}$ ($n=16$), agreed very well with the certified value of $1100 \pm 200 \mu\text{g Se/kg}$, NBS SRM 1568 Rice Flour: the measured $369 \pm 21 \mu\text{g Se/kg}$ value ($n=5$) was compared to the recommended value of $400 \pm 100 \mu\text{g Se/kg}$ and NIST SRM 1548 Total Diet: the value obtained $240 \pm 14 \mu\text{g Se/kg}$ ($n=5$) agreed well with the certified value of $245 \pm 5 \mu\text{g Se/kg}$. NBS SRM 1549 Non-Fat Milk Powder: the value found $105 \pm 4 \text{ ng Se/g}$ ($n=6$), agreed very well with the certified value of $110 \pm 10 \text{ ng Se/g}$ (deviation was 4.5 %).

Assessment of precision of the method was evaluated by analyzing 10 replicates of rye flour pool. The results of the replicate analyses showed that, under the experimental conditions used in this study, the precision (coefficient of variation) of the selenium determination

(mean \pm SD, 40.7 \pm 2.6 $\mu\text{g Se/kg}$) was 6.5%, being consistent with the counting statistics (varied from 5-10% in these determinations).

RESULTS AND DISCUSSION

Grain crops and food ingredients

Se content of representative agricultural crops grown in Hungary, such as barley, corn, lucerne, rape, rye, oat, soybean, sunflower and wheat was measured and compared to the values measured in other European countries. These crops represent most of the respective local fodders of the country. Results (mean \pm SD) are summarized in Table 1. The mean values were calculated from individual concentrations obtained by three irradiations with parallel samples, and two cycles of measurements. Low Se concentration was observed in samples of **wheat and rye**. Se content of wheat from the North-West area ranges from 16 to 47 $\mu\text{g/kg}$, with a mean value of 27 \pm 8 $\mu\text{g/kg}$, and 47 \pm 9 $\mu\text{g/kg}$ for rye.

Table 1. Average Se content ($\mu\text{g/kg}$) of grain crops (M \pm SD or/and range) in Hungary and in Europe

Crops	Own data in Hungary		European countries		Reference
	M \pm SD	Range	M \pm SD	Range	
Barley	43 \pm 10		18	2 - 110	16
"			33	27 - 42	3
"				<10 - 50	22
"			210	160 - 250	27
"			120		37
"			65 \pm 29	24 - 165	33
"			160 \pm 100		7
Barley flakes	51 \pm 8				
Corn	17 \pm 5		120 \pm 80		7
"			14 \pm 13	3 - 82	25
Corn flakes	32 \pm 7				
Oat	39 \pm 6				
"			16	3 - 54	16
"			25		18
"			35	20 - 44	3
"			58 \pm 15	36 - 92	33
"			110	70 - 140	27
"			140		37
"			10		15
Oat flakes	97 \pm 11				
Rye	47 \pm 9		16	6 - 72	16
"			67 \pm 31	19 - 138	33
"			120		37
"			190 \pm 100		7
Rape	18 \pm 5				
Sunflower	148 \pm 22				
Soybean	212 \pm 20				
Lucerne	230 \pm 15				
Wheat	27 \pm 8				
			21	4 - 87	16
			30		18
				100 - 170	22
			36	30 - 53	3
			200	190 - 200	27
			110		37
			69 \pm 37	13 - 235	33
			290 \pm 190	50 - 500	7
			210 \pm 120	"	7
			33	1 - 169	24
			20 \pm 12	4 - 66	25
			490	280 - 690	19

The mean Se concentrations according to the type of wheat from the South of Hungary were as follows: "Vilma II" $38 \pm 5 \mu\text{g/kg}$, "Emma III" $29 \pm 9 \mu\text{g/kg}$, "Góbé III" $34 \pm 5 \mu\text{g/kg}$, "Óthalom" $33 \pm 9 \mu\text{g/kg}$, "Pinka" $12 \pm 9 \mu\text{g/kg}$, "MV Emma" $12 \pm 6 \mu\text{g/kg}$, and "Fatima III" $14 \pm 7 \mu\text{g/kg}$. **Corn and rape** are also very poor in Se with values of 17 ± 5 and $18 \pm 5 \mu\text{g/kg}$ respectively. The analysis of oat and barley samples indicated slightly higher concentrations in oat namely 39 ± 6 and $43 \pm 10 \mu\text{g/kg}$ in barley. Significantly higher concentrations were found in lucerne: $230 \pm 15 \mu\text{g/kg}$, in sunflower: $148 \pm 22 \mu\text{g/kg}$ and in soya bean samples: $212 \pm 20 \mu\text{g/kg}$. A few processed cereals were also analyzed. Low Se levels were found in corn flakes: 32 ± 7 and $51 \pm 8 \mu\text{g/kg}$ in barley flakes, whereas oat cereal had comparatively higher value of $97 \pm 11 \mu\text{g/kg}$.

The average selenium concentrations measured in different type of flours are compared with those of breads and corresponding grains are illustrated on Fig. 1. In general, the average Se content in the bread varieties did not differ very much from the concentrations in the corresponding flours except breads containing oilseeds. The lowest Se contents of flours were found in whole 'Graham' wheat flour: $18 \pm 7 \mu\text{g/kg}$ and pure rye: $17 \pm 7 \mu\text{g/kg}$. Somewhat higher Se levels were found in wheat meal: $35 \pm 6 \mu\text{g/kg}$, pure wheaten: $41 \pm 7 \mu\text{g/kg}$ and rye: $44 \pm 8 \mu\text{g/kg}$. The highest concentration was found in whole rye: $66 \pm 6 \mu\text{g/kg}$. The Se concentrations of bread samples were found also low in wheat bran: $15 \pm 6 \mu\text{g/kg}$, white wheat: $21 \pm 8 \mu\text{g/kg}$. Considerable higher values were measured in whole rye: $52 \pm 7 \mu\text{g/kg}$, wheat and rye 'Komland': $56 \pm 7 \mu\text{g/kg}$ and whole brown: $68 \pm 9 \mu\text{g/kg}$. The highest Se content of all bread products was found in whole wheat 'Sesame seed': $75 \pm 10 \mu\text{g/kg}$.

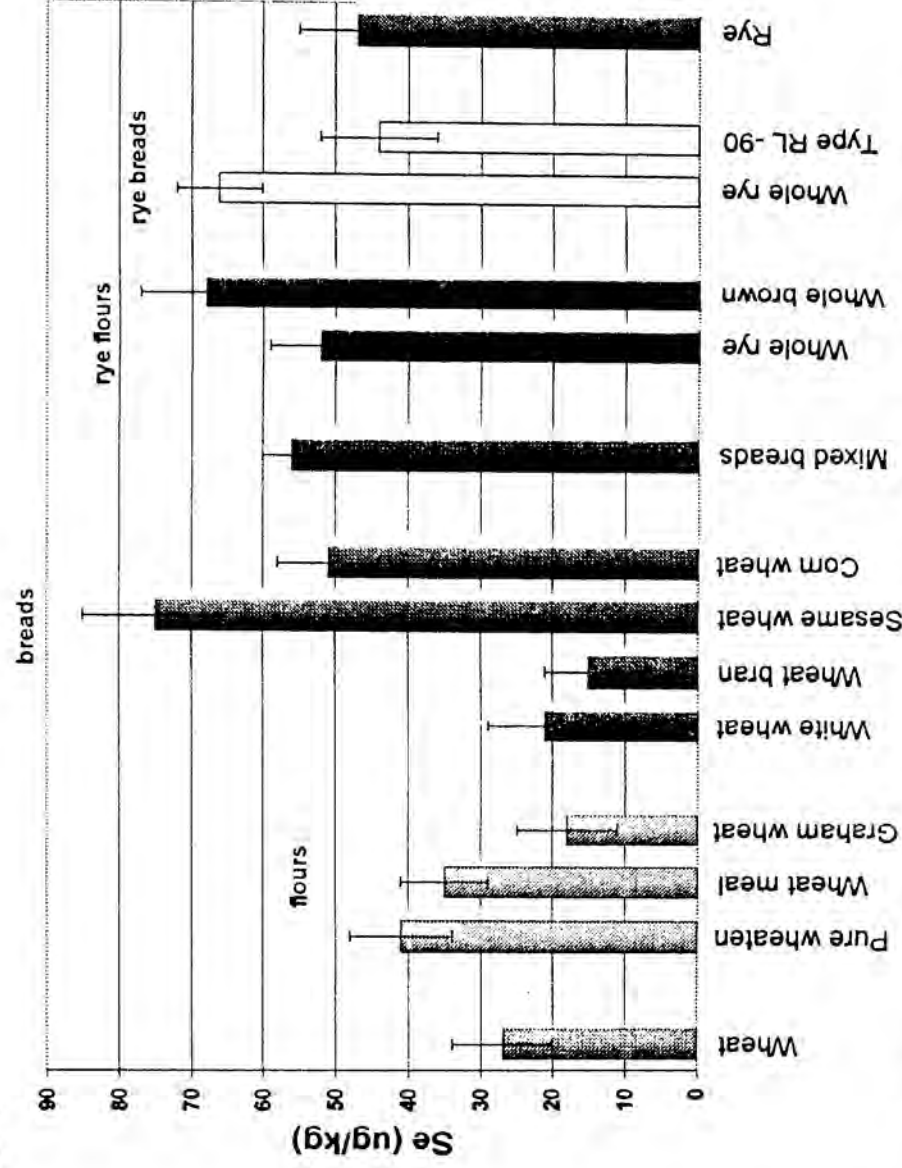


Fig. 1. Average Se concentration of wheat and rye grain, flour and bread varieties in Hungary

Selenium content of infant formulas and human milk

The values for Se content of infant formulas commercially available in Hungary are presented in Table 2. Selenium levels were also determined in breast milk from 10 mothers (4 to 8 weeks postpartum). The mean value was $13.7 \pm 2.3 \mu\text{g/L}$ or $10.8 \pm 1.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ dry weight with a range from 10.4 to 16.6 $\mu\text{g/L}$ and 7.8 to 13.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ dry weight. The Se content of infant formulas powder based on cow's milk varied between 3.4 to 7.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ or 4.4 to 9.9 $\mu\text{g/L}$ and found to be significantly lower in comparison with human milk. The average Se content of the formula manufactured in Hungary amounts to less than 30%, while the other products amounts to less than 60% of that of mature human milk.

Table 2. Selenium content of infant formulas and human milk (M \pm SD)

Sample	Se [$\mu\text{g}/100\text{g}$ dry weight]	Se [$\mu\text{g/L}$]
Beba 1	7.3 ± 0.5	9.5 ± 0.7
Morinaga BF	6.5 ± 0.4	8.4 ± 0.5
Aptamil	5.3 ± 0.4	7.4 ± 0.5
Nutrilon Premium	4.9 ± 0.6	6.4 ± 0.7
Mildibé	4.8 ± 0.3	6.2 ± 0.4
Robébi A	3.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5
Milumil	4.6 ± 0.3	7.4 ± 0.5
Beba 2	6.7 ± 1.1	9.9 ± 1.6
Robébi B	5.6 ± 0.6	7.2 ± 0.8
Human milk	10.8 ± 1.8	13.7 ± 2.3

The lowest Se concentration was found in the formula manufactured in Hungary (Robébi A), while the highest was measured in a formula from Denmark (Beba 1).

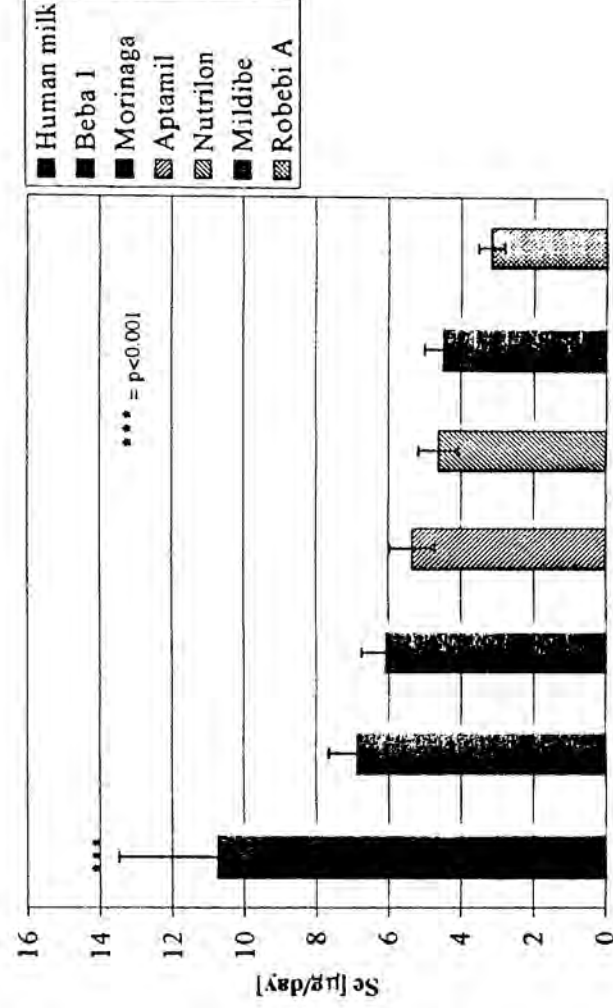


Fig. 2. Daily Se intake of infants (aged 4 to 8 weeks) from human milk and infant formulas

Human milk and cow's milk are rather low in Se. The Se content of colostrum is higher than that of mature human milk. The average Se content of mature human milk from healthy Hungarian mothers was as low as reported in several European countries but significantly lower than that of in other continents of the world (31). Similar to our results, low Se values were reported by Parr in a WHO/IAEA study (29) on human milk from Hungary

(range: 6.4 - 21 $\mu\text{gSe/L}$ with a median value of $13.9 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$).

Daily Se intakes were calculated for each infant (aged from 4 to 8 weeks), on the basis of the daily intakes of breast milk and resulted $10.7 \pm 2.7 \mu\text{g}$ on the average. Results are compared with data based on Se intake from formulas (Fig.2.). Low Se intake was found from formula Robébi A $3.2 \pm 0.4 \mu\text{g}$, and somewhat higher $6.9 \pm 0.8 \mu\text{g}$ from Beba 1. Despite the limited number of samples, our data show that the daily intake of Se was significantly higher ($p < 0.001$) in breast fed infants than in formula fed infants. When Se intake was normalized to body weight this difference remained significant ($p < 0.001$).

The results of this study show that the grain crops varied greatly in their Se content and the mean concentrations are quite low, when compared to similar cereals grown in other European countries (see references in Table 1.). The comparison of the results with those of the other countries is rather difficult, since the Se content shows considerable differences among different species and varieties of the same plant. Since concentrations of Se in the soils on the main agricultural regions of Hungary are very low, the low availability of Se for plants may explain the low Se content of the agricultural crops.

The Se content of basic carbohydrate nutrients surveyed in the present study found to be low in comparison with corresponding data of other European countries (4,7,25,33,34). The bread and the whole grain products are the major constituents of the traditional Hungarian diet, thus the Se intake is mainly determined by their Se content. Our data indicate that the low Se status in Hungary may be caused by the low Se supply in basic nutrients. We can conclude from our investigations that the quantity of Se in feed samples does not satisfy the nutritive needs of the animals either. The results obtained are preliminary and covered only the analysis of carbohydrates and the analyses will be continued in a more extensive study using the methodology of duplicate diet collection for various groups of Hungarian population in order to determine the daily dietary Se intake in Hungary.

Selenium requirements for infants have not been clearly defined, the recommended intake values are based on the Se content of human milk. A range of 7.5 - 15 $\mu\text{g/day}$ were estimated as the general Se intake worldwide (23). Since infant formulas available in Hungary have even lower concentrations than human milk, babies fed by these formulas may be at increased risk for inadequate Se intake or deficiency.

REFERENCES

1. Alfthan G., Bogve G., Aro A., Fehér J., Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 6, 233-238, 1992
2. Arthur J.R., Beckett P., New metabolic roles for selenium. Proc. of the Nutrition Society, 53, 616-624, 1994
3. Arvy M.P., Larnand M., Bonnemain J.L.: Teneur en selenium de quelques légumineuses et graminées cultivées dans le Limousin. C.R. Acad. Agric. Fr., 7, 481, 1974
4. Barclay M.N.I., Macpherson A., Selenium content of wheat for bread making in Scotland and the relationship between glutathione peroxidase levels in whole blood and bread consumption. Br. J. of Nutrition, 68, 261-270, 1992
5. Beck M.A., Shi Q., Morris V., Levander O. A., Nature Medicine, 1, 433-436, 1995
6. Becker D., Romic Z., Krsnjavib H., Zima Z., Biol. Trace Elem., Res. 33 (1992) 43-49
7. Bratakos, M. S., Ioannou P.V., The regional distribution of selenium in Greek cereals. The Sci. of the Total Env., 84, 237-247, 1989

8. Combs G.F.Jr., Clark L.C., Turnbull B.W. Reduction of cancer risk with an oral supplement of selenium. *Biomed. Environmental Sciences* **10**, 227-234, 1997
9. Cser A., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I., selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, **7**, 205-210, 1993
10. Cser M. A., Sziklai-László I., Menzel H., I. Lombeck: Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children. *J. Trace Elements Med. Biol.* **1996**, **10**, 167-173.
11. Cser M. A., Sziklai-László I., Laryea M.F., Lombeck I.: Antioxidant status of insulin dependent diabetics. In press 1998
12. Department of Health, Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the UK. Report on Health and Social Subjects no. 41, London: H.M. Stationary Office, 1991
13. Drosti I. Selenium, *J. Food and Nutr.* **43**, 60-78, 1986
14. Fáváro D.I.T., Hui M.L.T., Cozzolino S.M.F., Maitaha V.A., Armelin M.J.A., Vasconcellos M.B.A., Yuyama L.K., Boaventura G.T., Tramonte V.L.: Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **11**, 129-136, 1997
15. Froslic, A., Karlson, J.T., Rygge T., Selenium in animal nutrition in Norway. *Acta. Agric. Scand.* **30**, 17-25, 1980
16. Gissel-Nielsen, G., Selenium concentration in danish forage crops. *Acta Agric. Scand.* **25**, 216-220, 1975
17. Gondi F., Pantó Gy., Fehér J., Bogyé G., Alfthan G., *Biol. Trace Elem. Res.*, **35**, 299-306, 1992
18. Heys, V., Hill, R., The selenium concentration of cereal grain and conserved herbage from farms in England and Wales. *J. Agric. Sci. Camb.* **102**, 367-369, 1984
19. Jönsson, G., Pehrson B., Selenium - a trace element of great significance for the health of livestock. In: *Geochemical Aspects in Present and Future Research*, Lag J., Ed., Universitetsforlaget, Oslo, 103, 1980
20. Koivistoinen P., Varo P., Selenium in Finnish Food. In: *Selenium in Biology and Medicine Part B*, Combs G.F., et al. Editors, An AVI New York, 645-651, 1987
21. Kok F.J., Hofman A., Witteman J.C.M., de Bruin A.M., Kryssen D.H.C.M., de Bruin M., Valkenburg H.A., Decreased selenium levels in acute myocardial infarction. *J. of the Am. Med. Assoc.*, **261**, 1161-1164, 1989
22. Korkman J., The effect of selenium fertilizers on the selenium content of barley, spring wheat and potatoes. *J. Sci. Agric. Soc. Finland*, **52**, 495, 1980
23. Kumpulainen J., Selenium Requirement and supplementation. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **351**, 114-117, 1989
24. Lag J., Steinnes E., Contents of some trace elements in barley and wheat grown in Norway, *Meld. Nor. Landbrukshogsk.*, **57**, 1, 1978b
25. Maksimovic, Z.J., Djujic I., Jovic V., Rsumovic M., Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biol. Trace Elem. Res.*, **33**, 187-196, 1992
26. National Research Council, Food and Nutrition Board: *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989
27. Oelschlagel, W., Menke, K.H., Über Selengehalte pflanzlicher, tierischer und andere Stoffe. *Z. Ernahrungswissenschaft* **9**, 208-222, 1969
28. Oster O., Drexler M., Schenkle J., Meinertz T., Kasper W., Schuster C.J. and Prellwitz W., The serum Se concentration of patients with acute myocardial infarction. *Annals. Clin. Res.* **18**, 36-42, 1986
29. Parr R.M., et al., Minor and trace elements in human milk from Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines, Sweden and Zaire, *Biol. Trace Elem. Res.*, **29**, 51-75, 1991
30. Pennington J.A.T., Schoen S.A.: Contribution of food groups to estimates intakes of nutritional elements. Results from the FDA Total Diet Studies, 1982-1991. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **66**, 342-349, 1996
31. Robberecht H., Benemariya H., Declstra H.: Daily dietary intake of copper, zinc and selenium of exclusively breast-fed infants of middle-class women in Burundi, Africa, *Biol. Trace Elem. Res.* **49**, 151-159, 1995

32. Salonen J.T. and Huttunen J.K. Se in cardiovascular diseases. *Annals. Clin. Res.* **18**, 30-35, 1986
33. Schulte W., Untersuchungen zum Selengehalt von Futter- und Nahrungsmitteln in der Bundesrepublik Deutschland, Inaugural-Dissertation, 1988
34. Stacchini A., Coni E., Baldini M., Beccaloni E., Caroli S., Selenium intake with diet in Italy: A pilot study. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, **3**, 193-198, 1989
35. Sziklai L.I., Cser A., Lombeck I.: Determination of Selenium in biological materials by INAA. *J. Radioanal. and Nucl. Chem., Articles*, **190** (1) 23-30, 1995
36. Thomson C.D., Rea H.M., Doesburg V.M., Robinson M.F.: Selenium concentration and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br. J. Nutr.*, **37**, 457-460, 1977
37. Wiesner E., Berschneider F., Neuffer K., Menzel M., Selenwerte in Futtermitteln. *Arch. Tierern.* **24**, 601-610, 1974
38. World Health Organization Geneva : Trace elements in human nutrition and health. Macmillan-Ceuterick, India-Belgium 1996



St Malo, France, 8-13 Septembre 1996

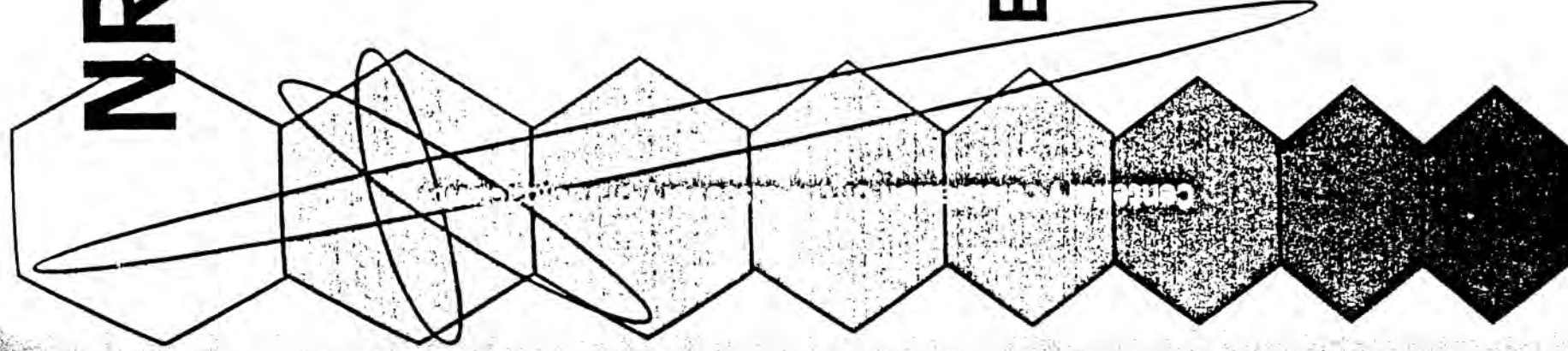
NRC4

**4th International
Conference on
Nuclear and
Radiochemistry**

Extended Abstracts

Volume II

Editeurs : F. DAVID ET J.C. KRUPA
Institut de Physique Nucléaire
F 91406 - ORSAY cedex



1896 - 1898
CENTENAIRE
DE LA DÉCOUVERTE
DE LA RADIOACTIVITÉ
1996 - 1998

DETERMINATION OF SELENIUM IN BLOOD AND FOOD SAMPLES FROM HUNGARY BY AAS AND INAA

I. Sziklai-László*, Á. Cser**, I. Lombeck***

*KFKI Atomic Energy Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences,
P.O. Box 49, H-1525 Budapest, Hungary

**Bethesda Children Hospital, H-1146 Budapest Bethesda Street 3, Hungary

***Children's Hospital, Medical University of Düsseldorf, D-40225, Germany

ABSTRACT

Atomic absorption spectrophotometry (AAS) was applied to determine the plasma and whole blood selenium levels of 308 healthy individuals from three different regions of Hungary. Variations in age and sex were also investigated. Se content of some agricultural crops: wheat, barley, oat, rye, soya-bean, corn, sunflower and lucerne was measured by instrumental neutron activation analysis (INAA). Wheat and rye flours as well as different kinds of breads were also studied for their selenium content.

INTRODUCTION

Selenium is an essential trace element and selenium deficiency is related to several diseases in humans and animals. Selenium status depends mainly on dietary intake of this element which is determined by the selenium content of all food sources. Se intake shows large geographical variation according to different Se contents of soil and locally produced food. Study on the average concentrations of Se in soils in Hungary indicated low Se levels of 0.1 to 0.4 ppm [1]. The main aim of the present study was to investigate the selenium levels in plasma, whole blood and erythrocytes and their changes with age in children living in three geographical regions of Hungary and adults from only one location. INAA procedure using the ^{75}Se isotope was developed and applied for the determination of Se levels in basic food ingredients such as wheat and rye flours and bread sorts produced in Hungary. In addition, the Se content of some grain crops: barley, corn, lucerne, oat, rape, rye, soya-bean, sunflower and wheat was also measured.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and sample preparation

Blood samples: For present purposes investigation included 307 healthy individuals. 161 children of both sexes, aged 1 to 15 years, from three different geographical regions i.e. from Budapest, from a rural area in the South-East part of the country and from the vicinity of an industrial city in the North-West area of Hungary were selected. The group of 146 adults (males and females) with ages ranging between 20 and 60 years were all from the North-West region. The sampling and sample preparation procedure employed was described earlier [2,3]. Se determinations in whole blood and plasma were performed by means of AAS based on hydride generation. The accuracy of the Se determination was tested by analyses of standard reference material NBS 1577a Bovine Liver and human reference blood (Seronorm™ Trace Elements Nycomed, Oslo, Norway). Results obtained agreed very well with the certified values. The precision was verified by analyzing pooled plasma and blood samples. Within run and between day run precisions were 3.3% and 4.8%, respectively. Erythrocyte selenium was calculated from the individual packed cell volumes, plasma and whole blood Se of each child.

Food samples: In order to initiate a study on the Se intake in Hungary, the representative grain crops from the agricultural area of the North-West region of Hungary were investigated. Barley, corn, lucerne, oat, rape, rye, soy-bean, sunflower and wheat were selected for analysis and collected from an agricultural firm. The samples were washed with distilled water prior to analysis, lucerne, rape and soy-bean samples were homogenized and dried for 48 hours at 80 °C to constant weight and were analyzed in duplicates. For the other crops the whole seeds were investigated. Flours and different kinds of bread products were purchased in food stores.

Analyses of food samples by INAA

For INAA analysis, sample masses of 100-300 mg from each were sealed in irradiation vials of high purity quartz (SUPRASIL). The samples together with selenium standards were irradiated with a geometry identical to that of the samples for 24 to 48 hours at a neutron flux density of $8 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in the WWR-M type nuclear research reactor of the KFKI Atomic Energy Research Institute (Budapest, Hungary). For gamma spectroscopy measurements a Canberra Ge(Li) detector (with energy resolution of 1.82 keV and efficiency of 13.6% for the 1332.5 keV ^{60}Co line) was used. The γ -spectra were measured for 5, 15 and 20 hours, after a decay time of 40-90 days. The accuracy of the Se determination by INAA was tested by co-analyses of biological standard reference materials. NIST SRM 1567a Wheat Flour: the value found $1195 \pm 78 \mu\text{g Se/kg}$ ($n=16$), agreed very well with the certified value of $1100 \pm 200 \mu\text{g Se/kg}$, NBS SRM 1568 Rice Flour: the measured $369 \pm 21 \mu\text{g Se/kg}$ value ($n=5$) was compared to the recommended value of $400 \pm 100 \mu\text{g Se/kg}$ and NIST SRM 1548 Total Diet: the value obtained $240 \pm 14 \mu\text{g Se/kg}$ ($n=5$) agreed well with the certified value of $245 \pm 5 \mu\text{g Se/kg}$. Assessment of precision of the method was evaluated by analyzing 10 replicates of rye flour pool. The results of the replicate analyses showed that, under the experimental conditions used in this study, the precision (coefficient of variation) of the selenium determination (mean \pm SD, $40.7 \pm 2.6 \mu\text{g Se/kg}$) was 6.5%, being consistent with the counting statistics (varied from 5-10% in these determinations).

RESULTS AND DISCUSSION

Selenium levels in plasma, whole blood and erythrocytes: The results on the Se content in plasma, whole blood and erythrocytes of Hungarian children and adults are given on Fig.1. The Se values of children were found lower than that of in adults both in plasma (0.63 ± 0.12 versus $0.73 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$), and in whole blood (0.81 ± 0.14 versus $0.92 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$). A linear age dependencies of Se concentrations were found in plasma and whole blood, up to 10 years of age. The resulting significant positive correlation between age and Se concentrations are: in whole blood ($r=0.535$, $n=76$, $p<0.001$) and in plasma ($r=0.564$, $n=76$, $p<0.001$). Children under the age of five years ($n=42$) had significantly lower whole blood Se (0.74 ± 0.11 versus $0.83 \pm 0.13 \mu\text{mol/L}$, $p<0.001$) and plasma Se (0.55 ± 0.11 versus $0.66 \pm 0.10 \mu\text{mol/L}$, $p<0.001$) compared to those above six years ($n=119$). In the whole group of children, the concentration of Se in ery was 40 % higher on the average than in whole blood and it was 30% higher in the age group of 16 to 60 years. Considering the whole group of population investigated (children and adults) the Se levels were highest in the age group of 21 to 30 years in plasma: $0.78 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$, in whole blood: $0.98 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$ and in erythrocytes: $1.26 \pm 0.25 \mu\text{mol/L}$.

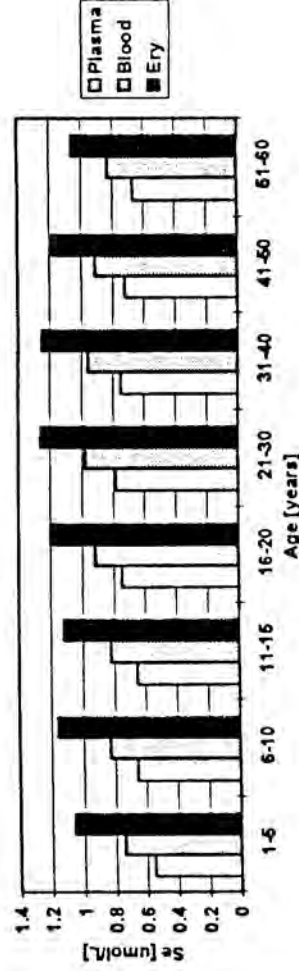


Fig.1.
Selenium concentrations in the plasma, blood and erythrocytes of healthy Hungarian children and adults with different age groups

Plasma Se was on the average 30% lower than whole blood levels in children and 20% lower in the adult population. With regard to sex, boys tended to have higher Se levels than girls in each blood component but these differences did not reach the significance of the $p < 0.05$ level, and concerning the whole population, the Se levels were higher in males than in females ($n = 194$ versus $n = 114$, $Z = 2.67$, $p < 0.05$).

The comparisons of the results of the Se levels of children living in geographically three different areas of Hungary are shown on Fig.2. It was found that the children aged 6 to 15 years living in the vicinity of Kiskőrös had significantly lower Se values compared to the corresponding age groups of children in Tatabánya or in the capital Budapest. Our results suggest, that the Se intake was low in the rural area compared to the other regions. The Se content of the soil may be different and the available Se may be lower in the Eastern region than that of the areas in the North-West or in the vicinity of the capital. In

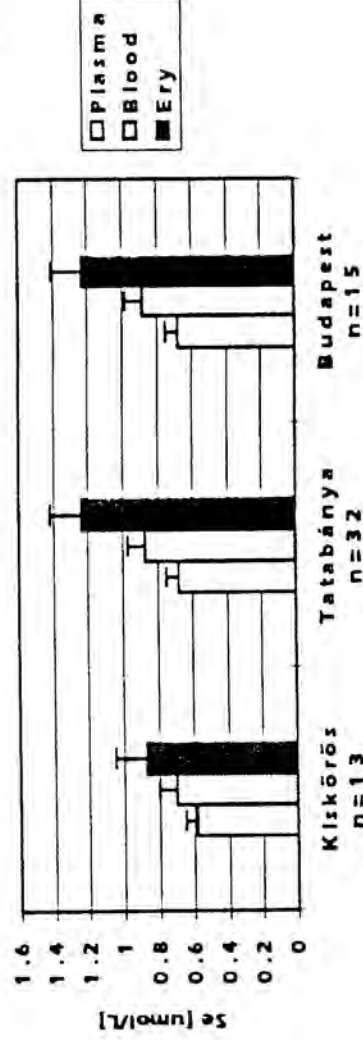


Fig.2.
Comparison of selenium levels of healthy children from different regions in Hungary

agreement with our former results [2], where it was shown that the selenium status of Hungarian children is significantly lower than that of the healthy German ones ($p < 0.001$), the present study shows that the Hungarian children, independent of their geographical location, or of their age, as well as the adult population have lower Se status compared to values of inhabitants from other European countries [6].

Analysis of food samples: The Se content of representative agricultural crops grown in Hungary, such as barley, corn, lucerne, rape, rye, oat, soybean, sunflower, wheat and some basic nutrients such as wheat and rye flours, different kinds of bread products are

presented. Low Se concentration was observed in samples of wheat and rye. Se content of wheat ranges from 16 to 47 µg/kg, mean value of 27 µg/kg, and 47 µg/kg for rye. Corn and rape are also very poor in selenium with values of 17 and 18 µg/kg respectively. The analysis of oat and barley samples indicated slightly higher concentrations in oat namely 39 and 43 µg/kg in barley. Significantly higher concentrations were found in lucerne: 230 µg/kg, in sunflower: 148 µg/kg and in soy-bean samples 212 µg/kg. A few processed breakfast cereal were also analyzed. Low Se levels were found in corn flakes: 32 and 51 µg/kg in barley flakes, whereas oat cereal had comparatively higher value of 97 µg/kg. From the results it can be seen that the grain samples varied greatly in their Se content and the mean concentrations are quite low, compared to similar cereals grown in other European countries [4,5]. The comparison of the results with those of the other countries is rather difficult, since the Se content may show considerable differences among different species and varieties of the same plant. Concentrations of Se in the soil are also very low in most regions of Hungary [1] thus the low availability of Se for plants may explain the low Se content of the agricultural crops.

The bread, and the whole grain products, being major constituent of the diet of people can be the main Se supplies for humans. Cereals and their products account for nearly half of the daily intake of Se.

In the present study the lowest Se content of flours was found in whole 'Graham' wheat flour: 18 µg/kg and pure rye : 17 µg/kg. Somewhat higher Se levels were found in wheat meal: 35 µg/kg, pure wheaten: 41 µg/kg and rye :44 µg/kg. The highest concentration was found in whole rye: 66 µg/kg. The Se concentrations of bread samples were found also low in wheat bran: 15 µg/kg, white wheat: 21 µg/kg. Considerable higher values were measured in corn wheat: 51 µg/kg, whole rye: 52 µg/kg, wheaten rye 'Kornland': 56 µg/kg and whole brown: 68. µg/kg. The highest Se content of all bread products was found in whole wheat 'Sesame seed': 75 µg/kg.

Considering our present results on limited data of foodstuffs, we can not give a full estimation on Se intake levels in Hungary, since there is a need to analyze substantially more samples.

Our data indicate, however, the low Se status in Hungary may be caused by the low Se supply in basic nutrients.

The authors want to acknowledge the financial support for this work provided by the National Foundation for Scientific Research (OTKA, registration No. T 017146).

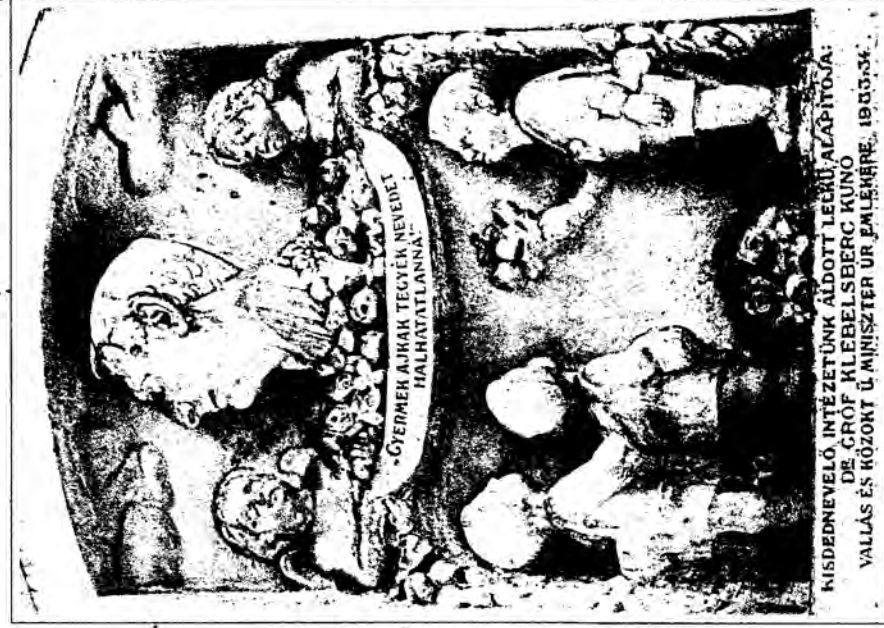
REFERENCES

1. Gondi F., Pantó Gy., Fehér J., Bogye G., Alfthan G., Biol. Trace Elem. Res., **35** (1992) 299-306
2. Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I., Trace Elem. Electrolytes Health Dis., **7**, (1993) 205-2102
3. Sziklai L.I., Cser Á., Lombeck I., J. Radioanal. and Nucl. Chem., Articles, **190** (1) (1995) 23-30
4. Bratakos M.S., Ioannou P. V., The Sci. of the Total Env., **84** (1989) 237-247
5. Pendiás-Kabata A., Pendiás H., Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1986.
6. Becker D., Romić Z., Krsnjavić H., Zima Z., Biol. Trace Elem., Res. **33** (1992) 43-49

Gyermek- gyógyászat



GYERMEK-ÉS IFJÚSÁG-EGÉSZSÉGÜGYI SZAKLAP



MAGYAR GYERMEKORVOSOK TÁRSASÁGÁNAK ORSZÁGOS FOLYÓIRATA

Szelén és glutathion peroxidázok egészséges gyermekekben és felnőttekben

Cser Mária Ágnes, Sziklai-László Ibolya*, Menzel Helmut** és Lombeck Ingrid***

Magyar Református Egyház Bethesda Gyermekkórháza, Budapest

*KFKI, Atomenergia Kutató Intézet, Budapest, **Orvostudományi Egyetem

Toxicológiai Intézet, Düsseldorf, ***Orvostudományi Egyetem

Gyermekklinika, Düsseldorf

Összefoglalás

A plazma, vér és vörösvérsejt (vvs) szelén (Se) koncentrációit (AAS HG), valamint a plazma és vvs glutathion peroxidáz (GSH-Px) enzim aktivitásait mértük 308 egészséges, 1-60 éves korú egyénben. Gyermekekben és felnőttekben a plazma $0,63 \pm 0,12$ versus $0,73 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/L}$ és a vér Se $(0,81 \pm 0,14$ versus $0,92 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/L}$) tartalma a legkisebnek bizonyult Európában. A Se-szintek az életkorral egyenes arányban emelkedtek, 20-30 év közötti maximummal. A plazma GSH-Px aktivitás az életkorral növekedett, a felnőttek értékei $(110 \pm 22$ U/L) nagyobbak, mint a gyermekeké $(87 \pm 19$ U/L). A reprodukív korban lévő nőkben nagyobbak a vvs GSH-Px aktivitások, mint azonos korú férfiakban. Mind a két enzim aktivitása szoros összefüggést mutatott a Se-szintekkel. Ez arra utal, hogy Magyarországon kevés a Se-kínálat, mely rossz Se-ellátottságot eredményez a magyar lakosságban.

Kulcsszavak:

szelén, glutathion peroxidáz, normál értékek vérben

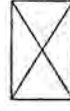
Bevezetés

Több mint másfél évszázada, 1817-ben fedezte fel *Berzelius*⁽¹⁰⁾ a szelén (Se) elemet. Sokáig csak toxicus hatását ismerték, a magas Se-tartalmú növényeket fogyasztó állatok intoxicatio tüneteivel pusztultak el.⁽⁶⁴⁾ Mindössze négy évtizede bizonyított, hogy esszenciális nyomelem az állat számára,⁽⁷⁶⁾

alacsony Se-bevitel májnecrosist okoz, mely Se-adással kivédhető.

Az 1970-es évek elején figyeltek fel Kínában arra, hogy egy, már évtizedek óta ismert, főként gyermekeket és gravid édesanyákat érintő endemiás betegség Se-adással uralható.⁽²⁾ 1973-ban két kutatócsoport^(26, 65) állati sejtekből izolálta az első Se-t tartalmazó enzimet, a glutathion peroxidázt (GSH-Px). 1975-ben emberi vörösvérsejtekben is felfedezték az enzimet,⁽⁴⁾ ezzel bebizonyosodott, hogy az ember számára is esszenciális nyomelem. A Se a GSH-Px enzim alkotóeleme, az enzim pedig minden humánszövetben jelen van. A Se selenocysteinként épül a enzimbe^(27, 94) és mint cystein analóg, a kén helyét elfoglalhatja. Ezen biokémiai tulajdonság magyarázza a Se fontos szerepét a szervezetünk oxidáció elleni védőrendszerében, mert könnyebben redukálódik, mint a kén.⁽²⁸⁾ A GSH-Px katalizálja a peroxidok redukcióját, védi a sejtet az oxidatív károsodástól.⁽⁵⁵⁾ A három különböző GSH-Px, a plazma,^(16, 47, 74) az intracelluláris és a membránhoz kötött phospholipidglutathion peroxidázon⁽⁸¹⁾ kívül egyéb sele-

Gyermekgyógyászat 1996. 5.



Dr. Cser Mária Ágnes
Magyar Református Egyház
Bethesda Gyermekkórháza,
Budapest, Bethesda u. 3-5.

1146

noenzymeket és selenoproteineket is izoláltak emberben. Az I jódtthyronin 5'-deiodináz selenoenzim katalizálja a thyroxin (T4) biológiai aktív trijodthyroninná (T3) történő átalakulását,⁽⁷⁾ egy második, thyreoida funkcióban szereplő selenoenzimet 1995-ben fedeztek fel.⁽⁴⁶⁾ Számos selenoprotein humánbiológiai szerepének tisztázása a jelen kutatások tárgya.^(8, 9) A Se esszenciális microelem voltát kiemeli a magas biológiai hatékonysága. Diétánkban 1 ppm nagyságrendben van Se, ha azonban 10 ppm-re emelkedik a Se-bevitel, toxicus tünetek mutatkoznak.⁽⁶⁰⁾

A Se-hiány következményei az állatokban jól ismertek. Növekedésbeni elmaradás, bőrlaesiók, szőrzet elvesztése, cataracta kialakulása, látásélesség csökkenése, pancreas atrophia, májnecrosis, szív- és vázizomzat sorvadása, csökkent fertilitás tünetei észlelhetők.^(58, 71)

Emberben először 1980-ban írták le Se-hiány okozta, endemiás betegségeket Kína csökkent Se-ellátottságú területein. A *Kashan* betegség^(2, 19) fő jellemzője a cardiomyopathia, a *Kaschin-Beck* betegségé^(29, 80) az osteoarthropathia. Hasonló tünetek észlelhetők tartósan parenterálisan táplált betegekben⁽⁶⁰⁾ és súlyos gastrointestinális betegségben szenvedőkben.^(11, 52) Macrocystosis,⁽⁵⁷⁾ pseudoalbinizmus, világos bőrfoltok, hajritkulás, hajhullás,⁽⁸⁹⁾ vázizomzat gyengesége,⁽⁸⁰⁾ dilatatív cardiomyopathia⁽⁶³⁾ tüneteit írták le alacsony vér-Se-szintek kísérőiként. Se-pótlás hatására a tünetek részben reversibilisnek bizonyultak, részben letálisán végződtek.⁽⁴¹⁾

A csökkent glutathion peroxidáz aktivitás összefüggést mutat cardiovascularis megbetegedések,^(67, 90) myocardialis infarctus,⁽⁶⁶⁾ atherosclerosis,⁽⁵⁶⁾ malignus daganatok,⁽⁶⁹⁾ immunfunctio-zavarok,⁽³⁸⁾ és neuro-geriatriai kórképek^(3, 20) morbiditási és mortalitási indexeivel.

Magyarországon igen nagy a fiatal és középkorúak mortalitása és ebben vezető szerepe van a cardiovascularis betegségeknek.⁽⁵⁾ A kiváltó okok között a csökkent Se-status elsősorban a tápláléklánccal felvett Se mennyiségétől függ.⁽⁷⁷⁾

Gondi⁽³¹⁾ mérései alapján a magyar táplajminták közel 90 százalékában 0,1 ppm-

nél kevesebb a Se-tartalom. Felneőttek serülmában,^(1, 12, 31) plazmájában⁽⁷³⁾ és gyermekek körömmintáiban⁽¹²⁾ kis koncentrációkat mértek hazai szerzők. Ezen adatok arra utaltak, hogy Magyarország rossz v. csökkent Se-ellátottságú, ezért részletes Se-status felmérése szükséges minden életkorban. A jelen tanulmány az első megfigyelés Magyarországon, melyben szelén meghatározás történt, egészséges gyermekek és felnőttek vörösvérsejt-, teljes vér- és plazmamintáiban egyidejűleg a vörösvérsejt és plazma glutathion peroxidáz aktivitás mérésével.

Vizsgált személyek és módszerek

161 egészséges, 1–15 éves, Tatabányán, Budapesten és Kiskőrösön élő gyermeket és 147 egészséges, tatabányai 16–60 éves felnőttet vizsgáltunk. A gyermekek súly- és hosszértékei 25–75%, a felnőttek ugyanezen adatai 50 és 125% közé estek. A vizsgált egyének adatait az első 20 életévben 5 évenkénti, a 20 és 60 év közöttieket 10 évenkénti csoportokban analizáltuk. Reggel 8–9 óra között, éhezési állapotban vettünk 4 ml vért nyomelemmentes, EDTA-s műanyag csőbe. A felnőttek és a gyermekek szülei írásos beleegyezésüket adták a mintavételhez, mely évenkénti ellenőrzésük vagy kisebb sebészi beavatkozásuk előtti vérévételkel azonos időben történt. Az érintett intézetek etikai bizottságai hozzájárulásukat adták. A mintavétel után két órán belül szeparáltuk a plazmát, a vörösvérsejtek háromszor mostuk 0,9%-os NaCl-oldattal, nyomelemmentes, műanyag pipettákkal. A minták szállítása +4 °C-on, a tárolásuk –80 °C-on történt. Teljes vérből és plazmából végeztük a Se-meghatározásokat hidridfóttal kiegészített atomabsorptív spektrometriával.⁽⁴⁵⁾ A vörösvérsejtek (vvs) Se-tartalmát a vér (v) és plazma (pl) Se-koncentráció- és a haematocritértékek ismeretében egyenként számoltuk ki. Két referenciaanyagot, valamint v és pl poolt alkalmaztunk minden meghatározásnál a mérések pontosságának ellenőrzésére. A humánreferencia vérben (SeronomTM Trace Elements Nycomed, Oslo, Norvégia) $90,6 \pm 1,2 \mu\text{g Se/L}$ (n=87) értéket mértünk, a hitelesített koncentráció 90 $\mu\text{g Se/L}$ volt. A referencia Bovine Liver-ben (NBS 1577a US Department of Commerce,

Gaithersburgh) 705 ± 11 ng Se/g ($n=66$) értéket kaptunk, a hitelesített koncentráció 710 ± 70 ng Se/g volt. A v pool variációs koefficiense 2,8%-nak adódott egy napon belül ($n=15$) és 4,1%-ot ért el meghatározások között ($n=152$). A pl pool variációs koefficiense 2,8% volt meghatározáson belül ($n=8$) és 3,9% ($n=148$) mérési napok között. A plazma GSH-Px (E. C. 1.11.1.9.) aktivitást *Flohé és Günzler*⁽²⁶⁾ szerint t-BOOH, a vörösvérsejtek enzimaktivitását *Weindel*⁽⁹⁵⁾ szerint, H_2O_2 acceptor substrát segítségével mértük fotometriával. Minőségi kontrollként két különböző pl és vvs poolt használtunk. A mérési napon belüli és a napok közötti variációs koefficiensek 3,2% ($n=25$ és 17) és 5,1% ($n=116$ és 108) értékeket adtak a két plazma poolban, 3,4% ($n=19$ és 28) és 5,6% ($n=102$ és 121) értékeket a két vvs poolban. Az adatok matematikai statisztikai feldolgozása SPSSTM programmal történt.

Eredmények

A földrajzilag három különböző régióban élő gyermekek eredményeit egy csoportként értékeltük, a részeredményekről külön munkában számoltunk be.⁽²³⁾ Mind a Se-paraméterek, mind a plazma és vörösvérsejt GSH-Px aktivitás értékei normális megoszlást mutattak, a korcsoportok átlag (\pm SD) értékeit az 1. táblázatban foglaltuk

össze. A haemoglobin- és haematocritértékek a kornak megfelelőek voltak. A vvs Se-tartalom átlagosan 40%-kal volt magasabb, mint a teljes vér Se-tartalma a gyermekekben, míg 16–60 éves kor között a különbség csupán 30%. A plazma Se-koncentrációja 30%-kal kevesebb, mint a teljes véré a gyermekekben, felnőttekben 20% a különbség. 1–30 éves kor között a vvs Se-tartalom keveset emelkedett, ugyanezen időben azonban a korrall egyenes arányban, significans növekedést mutatott a vér ($r=0,61$ $p<0,001$) és a plazma ($r=0,63$ $p<0,001$) Se-tartalma. A 21–30 évesek Se-paraméterei a legmagasabbak, significansan magasabbak, mint a 16 év alatti gyermekek vagy a 40 év felettek értékei. 30 év felett a Se-koncentrációk csökkennek, az 50–60 éves kortúak Se-szintjei az 1–5 évesekéhez hasonlóan alacsonyak. Európai országok egészséges gyermek- (2. táblázat) és felnőtt- (3. táblázat) populációinak Se-koncentrációit tartalmazó adatait összehasonlítás céljából mutatjuk be. A pl és vvs GSH-Px aktivitás (1. táblázat) szintén az életkorral arányosan növekedik az első két évtizedben, a 16–20 évesek értékei a legnagyobbak, 40 év felett mindkét enzim aktivitása significansan kisebb, mint a 16–20 éveseké. A nemek közötti Se-koncentrációkülönbség a gyermekkorban

1. TÁBLÁZAT

Szelen koncentráció és glutathion peroxidáz aktivitás (M \pm SD) egészséges magyar populációban

Kor (évek)	N	Plazma Se (μ mol/L)	Vér Se (μ mol/L)	Ery Se (μ mol/L)	Pl GSH-Px (U/L)	Ery GSH-Px (U/gHb)
1–5	42	$0,55 \pm 0,11$	$0,74 \pm 0,13$	$1,06 \pm 0,21$	79 ± 21	$5,44 \pm 0,90$
6–10	59	$0,66 \pm 0,10$	$0,83 \pm 0,13$	$1,16 \pm 0,19$	88 ± 20	$5,84 \pm 0,99$
11–15	60	$0,65 \pm 0,09$	$0,82 \pm 0,11$	$1,12 \pm 0,18$	92 ± 18	$6,12 \pm 0,97$
16–20	16	$0,75 \pm 0,09$	$0,92 \pm 0,14$	$1,20 \pm 0,25$	117 ± 20	$6,87 \pm 1,25$
21–30	30	$0,78 \pm 0,14$	$0,98 \pm 0,15$	$1,26 \pm 0,25$	113 ± 18	$6,54 \pm 1,17$
31–40	50	$0,75 \pm 0,13$	$0,96 \pm 0,15$	$1,25 \pm 0,24$	114 ± 20	$6,32 \pm 1,51$
41–50	29	$0,72 \pm 0,15$	$0,91 \pm 0,16$	$1,18 \pm 0,25$	109 ± 29	$6,19 \pm 1,38$
51–60	22	$0,67 \pm 0,19$	$0,83 \pm 0,17$	$1,06 \pm 0,23$	100 ± 28	$6,26 \pm 0,91$

2. TÁBLÁZAT

Szélén ($M \pm SD$ $\mu\text{mol/l}$) egészséges európai gyermekekben

Ország	Módszer	N	Életkor	Serum, Plazma	Vér	Szerző	Dátum
Anglia	AAS	59	4-9	-	1,33 \pm 0,24	Lloyd	1989
"	"	20	3-15	-	1,47 \pm 0,26	"	"
"	"	38	6-7	-	1,28 \pm 0,14	"	"
Anglia	Đ	21	2-4	0,82 (median)	-	Thomas	1994
"	"	49	4-16	0,99 (median)	-	"	"
Ausztria	AAS	58	1-2	0,44 \pm 0,14	0,53 \pm 0,08	Tiran	1992
"	"	50	3-4	0,61 \pm 0,16	0,70 \pm 0,08	Tiran	1993
Belgium/Hollandia	AAS	16	2-15	-	0,98 \pm 0,16	vanCaillie	1986
Belgium	AAS	32	2-12	-	1,19 \pm 0,20	van Dael	1994
Cseh Közt.	FM	184	6-13	0,71	-	Kvicala	1995
Finnország	FM	13	7-12	0,65 \pm 0,17	0,76 \pm 0,18	Westermarck	1977
Finnország	AAS	13	4-8	0,82 \pm 0,10	-	Gebre-Mehdin	1984
Finnország	AAS	144	1-19	0,87 (1985)	-	Wang	1995
"	"	95	"	1,34 (1989)	-	"	"
Franciaország	AAS	118	2-5	0,79 \pm 0,18	-	Chakar	1993
Görögország	FM	20	0-5	-	1,10 \pm 0,16	Bratakos	1990
"	"	16	5-10	-	1,54 \pm 0,18	"	"
"	"	30	1-20	-	2,16 \pm 0,24	"	"
Görögország	AAS	18	6-10	0,72 \pm 0,11	-	v.Cauwenb.	1990
"	"	19	11-20	0,76 \pm 0,20	-	"	"
Horvátország	AAS	63	8-15	0,72 \pm 0,11	-	Becker	1992
Lengyelország	FM	36	1-3	0,69 \pm 0,18	0,96 \pm 0,25	Wisowicz	1994
"	"	76	3-7	0,79 \pm 0,18	1,05 \pm 0,24	"	"
Magyarország	AAS	42	1-5	0,55 \pm 0,11	0,74 \pm 0,13	Cser	1996
"	"	59	6-10	0,66 \pm 0,10	0,83 \pm 0,13	"	"
"	"	60	11-15	0,65 \pm 0,07	0,82 \pm 0,11	"	"
Németország	NAA	30	1-5	1,04 \pm 0,15	-	Lombbeck	1977
"	"	28	6-20	1,17 \pm 0,14	-	"	"
Németország	AAS	25	2-15	-	0,98	Heinzow	1989
"	"	43	"	-	1,32	"	"
"	"	51	2-15	-	1,05	"	"
Németország	AAS	67	1-15	0,85 \pm 0,20	1,07 \pm 0,20	Cser	-
Olaszország	AAS	182	6-11	1,03 \pm 0,16	-	Morisi	1989
"	"	187	9-13	1,01 \pm 0,12	-	"	"
"	"	848	11-15	1,00 \pm 0,14	-	"	"
Olaszország	"	217	12-13	1,05 \pm 0,16	-	Marano	1991
Olaszország	"	627	12-13	1,04 \pm 0,13	-	Spagnolo	1991
Törökország	FM	76	0,2-13	1,12 \pm 0,16	-	Hincal	1989
"	"	77	1-16	0,98 \pm 0,15	-	"	1994
Jugoszlávia	FM	79	1-16	0,68 \pm 0,07	-	Mikac-Devic	1990

nem volt jelentős, az egész populációra vonatkoztatva azonban a férfiaknál nagyobb volt (194 ffi versus 114 nő $Z=2,67$ $p<0,05$). Gyermekkorban a pl GSH-Px aktivitásban nem volt nemek közötti különbség, 16-50 éves korban a nők pl enzim-
 tékei significiansan nagyobbak voltak, mint a férfiaké. A vv GSH-Px aktivitás a reproduk

duktív korú nőkben jelentősen nagyobb, mint azonos korú férfiakban (1. ábra). Mindkét enzim aktivitása Se-függőnek bizonyult. A plazma Se-szintek és a plazma GSH-Px aktivitások (2. ábra), valamint a vv Se-szintek és a vv GSH-Px aktivitások (3. ábra) között significians, pozitív összefüggés látható.

3. TÁBLÁZAT
szelén ($M \pm SD \mu \text{ mol/L}$) egészséges európai felnőttekben

Ország	Módszer	N	Életkor	Serum, Plazma	Vér	Szerző	Dátum
Anglia	AAS	338	15-85	-	1,75 \pm 0,24	Fairris	1989
Ausztria	AAS	85	-	0,85 \pm 0,20	-	Tiran	1992
Belgium	AAS	48	22-65	-	1,47 \pm 0,20	v. Cauwenb.	1990
Bulgária	NAA	22	-	0,51 \pm 0,25	-	Iyengar	1987
Csehszlovákia	AAS	367	25-64	0,94	-	Koronová	1993
Cseh Köztárs.	NAA	196	36-49	0,86	-	Kvicala	1995
Dánia	AAS	58	20-65	0,98 \pm 0,19	-	Scherrenbeck	1993
Finnország	AAS	98	18-29	1,05 \pm 0,12	(1985)	Mäkelä	1993
"	"	35	"	1,58 \pm 0,10	(1991)	"	"
Görögország	FM	64	20-60	-	2,31 \pm 0,20	Bratakos	1990
Horvátország	AAS	23	22-37	0,87 \pm 0,22	-	Becker	1992
Hollandia	AAS	49	37-59	-	1,68 \pm 0,25	Vernie	1983
Lengyelország	FM	199	17-97	1,01 \pm 0,24	1,32 \pm 0,29	Wasovicz	1987
Magyarország	AAS	140	-	0,73 \pm 0,12	-	Gondi	1992
Magyarország	AAS	234	34 \pm 9,5	0,70 \pm 0,13	-	Bogye	1993
Németország	AAS	72	17-60	-	1,23 \pm 0,23	Oster	1988
"	"	280	-	0,93 \pm 0,16	-	"	1993
Olaszország	PIXE	82	-	0,82 \pm 0,17	-	Bellisola	1993
Svédország	AAS	59	20-69	-	1,87 \pm 0,25	Michäelsson	1989
Svédország	AAS	121	-	1,08	-	Hardell	1995
Törökország	FM	71	18-48	0,94 \pm 0,20	-	Hincal	1994
Jugoszlavia	AAS	875	20-50	0,63 \pm 0,23	-	Maksimovic	1992
Magyarország	AAS	147	16-60	0,73 \pm 0,15	0,94 \pm 0,14	Cser	(jelen közlemény időpontja) 1996

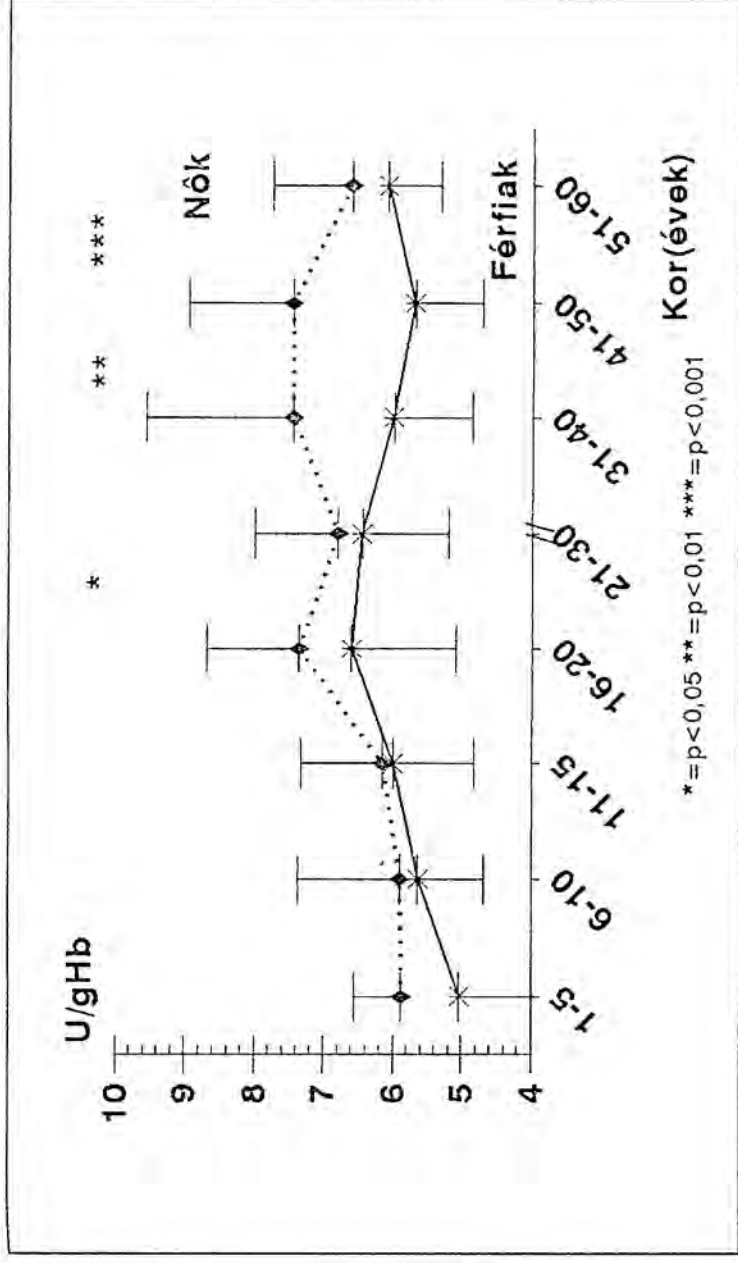
Megbeszélés

A Se-status megítélésére a szöveti Se-koncentrációk és a selenoenzimek aktivitási értékei igen jó indikátorok. A teljes vér és plazma vagy serum Se-szintek az étkezés-sel felvett Se mennyiségére engednek következtetni, melyek a földrajzi régiótól és a táplálék biológiai hasznosíthatóságától függően változnak.⁽⁵⁹⁾ Kína különböző Se-tartalmú területein 180-szoros különbségeket mértek a helyi lakosság vérében.⁽⁹⁸⁾

A vvs Se-tartalom hosszabb Se-ellátottságúktire, legalább 3-4 hónap alatt történő Se-bevitelre utal, mert a vvs élettartam 120 nap körüli, és a vvs Se legnagyobb része a GSH-Px-be épül be, mely kizárólag a szövetelőkben szintetizálódik. A plazma GSH-Px aktivitást a gyorsan változó plaz-

ma Se-tartalom befolyásolja pozitív vagy negatív irányba. A vvs GSH-Px aktivitásváltozás mélyrehatóan jelzi a Se-status milyenségét, és csak akkor mutat Se-függőséget, ha az egyén Se-felvétele kevés.

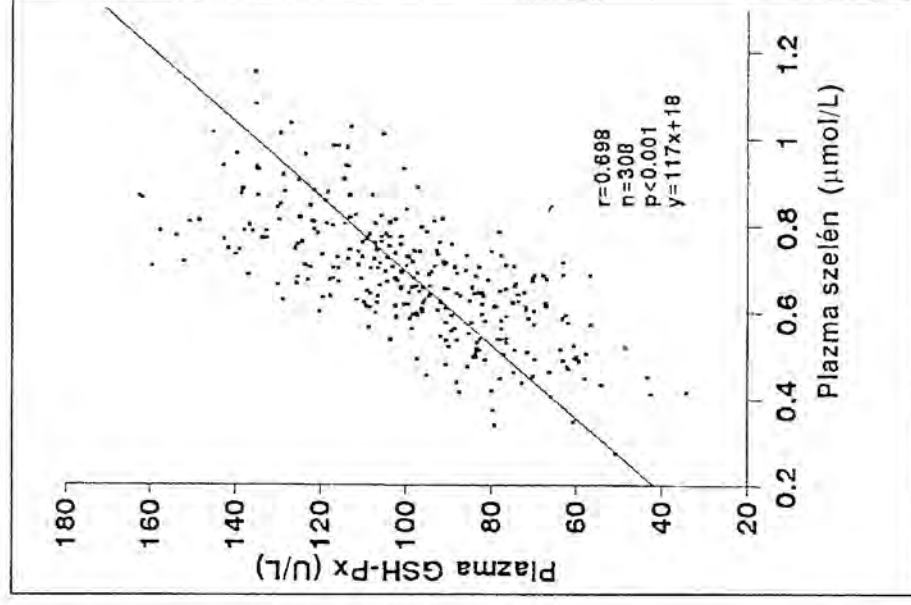
A teljes vér és plazma Se-arány 1,33 \pm 0,19 volt a magyar gyermekekben, hasonlóan osztrák 1,2-1,15,^(78, 79) lengyel 1,33-1,39⁽⁹²⁾ vagy német 1,25 \pm 0,20⁽²¹⁾ gyermekek értékeihez, míg a Se-ben gazdag Venezuelában⁽¹⁵⁾ 2 feletti az arány. Európa számos országában vagy egyik, vagy másik paraméter mérték egyedül, így további összehasonlításokat nem végezhetünk. A vér/plazma arány magyar felnőttekben 1,28 \pm 0,13, lengyelekben⁽⁹³⁾ 1,31-nek adódott szemben a német felnőttekben észlelt 1,6-os értékkel,⁽⁶¹⁾ egyéb európai adat nem áll rendelkezésre. A vörösvérsejtekben mért Se-koncentrációk minden



1. ábra

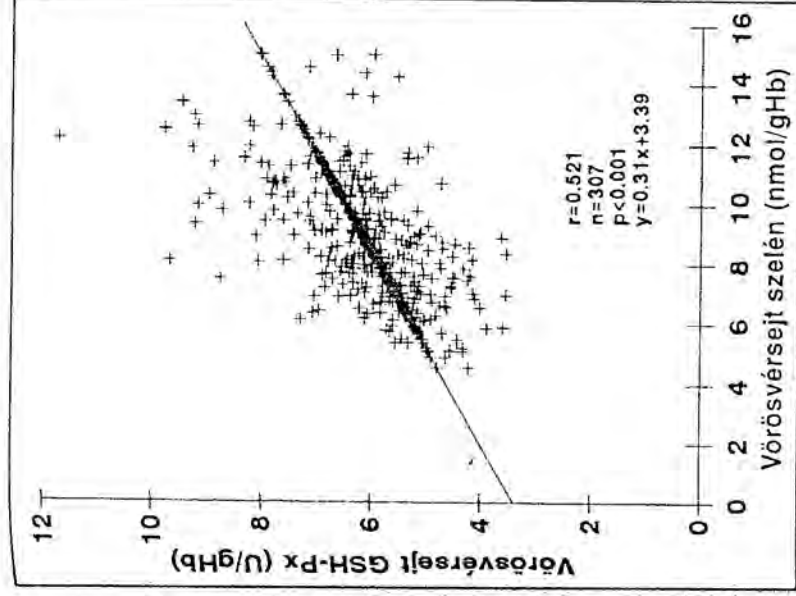
Vörösvérsejt GSH-Px. Kor és nemek szerinti megoszlásban

életkorban kisebbek a vártnál, abszolút értékben hasonlóak, mint más európai országokban mért vér Se-szintek. A sejt/plazma arány $1,74 \pm 0,35$ a magyar gyermekekben szemben az $1,94 \pm 0,26$ értékkel azonos korú német gyermekekben.⁽²¹⁾ A felnőtt populációban ezen arány a gyermekeknél is alacsonyabb, csupán $1,58 \pm 0,16$ -nak adódott. Az általunk, mindhárom földrajzi régióban élő gyermekek plazma Se-értékei a legkisebbek Európában, hasonlóan a Zágrábban,⁽⁵⁴⁾ Skopjében, Belgrádban, Splitben⁽⁶⁾ és Thessalonikiben élő gyermekekéhez.⁽⁸³⁾ A magyar felnőttek serum Se-értékei szintén a legkisebbek Európában. *Gondi, Bogyó és Szabó* adatai saját megfigyeléseinkkel megegyezően csökkent Se-értéket mutatnak, hasonlóan a Bulgáriában⁽³⁶⁾ és Közép-Szerbiában⁽⁴⁹⁾ élő felnőttekhez. A plazma és vér Se-tartalma a kisgyermekkortól a felnőttkorig fokozatos növekedést mutat, megegyezően a korábbi megfigyelésekkel.⁽⁴³⁾ A legtöbb szerző szerint, saját megfigyeléseinkhez hasonlóan az 5 évesnél fiatalabbakban és idős korban a legalacsonyabbak a vér és plazma Se-szintek.^(14, 87, 93, 96) A nemek



2. ábra

1-60 éves, egészséges populáció



3. ábra

1-60 éves, egészséges populáció

közötti Se-paraméter-különbségekről gyermek- és felnőttkorban is megoszloak a megfigyelések, a szerzők többsége nem talált eltérést. Vizsgálatainkban a fiúkat és férfiakat egy csoportnak tekintve, nagyobb vér és plazma Se-koncentrációkat mértünk a férfiakban, mint a másik nemből, megfigyelve más szerzők megfigyeléseivel.^(17, 62) A két GSH-Px enzim aktivitását nem hasonlíthatjuk más országokban mért eredményekhez, mert a mérési módszer még nincs standardizálva, referenciaanyagok sem léteznek. Korábbi vizsgálatainkban⁽²²⁾ azonos laboratóriumi módszerekkel a német gyermekekben mind a plazma, mint a vörösvérsejt GSH-Px aktivitása significánsan nagyobb volt, mind a magyar gyermekeké. Az enzimaktivitás életkortól függőségét plazmában né-

met,⁽⁶²⁾ a vörösvérsejtekben francia⁽¹⁸⁾ populációban írták le, megfigyeléseinkhez hasonlóan. A vörösvérsejt GSH-Px aktivitás Se-függőségét alacsony Se-státusú, phenylketonuriás gyermekekben⁽⁴⁴⁾ és kevés Se-bevitelt mutató, új-zélandi felnőttekben⁽⁷⁷⁾ figyelték meg.

A magyar populációban hasonló összefüggést észleltünk nemcsak a sejt, de a plazma Se és GSH-Px között is. Ez utóbbiak alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a Se-ellátottság országunkban igen kedvezőtlen.

Hazánkban a mezőgazdasági növények Se-tartalmát nem ismerjük, talaj Se-pótlás nem történik, pedig bizonyított, hogy igen kevés a talaj Se-tartalma.⁽³¹⁾ Ugyanakkor évtizedek óta szelénpótlást alkalmaznak⁽⁴⁸⁾ a hazai állatállomány takarmányozásakor, a haszonállatok egyértelműen Se-hiányos megbetegedéseinek megelőzése céljából. A humántáplálkozás csak részben húseredetű és ennek Se-koncentrációját sem ismerjük.

A fentiek alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy Magyarországon a Se-kínálat az optimálisnál kevesebb. Ezzel magyarázható a lakosság rossz Se-ellátottsága, és ez biztosan rizikófaktort jelent a cardiovascularis mortalitásban. Munkánkkal fel kívánjuk hívni a figyelmet arra, hogy szükséges az alapvető ételmiszereink Se-tartalmát vizsgálni. Lépéseket kell tenni a lakosság Se-státusának javítására az optimálist jobban megközelítő Se-kínálattal.

Köszönetnyilvánítás

Munkánk az OTKA kutatási alap támogatásával (T 017146) készült. A mintagyűjtésben nyújtott segítségért köszönetünket fejezzük ki *dr. Szabó Tibornak* (Tatabánya, Tapolca) és *Godóné Boros O. Juditnak* (Kiskőrös).

Selenium and Glutathione Peroxidases in Healthy Hungarian Children and Adults.

Cser Á., Sziklai-László I., Menzel H., Lombeck I.
(Bethesda Children's Hospital Budapest, Inst. of Toxicology and Dept. of Pediatrics Univ. Med. School of Düsseldorf)

SUMMARY

Selenium concentrations (by AAS HG) in plasma, blood, erythrocytes and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in plasma and erythrocytes were measured in 308 healthy Hungarians aged 1–60 years. Both in children and adults plasma Se (0.63 ± 0.12 versus

0.73 ± 0.10 $\mu\text{mol/L}$) and blood Se (0.81 ± 0.14 versus 0.92 ± 0.15 $\mu\text{mol/L}$) values were the lowest observed in Europe. From infancy to adulthood Se levels increased with age, reached maximums in the third decade of life. Plasma GSH-Px activity increased with age, values were higher in adults ($110 \pm 22\text{U/L}$) versus children ($87 \pm 19\text{U/L}$). Women in reproductive age showed higher GSH-Px activities in the erythrocytes compared to men. Both GSH-Px activities depended on Se concentrations indicating a low Se supply in Hungary resulting in low selenium status in Hungarians population.

Key words

selenium, glutathione peroxidase, child, adult

IRODALOM

1. *Alfthan, G., Bogyó, G., Áro, A., Fehér, J.*: The human selenium status in Hungary. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 6, 233–238, 1992.
2. *Anonymous*: Selenium in the heart of China. *Lancet*, II, 889–890, 1979.
3. *Anonymous*: Effects of vitamin E and selenium on the toxicity of paraquat. *Nutr. Rev.* 42, 260–262, 1984.
4. *Awashi, Y. C., Beutler, E., Sritrastava, S. K.*: Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 250, 5141–5149, 1975.
5. *Baján, E., Vargáné Hajdu, P., Beliczka, É.*: Az elkerülhető halálozás. *Népegészségügy.* 72, 193–199, 1991.
6. *Becker, D., Romić, Z., Krsijatić, H., Zima, Z.*: A contribution to the world selenium map. *Biol. Trace Elem. Res.* 33, 43–49, 1992.
7. *Bebrne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., Köhrle, J.*: Identification of type I, iodothyronine 5 deiodinase as a seleno-enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173, 1143–1149, 1990.
8. *Bebrne, D., Weiss-Vorak, C., Kalklössch, M., Westphal, C., Gessner, H., Kyriakopoulos, A.*: Application of nuclear analytical methods in the investigation and identification of new selenoproteins. *Biol. Trace Elem. Res.* 48, 287–297, 1994.
9. *Bellisola, G., Perona, G., Galassini, S., Morschini, G., Guidi, G. C.*: Plasma selenium and glutathione peroxidase activities in individuals living in the Veneto region of Italy. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 242–244, 1993.
10. *Berzelius, I. J.*: Sur deux métaux nouveaux (lithium et sélénium). *Schweigger J.* 21, 1818–1823, 1817.
11. *Björre, B., von Schenk, H., Sorbo, B.*: Hyposelenemia: patients with gastrointestinal diseases are at risk. *J. Int. Med.* 225, 85–88, 1989.
12. *Bogyó, G., Fehér, J., Alfthan, G., Antti, A.*: Egészséges emberek szelénstatusának komplex vizsgálata. *Orv. Hetil.* 47, 2585–2588, 1993.
13. *Bogyó, G., Fehér, J., Alfthan, G., Antti, A.*: A szelénhiány és a magas szív- és érrendszeri mortalitás és morbiditás kapcsolata. *Orv. Hetil.* 135, 115–118, 1994.
14. *Bratakos, M. S., Karaki, H. G., Wäslou-Wäite, A., Jonnait, P. V.*: The nutritional selenium status of healthy Greeks. *Sci. Total Envir.* 91, 161–176, 1990.
15. *Brätter, P., Negretti de Brätter, W. E., Jaffe, W. G., Mendez Castellano, H.*: Selenium status of children living in seleniferous areas of Venezuela. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5, 269–270, 1991.
16. *Broderick, S. J., Deagen, J. T., Whanger, P. D.*: Properties of glutathione peroxidase isolated from human plasma. *J. Inorg. Biochem.* 30, 299–308, 1987.
17. *Chakar, A., Mokni, R., Chappuis, P., Mabui, J.-L., Walravens, P. A., Bleiberg-Daniel, F., Therond, P., Navarro, J., Lemmonier, D.*: Selenium status of healthy immigrant Parisian preschool children. *Biol. Trace Elem. Res.* 36, 25–33, 1993.
18. *Ceballos-Pical, I., Tritsar, J. M., Nicol, A., Siret, P. M., Therenin, M.*: Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 38, 66–70, 1992.
19. *Chen, X., Yang, G., Chen, J., Chen, X., Wen, Z., Ge, K.*: Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 2, 91–107, 1980.

20. Combs, G. F., Peterson, F. J.: Protection against acute paraquat toxicity by dietary selenium in the chick. *J. Nutr.* 113, 538-545, 1983.
21. Cser, A.: Kózlás alatt álló adatok.
22. Cser, A., Sziklai-László, I., Menzel, H., Lombeck, I.: Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 205-210, 1993.
23. Cser, A., Sziklai-László, I., Menzel, H., Lombeck, I.: Selenium and glutathione peroxidases in Hungarian children. *J. Trace Elem. Med. Biol. közlés alatt*, 1996.
24. Fairris, G. M., Perkins, P. J., Lloyd, B., Hinks, L., Clayton, B. E.: The effect of atopic dermatitis of supplementation with selenium and vitamin A. *Acta Derm. Venereol.* 9, 359-362, 1989.
25. Flobé, L., Günzler, W. A., Schock, H. H.: Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134, 1973.
26. Flóé, L., Günzler, W. A.: Assay of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* Vol. 105. (Packer L. ed.) Academic Press Inc. London, 114-121, 1984.
27. Forström, J. W., Zabrowsky, J. J., Tappel, A. L.: Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 17, 2639-2644, 1978.
28. Ganlber, H. E.: Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, 7, 2898-2905, 1968.
29. Ge, K., Yang, G.: The epidemiology of selenium deficiency in the ethiological study of endemic diseases in China. *Am. J. Nutr. Suppl.* 57, 259S-263S, 1993.
30. Gebre-Mehdin, M., Eivald, U., Platin, L. O., Tönne, T.: Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Paediatr. Scand.* 73, 109-114, 1984.
31. Gondí, F., Pantó Gy., Fehér, J., Bogye, G., Alföu, G.: Selenium in Hungary. The rock-soil-human system. *Biol. Trace Elem. Res.* 35, 299-306, 1992.
32. Hardell, L., Degerman, A., Tomic, R., Marklund, S. L., Bergfors, M.: Levels of selenium in plasma and glutathione peroxidase in erythrocytes in patients with prostatic cancer or benign hyperplasia. *Eur. J. Cancer Prev.* 4, 91-95, 1995.
33. Heinzow, B., Jessen, H., Mohr, S., Riemer, D.: In: *Selenium in Biology and Medicine* (Wendel A. ed.) Springer-Verlag Berlin, pp. 246.
34. Hincal, F., Yetgin, S., Atacert, N.: Selenium status in Turkey I. Selenium levels in infants and children in Ankara. *Biol. Trace Elem. Res.* 20, 161-167, 1989.
35. Hincal, F., Basaran, N., Yetgin, S., Gokman, O.: Selenium status in Turkey II. Serum selenium concentration in healthy residents of different ages in Ankara. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 9-12, 1994.
36. Jyengar, G. V.: Reference values for the concentrations of As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, I, Hg, Mn, Ni, Pb, Se and Zn in selected human tissues and body fluids. *Biol. Trace Elem. Res.* 12, 263-295.
37. Kieri, C. L., Gantner, H. E.: Manifestation of chronic selenium deficiency in a child receiving total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 319-328, 1983.
38. Kiremidjian-Schumacher, L., Stoczky, G.: Selenium and immune responses. *Environ Res.* 42, 277-303, 1987.
39. Koronová, V., Skodová, Z., Dedina, J., Valenta, Z., Parizek, J., Písa, Z., Syblá, M.: Serum selenium in adult Czechoslovak (Central Bohemia) population. *Biol. Trace Elem. Res.* 37, 91-99, 1993.
40. Křicáka, J., Zamrazil, V., Soulorová, M., Tomiška, F.: Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst* 120, 959-965, 1995.
41. Lockitch, G., Taylor, G. P., Wong, L. T., Davidson, A. G., Diso, P. J., Riddell, D., Messing, B.: Cardiomyopathy associated with nonendemic selenium deficiency in a caucasian adolescent. *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 572-577, 1990.
42. Lloyd, B., Robson, E., Smith, I., Clayton, B. E.: Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activity. *Arch. Dis Child.* 64, 352-356, 1989.
43. Lombeck, I., Kasparek, K., Hrbisch, H. B., Feinendegen, L. E., Bremer, H. J.: The selenium state of healthy children I. Serum selenium concentration at different ages; Activity of glutathione peroxidase of erythrocytes at different ages; Selenium content of food of infants. *Eur. J. Pediatr.* 125, 81-88, 1977.
44. Lombeck, I., Kasparek, K., Bachmann, D., Feinendegen, L. E., Bremer, H. J.: Selenium requirements in patients with inborn errors of amino acid metabolism and selenium deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 134, 65-68, 1980.
45. Lombeck, I., Papadaki-Papadimitrou, O., Kaniri, F., Laryea, M. D., Yang, Y. F., Leitzmann, P.: A screening method for the evaluation of selenium status. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3, 175-179, 1989.
46. Lou, S. C., Harney, J. W., Berry, M. J.: Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 270, 21659-21664, 1995.
47. Maddipati, K. R., Marietti, L. J.: Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J. Biol. Chem.* 262, 17398-17403, 1987.
48. Magyar Takarmánykódex. Fm. és MMI, ed *Barócsai György*, I. köt. 1990.
49. Maksimovic, Z. J., Djujic, I., Joric, V., Rsumovic, M.: Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biol. Trace Elem. Res.* 33, 187-196, 1992.
50. Marano, G., Spagnolo, A., Morisi, G., Menotti, A.: Changes of serum selenium and serum cholesterol in children during sexual maturation. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5, 59-61, 1991.
51. Mäkelä, A. L., Nantö, V., Mäkelä, P., Wang, W.: The effect of nationwide selenium enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in South Western Finland. *Biol. Trace Elem. Res.* 36, 151-157, 1993.
52. Messing, B., Man, F., Therond, P., Hanb, F., Thuiller, F., Rambaud, J. C.: Selenium status prior to and during one month total parenteral nutrition in gastroenterological patients: a randomised study

- of two dosages of Se supplementation. *Clin. Nutr.* 9, 282-288, 1990.
53. *Michaëlbson, G., Berne, G., Carlmark, B., Skand, A.*: Selenium in whole blood and plasma is decreased in patients with moderate and severe psoriasis. *Acta Derm. Venerol.* 69, 29-34, 1989.
 54. *Mikac-Devic, M., Ferenec, D., Tiefenbach, A.*: Selenium levels in untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 4, 7-10, 1990.
 55. *Mills, G. C.*: Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197, 1957.
 56. *Moore, J. A., Noira, R., Wells, T. C.*: Selenium concentrations in plasma of patients with arteriographically defined coronary arteriosclerosis. *Clin. Chem.* 30, 1171-1173, 1984.
 57. *Morisi, G., Patrizarca, M., Marano, G., Gianpaoli, S., Taggi, F.*: Age and sex specific reference serum selenium levels estimated for the Italian population. *Ann. Istr. Sup. Sanità* 25, 393-404, 1989.
 58. *Moxon, A. L., Olson, O. E.*: in Zingaro, R. A., Cooper W. C. (eds.) Selenium pp. 675-707, Van Nostrand Reinhold, New York, 1974.
 59. *Néze, J., Verlangen, F., Mollé, L.*: Selenium deficiency. *Clin. Endocrinol. Metab.* 14, 629-656, 1985.
 60. *Oldfield, J. E.*: The two faces of selenium. *J. Nutr.* 117, 2002-2008, 1987.
 61. *Oster, O., Schredel, G., Predlitz, W.*: Correlations of blood selenium with hematological parameters in West German adults. *Biol. Trace Elem. Res.* 15, 47-81, 1988.
 62. *Oster, O.*: Zum Selenstatus in der Bundesrepublik Deutschland. Univ. Verlag Jena, Nümetorszög, 1992.
 63. *Reeves, W. C., Marcuard, S. P., Wills, S. E., Mavahed, A.*: Reversible cardiomyopathy due to selenium deficiency. *J. Parenteral And Enteral Nutrition.* 13, 663-665, 1989.
 64. *Rosenfeld, I., Beal, O. A.*: Geobotany, Biochemistry, Toxicity, and Nutrition. Academic Press, New York, London 1964.
 65. *Rotruck, J. T., Pope, A. L., Gentler, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G.*: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179, 588-590, 1973.
 66. *Salonen J. T., Alfthan G., Huttunen K. J., Pikkariainen J., Puska P.*: Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* I, 175-179, 1982.
 67. *Salonen J. T., Salonen R., Seppänen K., Kantola M., Parvainen M., Alfthan G., Maenpää P. H., Taskiran E., Rautava R.*: Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischaemic heart disease in Eastern Finnish men. *Atherosclerosis* 70, 155-160, 1988.
 68. *Scherrebeck L., Andersen O.*: Se-status in Denmark - A review based on previous studies. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, pp 107, 1993.
 69. *Schamberger R. J.*: Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 44, 931-936, 1970.
 70. *Schwarz K., Foltz C. M.*: Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3292-3293, 1957.
 71. *Schwarz K.*: Development and status of experimental work on Factor 3-selenium. *Fed. Proc.* 20, 666-673, 1961.
 72. *Spagnolo A., Morisi G., Marano G., Rigbetti G., Marietta A., Menotti A.*: Serum selenium and precursors of cardiovascular risk factors in adolescents. *Eur. J. Epidemiol.* 7, 654-657, 1991.
 73. *Szabó G., Bálint Sz., Nyeste E., Medgyesi T., Tamaskovics A., Podmaniczky G.*: Egészséges emberek hiányos nyomelem ellátottsága a szérumban és plazma mütelelemes analízise alapján. *Orv. Hetil.* 132, 395-400, 1991.
 74. *Takabashi K. T., Atissar N., Whittin J., Cohen H.*: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686, 1987.
 75. *Thomas A. G., Miller W., Shenkin A., Fell G. S., Taylor F.*: Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal diseases. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19, 213-219, 1994.
 76. *Thomson C. D., Rea H. M., Doebing V., Robinson M. F.*: Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New-Zealand residents. *Br. J. Nutr.* 37, 457-460, 1977.
 77. *Thomson C. D., Robinson M. F., Campbell D. R., Rea H. M.*: Effect of prolonged supplementation with daily supplements of selenomethionine and sodium selenite on glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand residents. *Am. J. Nutr.* 36, 24-31, 1982.
 78. *Tiran B., Tiran A., Petek W., Rossipal E., Wäuschlinck O.*: Selenium status of healthy children and adults in Syria (Austria). *J. Trace Elem. Med.* 9, 75-79, 1992.
 79. *Tiran B., Tiran A., Rossipal E., Lorenz O.*: Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood, serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 211-216, 1993.
 80. The Research Group on Environmental and Endemic Disease, Institut of Geography. The geographical distribution of hair selenium content in Keshan disease and Kaschin-Beck disease endemic and nonendemic areas. *Acta Geograph. Sin.* 37, part 2, 1982.
 81. *Ursini F., Maiorino M., Valente M., Ferri L., Gregolin C.*: Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-291, 1982.
 82. *van Caillie-Bertrand M., Degenhart H. J., Fernandes J.*: Influence of age on selenium status in Belgium and the Netherlands. *Pediatr. Res.* 20, 574-576, 1986.

83. *van Cauwenbergh R., Robbrecht H., Deelstra H.*: Serum selenium levels in Greek B-thalassemia patients. *Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 12, 20-25, 1990.
84. *van Cauwenbergh R., Robbrecht H., Deelstra H.*: Selenium concentration leveles in whole blood of Belgian blood bank donors, as determined by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 4, 215-224, 1990.
85. *van Dael P., Deschuytere A., Robbrecht H., van Caillie-Bernard M., Lemaire M., Deelstra H.*: Captopril whole blood selenium determination in assessing selenium status of children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 225-228, 1994.
86. *van Rij A.M., Thomson C.D., McKenzie J.M., Robinson M.F.*: Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 2076-2085, 1979.
87. *Verlinden M., van Sprundel M., van der Auwera J.C., Eysenbosch J.*: The selenium status of Belgian population groups. II. Newborns, children and the aged. *Biol. Trace Elem. Res.* 5, 103, 113, 1983.
88. *Vernie L.N., De Vries M., Benckhuijsen C., De Goey J.J.M., Zegers C.*: Selenium levels in blood and plasma, and glutathione peroxidase activity in blood of breast cancer patients during adjuvant treatment with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil. *Cancer Lett.* 18, 283-289, 1983.
89. *Vinton N.E., Dahlstrom K.A., Strobel C.T., Amen M.E.*: Macrocytosis and pseudoalbumin: Manifestations of selenium deficiency. *J. Pediatr.* 111, 711-717, 1987.
90. *Virtamo J., Valkela E., Alfthan G., Puskar S., Hutunen J.K., Karvonen M.J.*: Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am. J. Epidemiol.* 122, 276-282, 1985.
91. *Wang W.G., Naito Y., Makiela A.L., Makiela P.*: Effect of nationwide selenium supplementation in Finland on selenium status in children with juvenile rheumatoid arthritis. A ten-year follow up study. *Analyst* 120, 955-958, 1995.
92. *Wasowicz W., Gromadzinska J., Sklodowska M., Popadiuk St.*: Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of children with cancer. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 53-57, 1994.
93. *Wasowicz W., Zachara B.A.*: Selenium concentrations in the blood and urine of a healthy Polish sub-population. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25, 409-412, 1987.
94. *Wendel A., Kerner B., Graupe K., in: Functions of glutathione in liver and kidney.* Sies H. és Wendel A eds., 107-113. Springer Verlag, Berlin 1978.
95. *Wendel A.*: Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* Vol. 77. (Jacoby W.B.ed.) Academic Press Inc. London, 325-333, 1981.
96. *Westermark T., Rauni P., Kirjarinta M., Lappalainen L.*: Selenium content of whole blood and serum in adults and children of different ages from different parts of Finland. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 40, 465-475, 1977.
97. *Whanger P.D., Xia Y., Thomson C.D.*: Protein techniques for selenium speciation in human body fluids. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 1-7, 1994.
98. *Yang G., Ge K., Chen J., Chen X.*: Selenium related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. *World Rev. Nutr. Diet* 55, 98-152, 1988.

„Olyan ország még nem volt, amely azért ment volna tönkre,
mert kulturális célokra áldozott.”

*

„A jogállamtól el kell jutni a jóléti állam eszményéhez.”

*

„Háromféle magyar bazafiság van: a szónokló, a kesergő és az alkotó
bazaszeretet.”

(Dr. gróf Klebelsberg Kunó)

re

Trace Elements

Formerly "Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease"

Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)

Editorial Board

J. D. Kruse-Jarres, Stuttgart, Chairman

P. Brätter, Berlin	A. M. Reichlmayr-Lais, München
E. R. Chavez, Quebec	E. Sabbioni, Ispra
R. Cornelis, Ghent	J. T. Salonen, Kuopio
L. M. Klevay, Grand Forks	F. W. Sunderman Jr., Farmington
I. Lombeck, Düsseldorf	K. T. Suzuki, Chiba
L. R. McDowell, Gainesville	Y. Thomassen, Oslo
G. F. Nordberg, Umeå	C. J. A. Van den Hamer, Delft

Managing Editor

V. Negretti de Brätter, Berlin

J. Trace Elem. Med. Biol.,

Vol. 10, No. 3, pp. 133 – 204, September 1996

Indexed in Current Contents (Life Sciences)

ISSN 0946-672X

 GUSTAV STUTTGART
JENA
FISCHER NEW YORK

Selenium and Glutathione Peroxidase Activity in Hungarian Children

M. ÁCSER¹, I. SZIKLAI-LÁSZLÓ*, H. MENZEL** and I. LOMBECK***

¹Bethesda Children's Hospital, Bethesda Street 3, H-1146 Budapest, Hungary

*KFKI Atomic Energy Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

**Institute of Toxicology, University of Düsseldorf, Fed.Rep.of Germany

***Children's Hospital, University of Düsseldorf, Fed.Rep. of Germany

(Received January/May 1996)

Summary

Selenium (Se) in plasma, whole blood and erythrocytes as well as glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in plasma and erythrocytes were investigated in 161 healthy Hungarian children aged 1-15 years. Se was determined by AAS with hydride generation. The estimation of GSH-Px activity was performed in plasma with tert-butyl-hydroperoxide (t-BOOH) and in erythrocytes with hydrogen peroxide (H₂O₂) as acceptor substrates. The Se content in plasma ($0.63 \pm 0.12 \mu\text{mol/L}$), whole blood ($0.81 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$) and erythrocytes ($1.14 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$), the GSH-Px activity in plasma ($87 \pm 19 \text{ U/L}$) and erythrocytes ($5.93 \pm 1.04 \text{ U/gHb}$) was low in Hungarian children in comparison to values for children from other European countries. Samples from a rural area in southeast Hungary showed even lower Se content than samples from an industrial city in the northwest or from the capital. The Se in plasma and whole blood as well as GSH-Px activity in the plasma exhibited a clear age dependency. There was a good correlation between plasma Se and GSH-Px activity in all children ($r=0.633$, $p<0.001$). In addition, in children from the northwestern city and from the capital a correlation was found between Se content and GSH-Px activity of erythrocytes ($r=0.625$, $p<0.001$). There is no indication that the high mortality in young Hungarian adults from cardiovascular diseases is mainly caused by a low Se supply because there are no corresponding findings in the surrounding countries of southeastern or central eastern Europe with similar low Se states.

Keywords: Selenium, plasma glutathione peroxidase, erythrocyte glutathione peroxidase, Hungary, child

Introduction

There are only a few diseases described in humans where selenium deficiency causes definite clinical symptoms. These are the endemic Keshan (1,2) or Kaschin-Beck disease and myopathies of the heart and skeletal muscles (3,4) occurring in certain areas of China. Similar symptoms appear sporadically in patients on total parenteral nutrition (5). A low selenium-dependent glu-

tathione peroxidase enzyme activity is related to several other conditions such as cardiovascular diseases (6), myocardial infarction (7), atherosclerosis (8) and malignancies (9). The reason for the high mortality in young and middle-aged Hungarian adults caused mainly by coronary vascular diseases (10) is not yet fully understood. This could be the result of nutritional imbalances including a low selenium supply. Selenium status depends mainly on selenium intake (11), which is determined by the Se content in the diet. The Se content in the nutritional chain is based on the selenium content of the soil. Nearly

¹To whom the correspondence should be addressed.

90% of rock samples collected from different geographical regions of Hungary had less than 0.1 mg/kg Se content. The Hungarian soil has been proven to be low in Se, with concentrations being between 0.100 and 0.420 mg Se/kg soil (12). Young Hungarian adults have been reported to have low Se in serum (12,13,14) or in plasma (15); children have low Se in their fingernails or toenails (14).

The present study of three geographic regions in Hungary is the first in which both Se in plasma, blood and erythrocytes and glutathione peroxidase enzyme activity in plasma and erythrocytes in a large group of children aged one to fifteen years were investigated.

Material and Methods

The children were in good health, their heights and weights were between the 25th and 75th percentiles. They originated from three different geographic areas. Kiskőrös is a small, agricultural town in the eastern part of the country. Tatahánya is a city with heavy industry in the northwest of Hungary and Budapest is the capital with 2 million inhabitants. The children consisted of three age groups, 1-5(I), 6-10(II) and 11-15(III) years. 4 ml of EDTA blood was taken in a fasting state between 8-9 am during an annual examination or prior to minor surgery. Informed consent was obtained from the parents. Protocols were approved by the University Committee on Research. Within two hours of taking the samples plasma was separated and erythrocytes were washed three times with isotonic saline. Aliquots were collected and kept at -80 °C, transported on dry ice to Düsseldorf and kept again at -80 °C until analysis. Selenium was measured in whole blood and plasma by atomic absorption spectrometry with hydride generation (16). The accuracy of measurements was established by using two reference materials. Bovine liver (NBS 1577a US Department of

commerce, Gaithersburgh) was found to have 708 ± 14 ng Se/g (n=32); the recommended value was 710 ± 70 ng Se/g. Human reference blood (Seronom TM Trace Elements Nycomed, Oslo, Norway) resulted in 90.8 ± 1.7 µg Se/L (n=42); the recommended value was 90 µg Se/L. In each assay there were pooled plasma and blood samples measured for precision. The coefficients of variance were 3.3% within-day and 4.8% between test days. Erythrocyte selenium was calculated from the individual packed cell volumes, plasma and whole blood Se of each child. Glutathione peroxidase (E.C.1.1.1.9.) activity was measured in plasma according to Flohé and Günzler (17) and in erythrocytes by the method of Wendel (18). For internal quality control two different plasma and erythrocyte pools were used. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.5% (n=28) and 5.3% (n=76) for plasma, 3.6% (n=34) and 5.9% (n=96) for erythrocyte GSH-Px activity, respectively.

Statistical analysis was performed by the paired and unpaired Student's t-test and the Wilcoxon test; correlations were computed using linear regression analysis by the least square method.

Results

Values of selenium (Se) in the investigated blood compartments, as well as of glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in erythrocytes and plasma, are reported for children of different ages (Table 1). All Se parameters were normally distributed in the whole cohort (n=161). Haematological indices were normal in all groups and increased with corresponding age.

Hungarian boys tended to have higher Se levels than girls in each blood compartment but these differences did not reach significance at the $p < 0.05$ level. Plasma GSH-Px activities were similar in both sexes (males n=92, females n=69, $Z=0.33$, NS). Girls in all age groups investi-

Table 1. Selenium and glutathione peroxidase values (mean±SD) of 161 children from different Hungarian regions.

Age (years)	1-5	6-10	11-15	Total
Number	42	59	60	161
Plasma Se (µmol/L)	0.55 ± 0.11	0.66 ± 0.10	0.65 ± 0.09	0.63 ± 0.12
Blood Se (µmol/L)	0.74 ± 0.13	0.83 ± 0.13	0.82 ± 0.11	0.81 ± 0.14
Erythrocyte Se (nmol/L)	1.06 ± 0.21	1.16 ± 0.19	1.12 ± 0.18	1.14 ± 0.26
Erythrocyte Se (µg/gHb)	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.11	0.19 ± 0.12
Pl GSH-Px (U/L)	79 ± 21	88 ± 20	92 ± 18	87 ± 19
Er GSH-Px (U/gHb)	5.44 ± 0.90	5.84 ± 0.99	6.12 ± 0.97	5.93 ± 1.04

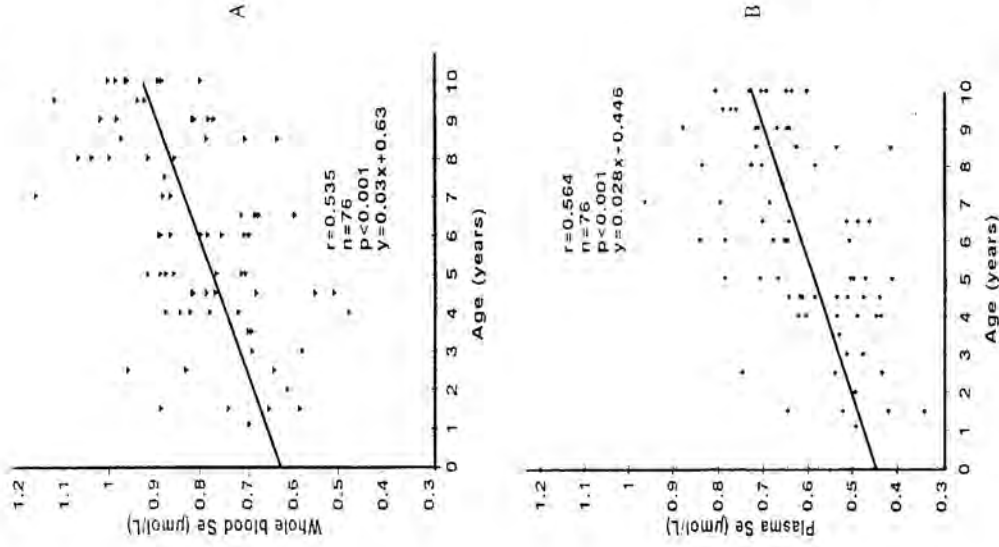


Figure 1. Children from Tatabánya and Budapest

gated had higher erythrocyte enzyme activities than boys ($Z=2.46$, $p<0.05$). Children under the age of five years ($n=42$) had significantly lower whole blood Se ($p<0.001$) and plasma Se ($p<0.001$) levels compared to those over six years ($n=119$). Erythrocyte Se ($\mu\text{mol/L}$) tended to increase with age but not if values were calculated per 1 g haemoglobin. Plasma and erythrocyte GSH-Px increased with age, with the youngest children having significantly lower enzyme activities as compared to children aged 6-15 years ($Z=2.59$, $p<0.01$; $Z=3.33$, $p<0.001$). In each group the concentration of Se in erythrocytes was an average of 40 per cent higher than Se in blood. Plasma Se was on the average 30 per cent lower than whole blood levels (Table 1 and 2).

The children of the small town Kiskörös aged 6 to 15 years had (Table 2) significantly lower Se values compared to the corresponding age groups of children in Tatabánya (heavy industry) and in the capital Budapest. In boys and girls from Tatabánya and Budapest, up to an age of ten years, there was a significant positive correlation between age and the Se content in whole blood (Figure 1.A.) and in plasma (Figure 1.B.), whereas the levels of

Table 3. Glutathione peroxidase activities (mean \pm SD) in plasma and erythrocytes of healthy Hungarian children

	Kiskörös			Tatabánya			Budapest			
	Group	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Plasma	I	73 \pm 22	87 \pm 10	75 \pm 24						
GSH-Px (U/L)	II	75** \pm 19	95 \pm 17	87 \pm 22						
	III	84* \pm 14	96 \pm 20	94 \pm 16						
Ery GSH-Px (U/g Hb)	I	5.89 \pm 0.87	5.25 \pm 0.99	5.48 \pm 0.65						
	II	6.84** \pm 1.41	5.77 \pm 0.92	5.75 \pm 0.52						
	III	6.39 \pm 0.81	5.99 \pm 1.09	6.18 \pm 0.67						

Group I=1-5; II=6-10; III=11-15 years of age. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus Tatabánya and Budapest within parameters and of the same age

the Kiskörös children did not show an age dependency (partly explainable, perhaps, by the low number of observations of young children from this area).

Under the age of five years plasma GSH-Px activities were similar, independent of the region (Table 3). Between the ages of 6 and 15 children from Kiskörös had lower plasma enzyme activities than children from the other regions. In all children there was a positive, significant correlation between the plasma enzyme activity and Se content (Figure 2.B). The erythrocyte GSH-Px activities in children of all regions were nearly identical under the age of five years. Between the ages of 6 and 15 those children of Kiskörös who had the lowest blood and eryth-

Table 2. Selenium levels (mean \pm SD) of healthy children from three regions in Hungary

	Kiskörös			Tatabánya			Budapest			
	Group	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Number	I	8	22	12						
	II	17	29	13						
	III	13	32	15						
Age (Years)	I	4.4 \pm 0.8	3.5 \pm 1.3	4.0 \pm 1.1						
	II	8.2 \pm 1.3	8.2 \pm 1.5	7.5 \pm 1.4						
	III	12.3 \pm 1.1	12.6 \pm 1.6	12.7 \pm 1.5						
Plasma ($\mu\text{mol/L}$)	I	0.56 \pm 0.12	0.56 \pm 0.11	0.53 \pm 0.08						
	II	0.62* \pm 0.08	0.69 \pm 0.11	0.67 \pm 0.08						
	III	0.58*** \pm 0.07	0.68 \pm 0.11	0.68 \pm 0.10						
Blood ($\mu\text{mol/L}$)	I	0.74 \pm 0.12	0.73 \pm 0.13	0.75 \pm 0.09						
	II	0.78* \pm 0.12	0.87 \pm 0.13	0.86 \pm 0.14						
	III	0.70*** \pm 0.10	0.87 \pm 0.12	0.88 \pm 0.10						
Red bl. cells ($\mu\text{mol/L}$)	I	1.05 \pm 0.22	1.08 \pm 0.30	1.06 \pm 0.12						
	II	1.04* \pm 0.22	1.20 \pm 0.29	1.24 \pm 0.28						
	III	0.87*** \pm 0.18	1.24 \pm 0.20	1.23 \pm 0.20						

Group I=1-5; II=6-10; III=11-15 years of age. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus Tatabánya and Budapest within parameters of the same age

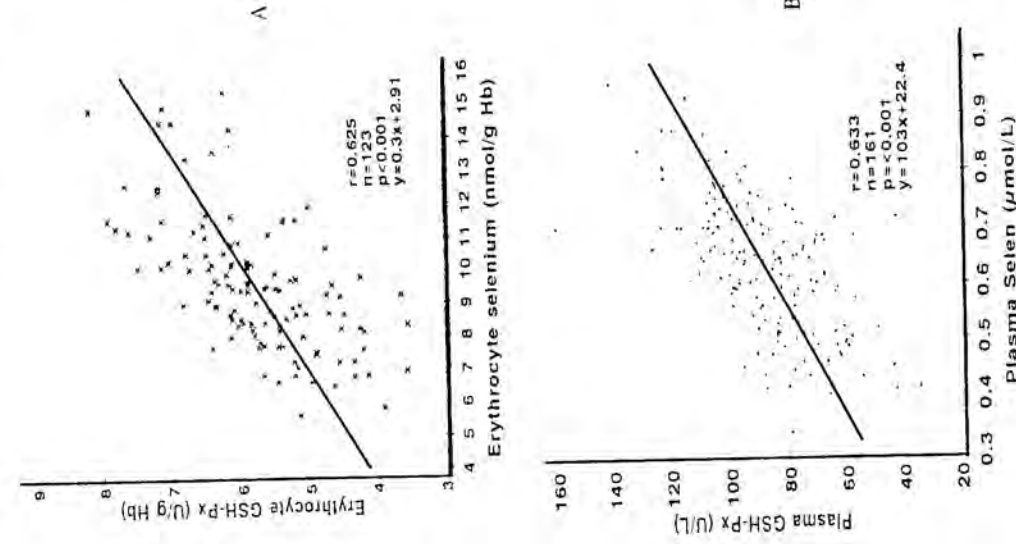


Figure 2. 1-15 years old girls and boys from Tatabánya and Budapest (A). 1-15 years old girls and boys from all 3 regions (B).

rocyte Se content also had the highest erythrocyte enzyme activities, independent of age and sex, higher than children of Tatabánya ($Z=3.23$, $p<0.01$) or of Budapest ($Z=2.55$, $p<0.05$) (Table 3). There was a significant positive correlation between these two parameters in children of the latter two cities (Figure 2.A).

Discussion

For assessing Se status the tissue concentrations of Se and the activities of the selenoenzymes are good indicators. Whole blood Se reflects the Se supply over a longer period because of the longer lifetime of erythrocytes. In German adults Oster et al. (43) found for men and women 1.44 ($SD\pm 0.36$), men 1.56 ($SD\pm 0.33$), women 1.37 ($SD\pm 0.33$) times higher Se content in whole blood than in plasma (43). The current study shows that in Hungarian children irrespective of the geographic region or of age this ratio was much lower. The ratio of 1.33 ± 0.19 was as low as that in Austrian 1.2 - 1.15 (19,20), Polish: 1.39 - 1.33

(39) or German children: 1.25 ± 0.20 (44). In children of European countries with a higher Se supply, the element was not measured in red blood cells and plasma at the same time, so that data are lacking for comparison (Table 4). However, in seleniferous areas of Venezuela the ratio of red blood cells/serum (calculated for mg Se/L wet weight) was as high as 2.19 (45). In the present study, even the mean ratio of erythrocyte to plasma Se was lower than expected: 1.74 ± 0.35 irrespective of age or geographic area. This was lower ($Z=3.89$, $p<0.001$) as compared to a ratio of 1.94 ± 0.26 measured in German children with a similar age range (33). Analysing the Se ratio red blood cells/plasma in relation to geographic area, the children from the rural town of Kiskörös, in the flat countryside in the east, had a value of 1.66 ± 0.37 , which was significantly lower ($t=2.29$, $p<0.05$) than the 1.78 ± 0.34 of children from the other two towns, which are surrounded by hills. A shorter half-life span of the erythrocytes could not possibly be the reason, since haematological parameters such as haemoglobin, haematocrit or erythrocyte counts were normal in all children from the three regions. We raise the question of whether the Se intake was lower over a long period in Kiskörös as compared to the two cities. The Se content of the soil as well as the bioavailability of Se compounds might be different in the flat eastern region of the country in contrast to the hilly areas in the northwest or around the capital.

The plasma Se concentration is the most practical index of short-term changes in Se intake (46). The plasma Se values of Hungarian children between the ages of 1 and 5 are low as compared to published European data. Plasma Se in children of the whole Hungarian cohort was as low as that in children from Zagreb (42) or in children from Beograd, Split or Skopje (23). In Greece, different results were reported from different regions of the country. Subjects aged 6 to 20 years from Thessaloniki (35) had mean Se levels of $0.72 - 0.74\ \mu\text{mol/L}$, whereas subjects of the same age from Athens (34) had $1.54 - 2.16\ \mu\text{mol Se/L}$ in serum, which means that subjects from the south of Greece had Se levels twice that of subjects from the north.

Similar to our results, low serum Se values were reported by Gondi et al. in adult Hungarians from the southern ($0.60\pm 0.09\ \mu\text{mol/L}$) and northern parts ($0.70\pm 0.14\ \mu\text{mol/L}$) of the country. Bogyey et al. have shown that adults from the capital had 0.70 ± 0.10 and from Tatabánya $0.73\pm 0.14\ \mu\text{mol Se/L}$. These data were similar to our findings in children from the same cities aged 6-15 years.

Lombeck et al. (31) has observed a clear age dependency of serum Se with increasing values from infancy to adulthood. This was confirmed in Belgian children (47). In agreement with these observations, an age dependency

Table 4. Selenium concentration (mean \pm SD μ mol/l) in healthy children from European countries

Country	Method	Age (a)	Number	Serum or Plasma	Blood	Ref.
Austria	AAS	1-2	58	0.44 \pm 0.14	0.53 \pm 0.08	19
"	"	3-4	50	0.61 \pm 0.16	0.70 \pm 0.08	20
Belgium/N.	AAS	2-15	16		0.98 \pm 0.16	21
Belgium	AAS	2-12	32		1.19 \pm 0.20	22
Croatia	AAS	8-15	63	0.72 \pm 0.113		23
Czech Rep.	FM	6-13	184	0.71		24
England	AAS	4-9	59		1.33 \pm 0.24	25
"	"	3-15	20		1.47 \pm 0.26	"
"	"	6-7	38		1.28 \pm 0.14	"
England	AAS	2-4	21	0.82 (median)		26
"	"	4-16	49	0.99 (median)		"
Finland	FM	7-12	13	0.65 \pm 0.17	0.76 \pm 0.18	27
Finland	AAS	4-18	13	0.82 \pm 0.10		28
Finland	AAS	1-19	144	0.87 (1985)		29
"	"	"	95	1.34 (1989)		"
France	AAS	2-5	118	0.79 \pm 0.18		30
Germany	NAA	1-5	30	1.04 \pm 0.15		31
"	"	6-20	28	1.17 \pm 0.14		"
Germany	AAS	2-15	25		0.98	32
"	"	2-15	43		1.32	"
"	"	2-15	51		1.05	"
Germany	AAS	1-15	67	0.85 \pm 0.20	1.07 \pm 0.20	33
Greece	FM	0-5	20		1.10 \pm 0.16	34
"	"	5-10	16		1.54 \pm 0.18	"
"	"	1-20	30		2.16 \pm 0.24	"
Greece	AAS	6-10	18	0.72 \pm 0.11		35
"	"	11-20	19	0.76 \pm 0.20		"
Italy	AAS	6-11	182	1.03 \pm 0.16		36
"	"	9-13	187	1.01 \pm 0.12		"
"	"	11-15	848	1.00 \pm 0.14		"
Italy	"	12-13	217	1.05 \pm 0.16		37
Italy	"	12-13	627	1.04 \pm 0.13		38
Poland	FM	1-3	36	0.69 \pm 0.18	0.96 \pm 0.25	39
"	"	3-7	76	0.79 \pm 0.18	1.05 \pm 0.24	"
Turkey	FM	0.15-13	76	1.12 \pm 0.16		40
"	"	1-16	77	0.98 \pm 0.15		41
Yugoslavia	FM	1-16	79	0.68 \pm 0.07	0.74 \pm 0.13	42
Present study	AAS	1-5	42	0.55 \pm 0.11		
"	"	6-10	59	0.66 \pm 0.10	0.83 \pm 0.13	
"	"	11-15	60	0.65 \pm 0.07	0.82 \pm 0.11	

of blood and plasma Se was reported in most studies of European children (listed in Table 4). The influence of sex on Se content of different blood compartments in children are described contradictorily in the literature. Croatian boys (23) and African immigrant boys living in Paris (30) had higher plasma or serum Se levels than girls. In other studies, investigating larger numbers of children (29,34,36,40), there was no difference, in agreement with the present investigation and with observations made in German children (33).

Although almost all the Se in plasma is protein-bound, plasma glutathione peroxidase accounts for only about 12% of the total plasma Se in humans (48). The distribution of plasma Se in other selenoproteins has been partly described for primates (49). So far, plasma GSH-Px is the best known metabolically functional form of Se and it is an excellent marker of short-term changes of Se intake in Se-deficient individuals (50). After 2 days of Se

supplementation there was a significant increase in enzyme activity in children who had been Se-depleted for years (51). It is difficult to compare the enzyme results of different laboratories since measuring procedures have not been standardised. Our measurements, performed under the same conditions, showed that plasma GSH-Px activities were lower in Hungarian as compared to German children (44). The plasma enzyme activity showed an age dependency similar to plasma Se. A strong correlation between erythrocyte GSH-Px activity and whole blood Se content was found in adults from New Zealand with a low Se intake (50). The same research group found no correlation between these parameters in adults from other parts of the world with a higher Se supply (46). A correlation between erythrocyte Se and GSH-Px of erythrocytes was also observed in phenylketonuric children with a low Se status (25), in agreement with the present observations in healthy Hungarian children. In addition, a similar

correlation was found between blood Se and the erythrocyte enzyme. In children with the lowest erythrocyte Se and the highest erythrocyte GSH-Px activity we found no correlation. At this point one can only theorize about the reason for this finding. A poorer correlation was seen between the GSH-Px activity and Se content after supplementation of adults with selenomethionine versus selenite (52). In animals supplemented with different chemical forms of Se, as well, a higher proportion of Se from selenite was built into GSH-Px in contrast to Se from selenomethionine, which was found preferably in other selenoproteins (53). The percentage of Se associated with GSH-Px was influenced by the Se state and the dietary form of Se.

At the moment there is no indication that the low Se status in Hungary has any influence on the high mortality rate from cardiovascular diseases because corresponding findings in the other countries from southeastern or central eastern Europe are lacking.

Acknowledgement

This work was part of a research project on selenium and partially supported by the Hungarian National Foundation for Scientific Research (OTKA) No T 017146.

References

1. Anonymous (1979) Selenium in the heart of China. *Lancet* II, 889-890
2. CHEN, X., YANG, G., CHEN, J., CHEN, X., WEN, Z., GE, K. (1980) Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 2, 91-107
3. The Research Group on Environmental and Endemic Disease, Institut of Geography (1982) The geographical distribution of hair selenium content in Keshan disease and Keshan-Beck disease endemic and nonendemic areas. *Acta Geograph. Sin.*, 37 part 2
4. GE, K., YANG, G. (1993) The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am. J. Nutr. Suppl.* 57, 259S-263S
5. VAN RIJ, A.M., THOMSON, C.D., MCKENZIE, J.M., ROBINSON, M.F. (1979) Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 2076-2085
6. SALONEN, J.T., SALONEN, R., SEPPÄNEN, K., KANTOLA, M., PARVIAINEN, M., ALFTHAN, G., MAENPÄÄ, P., TASKINEN, E., RAURAAMA, R. (1988) Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischaemic heart disease in Eastern Finnish men. *Atherosclerosis* 70, 155-160
7. SALONEN, J.T., ALFTHAN, G., HUTTUNEN, K.J., PIKKARAINEN, J., PUSKA, P. (1982) Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* I, 175-179
8. MOORE, J.A., NOIVA, R., WELLS, T.C. (1984) Selenium concentrations in plasma of patients with arteriographically defined coronary arteriosclerosis. *Clin. Chem.* 30, 1171-1173
9. SHAMBERGER, R.J. (1970) Relationship of selenium to cancer. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 44, 931-936
10. BAJAN, F., VARGÁNÉ HAJDU, P., BELICZA, É. (1991) Az elkerülhető halálozások. The avoidable mortality. *Nepegéségtud. gy.* 72, 193-199
11. THOMSON, C.D., ROBINSON, M.F., CAMPBELL, D.R., REA, H.M. (1982) Effect of prolonged supplementation with daily supplements of selenomethionine and sodium selenite on glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand residents. *Am. J. Nutr.* 36, 24-31
12. GONDI, F., PANTO, G.Y., FEHÉR, J., BOGYE, G., ALFTHAN, G. (1992) Selenium in Hungary. The rock-soil-human system. *Biol. Trace Elem. Res.* 35, 299-306
13. ALFTHAN, G., BOGYE, G., ARO, A., FEHÉR, J. (1992) The human selenium status in Hungary. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 6, 233-238
14. BOGYE, G., FEHÉR, J., ALFTHAN, G., ANTTI, A. (1993) Complex study of selenium levels in healthy subjects in Hungary. *Orvosi Hetilap* 134, 2585-2587
15. SZABÓ, G., BÁLINT, SZ., NYESTE, E., MEDGYESI, T., TAMASKOVICS, A., PODMANICZKY, G. (1991) Trace element deficiency in healthy subjects based on multi-element analysis of serum and plasma. *Orvosi Hetilap* 132, 395-400
16. LOMBECK, I., PAPADAKI-PAPANDREOU, O., KAMIRI, F., LARYEA, M.D., JIANG, Y.F., LEITZMANN, P. (1989) A screening method for the evaluation of selenium status. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3, 175-178
17. FLOHÉ, L., GÜNZLER, W.A. (1984) Assay of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* Vol. 105 (Packer L. ed.) Academic Press Inc. London pp 114-121
18. WENDELA, (1981) Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology* Vol. 77 (Jacoby W.B. ed.) Academic Press Inc. London pp 325-333
19. TIRAN, B., TIRAN, A., PETEK, W., ROSSIPAL, E., WAW-SCHINEK, O. (1992) Selenium status of healthy children and adults in Styria (Austria). *Trace Elem. Med.* 9, 75-79
20. TIRAN, B., TIRAN, A., ROSSIPAL, E., LORENZ, O. (1993) Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood, serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 211-216
21. VAN CAILLIE-BERTRAND, M., DEGENHART, H.J., FERNANDES, J. (1986) Influence of age on selenium status in Belgium and the Netherlands. *Pediatr. Res.* 20, 574-576
22. VAN DAEL, P., DESCHUYTERE, A., ROBBERECHT, H., VAN CAILLIE-BERTRAND, M., LAMAND, M., DEELSTRA, H. (1994) Capillary whole blood selenium determination in assessing selenium status of children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 225-228
23. BECKER, D., ROMIC, Z., KRŠNJAVA, I., ZIMA, Z. (1992) A contribution to the world selenium map. *Biol. Trace Elem. Res.* 33, 43-49

24. KVICALA, J., ZAMRAZIL, V., SOUTOROVÁ, M., TOMISKA, F. (1995) Correlations between parameters of body selenium status and peripheral thyroid parameters in the low selenium region. *Analyst* 120, 959-965
25. LOMBECK, L., KASPAK, K., BACHMANN, D., FEINENDEGEN, L.E., BREMER, H.J. (1980) Selenium requirements in patients with inborn errors of amino acid metabolism and selenium deficiency. *Eur.J.Pediatr.* 134, 65-68
26. THOMAS, A.G., MILLER, W., SHENKIN, A., FEI, L., G.S., TAYLOR, F. (1994) Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal diseases. *J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19, 213-219
27. WESTERMARCK, T., RAUNU, P., KIRJARINTA, M., LAPPALAINEN, L. (1977) Selenium content of whole blood and serum in adults and children of different ages from different parts of Finland. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 40, 465-475
28. GEBRE-MEHDIN, M., EWALD, U., PLANTIN, L.O., TUVEMO, T. (1984) Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Paediatr. Scand.* 73, 109-114
29. WANG, W.G., NANTO, V., MAKELA, A.L., MAKELA, P. (1995) Effect of nationwide selenium supplementation in Finland on selenium status in children with juvenile rheumatoid arthritis. A ten-year follow up study. *Analyst* 120, 955-958
30. CHAKAR, A., MOKNI, R., CHAPPUIS, P., MAHU, J.L., WALRAVENS, P.A., BLEIBERG-DANIEL, F., THEROND, P., NAVARRO, J., LEMMONIER, D. (1993) Selenium status of healthy immigrant Parisian preschool children. *Biol. Trace Elem. Res.* 36, 25-33
31. LOMBECK, L., KASPAK, K., HARBISCH, H.D., FEINENDEGEN, L.E., BREMER, H.J. (1977) The selenium state of healthy children I. Serum selenium concentration at different ages; Activity of glutathione peroxidase of erythrocytes at different ages; Selenium content of food of infants. *Eur.J.Pediatr.* 125, 81-88
32. HEINZOW, B., JESSEN, H., MOHR, S., RIEMER, D. (1989) *In: Selenium in Biology and Medicine (Wendel A.ed.)* Springer-Verlag Berlin, pp. 246
33. CSER, M.A.: unpublished data
34. BRATAKOS, M.S., KANAKI, H.C., VASILIOU-WAITE, A., IOANNOU, P.V. (1990) The nutritional selenium status of healthy Greeks. The science of the Total Environment 91, 161-176
35. VAN CAUVENBERGH, R., ROBBERECHT, H., DEELSTRA, H. (1995) Serum selenium levels in Greek B-thalassaemia patients. *Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 12, 20-25
36. MORISI G., PATRIARCA M., MARANO G., GIANPAOLI S., TAGGI F. (1989) Age and sex specific reference serum selenium levels estimated for the Italian population. *Ann. Istit. Sup. Sanità* 25, 393-404
37. MARANO, G., SPAGNOLO, A., MORISI, G., MENOTTI, A. (1991) Changes of serum selenium and serum cholesterol in children during sexual maturation. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5, 59-61
38. SPAGNOLO, A., MORISI, G., MARANO, G., RIGHETTI, G., MAIETTA, A., MENOTTI, A. (1991) Serum selenium and precursors of cardiovascular risk factors in adolescents. *Eur.J.Epidemiol.* 7, 654-657
39. WASOWICZ, W., GROMADZINSKA, J., SKLADOWSKA, M., POPADIU, S.T. (1994) Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of children with cancer. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 53-57
40. HINCAL, F., YETGIN, S., ATACERI, N. (1989) Selenium status in Turkey I. Selenium levels in infants and children in Ankara. *Biol. Trace Elem. Res.* 20, 161-167
41. HINCAL, F., BASARAN, N., YETGIN, S., GOKMAN, O. (1994) Selenium status in Turkey II. Serum selenium concentration in healthy residents of different ages in Ankara. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 9-12
42. MIKAC-DEVIC, M., FERENEC, D., TIEFENBACH, A. (1990) Selenium levels in untreated children with acute lymphoblastic leukemia I. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 4, 7-10
43. OSTER, O., SCHMIEDEL, G.P., PRELLWITZ, W. (1988) Correlations of blood selenium with haematological parameters in West German adults. *Biol. Trace Elem. Res.* 15, 47-80
44. CSER, A., SZIKLAI-LÁSZLÓ, I., MENZEL, H., LOMBECK, L. (1993) Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 205-210
45. BRÄTTER, P., NEGRETTI DE BRÄTTER, V.E., JAFFÉ, W.G., MENDEZ CASTELLANO, H. (1991) Selenium status of children living in seleniferous areas of Venezuela. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5, 269-270
46. REA, H.M., THOMSON, C.D., CAMPBELL, D.R., ROBINSON, M.F. (1979) Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in New Zealand residents and visitors to New Zealand. *Br.J.Nutr.* 42, 210-218
47. VERLINDEN, M., VAN SPRUNDEL, M., VAN DER AUWERE, J.C., EYLENBOSCH, J. (1983) The selenium status of Belgian population groups. II. Newborns, children, and the aged. *Biol. Trace Elem. Res.* 5, 103-113
48. BEHNE, D., WOLTERS, W. (1979) Selenium content and glutathione peroxidase activity in the plasma and erythrocytes of non-pregnant and pregnant women. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 133-135
49. DEAGEN, J.T., BUTLER, J.A., ZACHARA, B.A., WHANGER, P.D. (1993) Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P and albumin in plasma. *Analytical Biochem.* 208, 176-181
50. THOMSON, C.D., REA, H.M., DOESBURG, V., ROBINSON, M.F. (1977) Selenium concentration and glutathione peroxidase activities in whole blood of New-Zealand residents. *Br.J.Nutr.* 37, 457-460
51. STEINER, G., MENZEL, H., LOMBECK, L., OHNESORGE, F.K., BREMER, H.J. (1982) Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state. *Eur.J.Ped.* 138, 138-140
52. BUTLER, J.A., THOMSON, C.D., WHANGER, P.D., ROBINSON, M.F. (1991) Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. *Am.J.Clin.Nutr.* 53, 748-754
53. WHANGER, P.D., XIA, Y., THOMSON, C. D. (1994) Protein techniques for selenium specification in human body fluids. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, 1-7

SELENIUM DETERMINATION IN BIOLOGICAL MATERIALS BY NAA

I. L. SZIKLAI,* Á. CSER,** I. LOMBECK***

**KFKI Atomic Energy Institute of the Hungarian Academy of Sciences,
P. O. Box 49, H-1525 Budapest (Hungary)*

***University Children's Hospital II, Semmelweis Medical University Budapest,
P. O. Box 91, H-1094 Budapest (Hungary)*

****University Children's Hospital Düsseldorf, D-1000 Düsseldorf 1 (Germany)*

(Received October 24, 1994)

Results for Se in several biological standard reference materials obtained by INAA and selective RNAA procedures developed in our laboratory, are presented and discussed. The comparison of selenium levels in selected blood plasma samples determined by non-destructive NAA and HG-AAS is also presented. The reproducibility and accuracy of the analytical procedure was tested and the results of these investigations were compared with the certified values.

In recent years, the reliable data on low level selenium concentrations in biological materials have become increasingly important because of the essential nature of this element for human and animal nutrition. Earlier, selenium has been known to be toxic at high levels, but only recently its deficiency has been related to a number of human physiological disorders.¹⁻³ On the other hand, there are regional selenium intake differences, as it is reflected by the measured blood selenium levels of the population in various countries.⁴ In Hungary, very few data are available on the average concentrations of selenium found in soil and food samples.^{5,6} These studies reported low selenium levels in the materials investigated. To the best of our knowledge no data have been published on the selenium status of human population.

To study the selenium status of Hungarian children of different ages a research program was initiated. For measuring the selenium levels in the selected blood samples neutron activation analysis (NAA) and atomic absorption spectroscopy with hydride generation (HG-AAS) were selected. As a part of this research program a simple and sensitive activation analytical procedure has been developed for the determination of selenium in biological materials. The present work deals only with the detection limits of ⁷⁵Se using instrumental neutron activation analysis (INAA) in comparison with those obtained by selective radiochemical separation (RNAA). The RNAA method is based on selective and quantitative postirradiation separation of selenium by precipitation and subsequent high-resolution γ -ray spectrometry. The conditions concerning the radiochemical separation have been optimized in experiments performed with a ⁷⁵Se

radiotracer. A special blood sample preparation procedure was also developed. To verify the accuracy and reproducibility of our NAA method, samples of IAEA and NBS Standard Reference Materials and pooled blood plasma samples were co-analysed and compared with the results obtained by HG-AAS.

Experimental

Sampling and sample preparation

Procedure 1: Approximately 5 cm³ of blood was venipunctured between 10.00 a.m. and 12 a.m. from children at the University Children's Hospital Budapest and the samples were placed in plastic tubes containing EDTA as an anticoagulant. Details of age, sex and location relating to each sample were recorded. Within a few hours the blood plasma was separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and transferred to polystyrene tubes and stored at -20 °C or -70 °C for subsequent analysis. Simultaneously total blood and red blood cell fractions were prepared for HG-AAS analysis and glutathione peroxidase activity measurements respectively. The details of these methods and the results obtained have been published elsewhere.⁷

Procedure 2: For neutron activation analysis 1-3 cm³ aliquots of the blood plasma samples were measured into polyethylene containers and lyophilized for 24 hours at -20 °C at a pressure between 0.1-0.2 Torr. The freeze-dried samples were homogenized and stored at -20 °C until the time of the irradiation. To prepare a "plasma pool", aliquots of about 5 cm³ from blood samples taken for routine analyses were used. Approximately 100 cm³ of blood samples were collected from healthy children (aged between 3-15 years), after homogenization of the blood, the plasma was separated, homogenized again and lyophilized in 20 batches. The wet weight as well as the residue dry weight of the samples were determined.

Samples and standards: For NAA measurements 80-150 mg freeze-dried blood plasma samples were weighed in polyethylene foil bags previously washed with 4M HNO₃. For the analysis of IAEA and NBS Standard Reference Materials 50-100 mg amounts of samples were used. Prior to analysis samples were dried at 80 °C for four hours. Selenium standard solution (100 µg/cm³) was prepared by dissolving selenium metal (99.99%, PIERCE) in high purity HNO₃ acid. Aliquots of this solution were measured on Whatman-41 filter paper and irradiated with a geometry identical to that of the samples.

For quality control the following Standard Reference Materials were used; (1) IAEA A-13 Freeze-dried Animal Blood, NBS Bovine Liver 1577, and (2) NBS Bovine Liver 1577a, NBS Rice Flour 1568, NBS Non Fat Milk Powder.

Irradiation: Irradiations were carried out at the Nuclear Training Reactor of the Technical University of Budapest at an operational power of 100 kW. The samples were irradiated for 8 hours at a thermal neutron flux of $1.4 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and a thermal to epithermal flux ratio of $\Phi_{th}/\Phi_e = 35.7$.

Measurement of gamma-spectra: For γ -spectrometry a Canberra Ge(Li) detector (with energy resolution of 1.82 keV and efficiency of 13.6% for the 1332.5 keV ^{60}Co line), Canberra linear electronics and an IBM PC/AT/386-based MCA equipped with the KFKI-PCA-4KN type card were used. This MCA set provides a dual port memory ($2 \times 4\text{K}$ -32-bit), high speed (5 μs conversion time), a good differential nonlinearity ($< 0.7\%$), and good temperature stability. The γ -spectra were measured for 200 to 900 minutes after decays of 14–18 and 60 to 90 days, respectively. For computation an IBM PC/AT/386 was used running the GAMFIT program an adaptation of the HYPERMET[®] to the IBM PC, for automatic peak searching, energy calibration and isotope identification.

Radiochemical separation of selenium: Prior to the analysis of the samples by RNAA, the parameters for selenium determinations were optimized. In a preliminary work, the following tracer experiments were carried out: known activities of ^{75}Se (440 Bq/g) were added to inactive biological samples, (lyophilized plasma, Bowen's Kale, milk powder) in order to determine selenium losses during the mineralization procedure and to establish the optimum conditions for separation. Results obtained from ten runs showed that the recovery of the selenium was very good, and reproducible, with a $(97 \pm 4)\%$ value on the average. It can be stated that no loss of selenium occurred either during destruction or during radiochemical procedure.

The digestion of the irradiated biological samples was accomplished with the mixture of conc. HNO_3 and HClO_4 (5 : 2) together with 10 mg selenium carrier and stepwise heating of the samples in 10 cm^3 volume quartz Kjeldahl tubes (overnight at 80 °C, 1 hour at 170 °C; 1 hour at 195 °C). Selenium was reduced to Se(IV) with conc. HCl (the final concentration for HCl about 14%), and then it precipitated to metallic form by adding hydroxylamine hydrochloride. The precipitate was left on a water bath for two hours then it was filtered on NUCLEOPORE poly-carbonate membrane filter-having a diameter of 25 mm and a pore-size of 0.45 μm . The precipitate was then washed three times with distilled water, dried at 105 °C for 1 hour and weighted in order to determine the chemical yield. Selenium standard samples were prepared by strictly identical procedure in order to obtain the same geometry for the measurements. The chemical yield for selenium was found to be $(82 \pm 4)\%$, throughout the present work.

Results and discussion

Selenium concentrations in plasma samples were determined on dry weight basis and converted to per 1 cm³ units on the basis of the experimentally determined freeze-dried residue i.e. (9.53 ± 0.5)% on the average (the estimated specific gravity of the fresh plasma is 1.026 g/cm³), in order to compare our results with that obtained by HG-AAS and literature values. Figure 1. shows the frequency distribution of the wet to dry weight

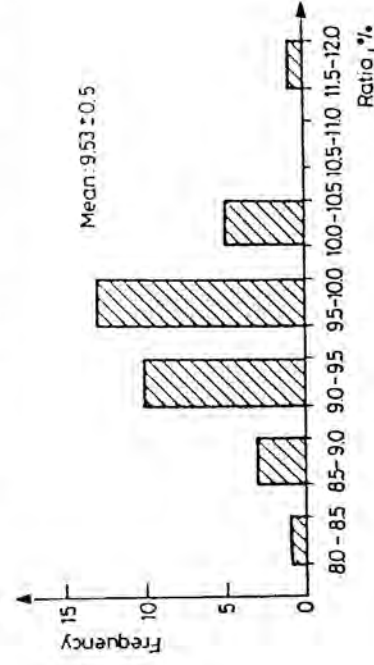


Fig. 1. Selenium concentration in blood plasma. Frequency versus the wet-to-dry weight ratio for the blood plasma samples studied (n = 33)

	Se ng/g dry-weight	Se ng/cm ³ wet-weight
Mean:	520	50.7
Standard deviation:	69	6.7
Coefficient of variation:	13.3%	13.2%

ratios (%) in the plasma samples studied (n = 33) and the corresponding numerical results for mean selenium concentrations calculated on dry and wet weight bases.

In order to test the accuracy, of the analytical procedures described here, the concentration of selenium was determined in simultaneously irradiated and measured IAEA and NBS standard reference materials. Results of these investigations in comparison with the certified values are shown on Fig. 2. In Table 1, the mean values of the selenium concentrations of replicate measurements, together with their standard deviations, as well as the coefficients of variations, i.e. c.v. (in %) are given. The measured values are generally in good agreement with those reported by NBS and IAEA (deviations varied from 1 to 8% for both INAA, and RNAA), however the selenium concentration in the SRM Rice Flour was found to be lower than the NBS

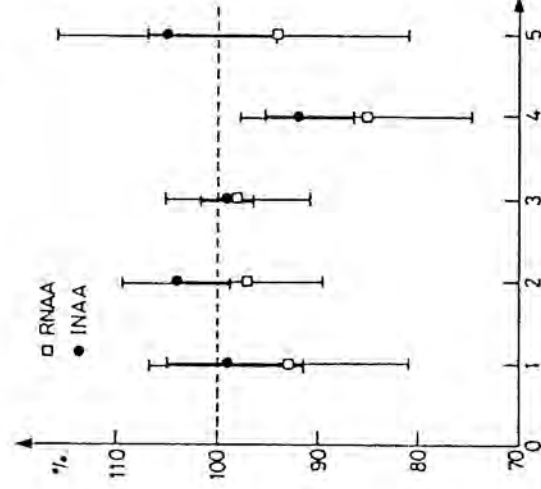


Fig. 2. The quality control of the measurements (the certified values are considered to be 100%): 1 - IAEA A-13 Freeze-dried Animal Blood, 2 - NBS SRM 1577 Bovine Liver, 3 - NBS SRM 1577a Bovine Liver, 4 - NBS SRM 1568 Rice Flour, 5 - NBS SRM 1549 Non-Fat Milk Powder

Table 1
Comparison of selenium concentrations and their standard deviations
in Standard Reference Materials obtained by INAA and RNAA methods (in $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry
weight, c.v. is given in %)

Sample	Method		Certified value
	INAA	RNAA	
IAEA A-13 Freeze-dried Animal Blood	238 \pm 18 (n = 8, c.v. = 7.6)	224 \pm 27 (n = 6, c.v. = 12.1)	240
NBS SRM 1577	1140 \pm 60 (n = 5, c.v. = 5.3)	1070 \pm 80 (n = 5, c.v. = 7.5)	1100 \pm 100
NBS SRM 1577a	701 \pm 18 (n = 10, c.v. = 2.6)	699 \pm 50 (n = 6, c.v. = 7.2)	710 \pm 70
NBS SRM 1568 Rice Flour	369 \pm 21 (n = 5, c.v. = 5.7)	340 \pm 35 (n = 5, c.v. = 10.3)	400 \pm 100
NBS SRM 1549 Non-Fat Milk Powder	115 \pm 13 (n = 5, c.v. = 11.3)	103 \pm 11 (n = 5, c.v. = 10.6)	110 \pm 10

c.v. - coefficient of variation.

I. L. SZIKLAI et al.: SELENIUM DETERMINATION

value, but agreed well with other literature values i.e. 350 ng/g and 320 ng/g by KALUSKOVÁ et al.⁹ and McDOWELL et al.,¹⁰ respectively.

In the determination of the plasma selenium levels the reproducibility of the INAA and RNAA methods was tested by analysing the 15 aliquots of a blood-plasma pool. The values listed in Table 2. represent the mean values of three individual results. The

Table 2
Comparison of selenium levels in children's blood plasma pool, obtained by INAA and RNAA methods

Sample No.	Selenium content, ng/cm ³	
	INAA	RNAA
P-S1	49.1	56.9
P-S2	54.6	53.5
P-S3	55.1	59.2
P-S4	53.8	55.2
P-S5	54.7	57.8
P-S6	55.6	59.3
P-S7	57.8	58.1
P-S8	52.9	54.1
P-S9	49.8	50.1
P-S10	53.1	55.2
P-S11	50.9	59.1
P-S12	52.5	52.4
P-S13	56.4	57.8
P-S14	53.8	51.2
P-S15	50.8	50.1
Mean ± S.D.	53.4 ± 2.4	55.3 ± 3.2
Relative standard deviation	4.5%	5.8%

calculated coefficients of variations were 4.5 and 5.8%, being consistent with the counting statistics. The error from counting statistics varied from 5 to 8% in these determinations.

A comparative analysis was carried out, and the selenium was determined in selected plasma samples of healthy Hungarian children by both INAA and HG-AAS methods. The measurements by HG-AAS were also part of a study on selenium in juvenile diabetics.⁷ Results of these comparative measurements for individual blood samples are plotted on Fig. 3. From the results it can be seen, that the agreement between the methods is quite good with a slope of 0.89 and a correlation coefficient of 0.83. These results demonstrate that there is no systematic bias between the two techniques applied.

Detection limits for selenium slightly varied according to the biological matrices and fell between 50 – 70 ng/g for INAA, and 15 – 30 ng/g for the applied radiochemical procedure. The detection limit calculations were based on the real sample measurement conditions, i.e., considering 8 hours of irradiation, a decay time of 14 to 60 days and 200 to 900 minute counting periods, an identical geometry, and with net peak counts of 50 for the most intense γ -lines (136 keV, 264.6 keV) of ^{75}Se .

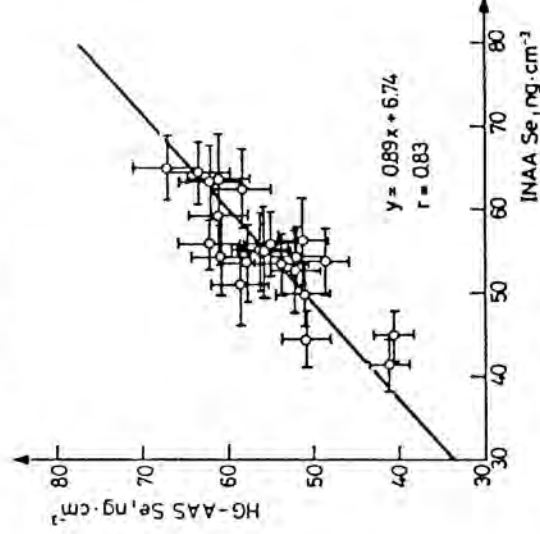


Fig. 3. Comparison of selenium results obtained by INAA and HG-AAS methods for 22 different plasma samples

From the results obtained for selenium in blood samples and other biological materials, it can be stated that both INAA or RNAA are reliable analytical methods. The accuracy verified by the analysis of Standard Reference Materials, the comparison of the results with that of HG-AAS, as well as the precision, determined by multiple analysis of blood plasma samples, proved to be good. The method will be adapted at the KFKI Nuclear Research Reactor and laboratory, because our research program will be continued with the application of the short lived ^{75}Se isotope. This will allow the determination of selenium in blood samples at very low levels with high sensitivity and very good precision, when utilizing the high neutron flux and controlled subthermal neutron facilities soon to be available at the KFKI nuclear research reactor, after the reconstruction.

I. L. SZIKLAI et al.: SELENIUM DETERMINATION

This work is part of a research project on selenium, partially supported by The National Foundation for Scientific Research (OTKA) No.2983., and the National Committee for Technological Development (OMFB) Hungarian-German Project No. 28.

References

1. K. P. WARD, J. R. ARTHUR, G. RUSSELL, P. I. AGGETT, *Eur. J. Pediatr.*, 142 (1984) 21.
2. H. ROBBERECHT, H. DEELSTRA, R. VAN GRIEKEN, *Biol. Trace Elem. Res.*, 25 (1990) 149.
3. E. B. THORLING, K. OVERAD, J. GEBOERS, *Annals of Clin. Res.*, 18 (1986) 3.
4. G. D. McORIST, J. J. FARDY, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 134 (1989) 65.
5. A. GERGELY, M. TEKES, K. MILOTAY, GY. BIRÓ, *Proc. 6th Inter. Trace Element Symposium, Vol.3, Leipzig, Germany, 1989*, p. 891.
6. F. GONDI, GY. PANTÓ G. BOGYE, G. ALFTIIAN, *Int. Symp. on Selenium, Beograd, Yugoslavia, 1991*.
7. A. CSER, I. SZIKLAI-LASZLÓ, H. MENZEL, R. ZÁS, I. LOMBECK, in: 11. Arbeitstagung Mengen und Spurenelementen, Leipzig, Universität Jena-Universität, Leipzig, 1991 p. 1.
8. G. W. PHILLIPS, K. W. MARLOW, Program HYPERMET for automatic analysis of gamma-ray spectra, *NRL Memorandum Report*, 3198, 1976.
9. J. KALOUSKOVÁ, K. DRÁBEK, L. PAVLIK, F. HODÍK, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 129 (1989) 59.
10. L. S. McDOWELL, P. R. GIFFEN, A. CHATT, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 110 (1987) 519.

J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.
Vol. 7, 1993, pp. 205-210

Selenium Status and Lipoproteins in Healthy and Diabetic Children

A. Cser, I. Sziklai-László*, H. Menzel** and I. Lombeck***

Department of Paediatrics II, Semmelweis Medical University, Budapest, Hungary

* Central Research Institute for Physics of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

** Institute of Toxicology, University of Düsseldorf, Fed. Rep. of Germany

*** Children's Hospital, University of Düsseldorf, Fed. Rep. of Germany

(Received October 1992/March 1993)

Summary

Selenium and the selenium-dependent glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured in healthy and diabetic children from Germany and Hungary. Hyperglycemia and hyperlipidemia are present in diabetes mellitus and they are associated with increased lipid peroxidation. The selenium content of erythrocytes, whole blood and plasma, as well as of plasma glutathione peroxidase activity, were found to be low in the healthy Hungarian children compared to the healthy Germans. Both groups of diabetics had significantly higher blood selenium (1.05 ± 0.14 versus $0.86 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ in Hungarians, 1.34 ± 0.21 versus $1.12 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$ in Germans) and higher plasma selenium (0.89 ± 0.15 versus $0.68 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ in Hungarians and 1.01 ± 0.2 versus $0.88 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ in Germans) than the healthy children of the same countries. In all diabetic children the plasma glutathione peroxidase activity and triglycerides were higher and the plasma HDL-cholesterols (HDL-C = high density lipoprotein-cholesterol) lower than those in healthy controls. The patients showed linear correlations between blood glucose and plasma glutathione peroxidase activity, as well as in erythrocyte glutathione peroxidase activity with triglycerides (TG) and an inverse correlation with HDL-cholesterol. Plasma selenium correlated only in healthy children with triglycerides, cholesterol and HDL-cholesterol. Irrespective of the geographical region diabetics had a higher selenium status than healthy children. In addition, we found correlations between selenium and lipoproteins in the reference group. The mode of glycation, oxidative procedures and the selenium binding to lipoproteins could explain the different associations in the healthy and diabetic children.

Keywords: Selenium, glutathione peroxidase, child, diabetes, lipoproteins.

Introduction

A wide spectrum of reference ranges of serum or plasma selenium in healthy children has been reported from different countries. Low values have been observed in Finland (1) and New Zealand (2), high levels in Canada (3, 4). Healthy German children have plasma Se values in the lower middle of this range (5). At present there are no data on blood Se levels of healthy Hungarian children.

Juvenile diabetes mellitus is characterized by hyperglycemia caused by an inability to produce sufficient amounts of insulin. Other pathological metabolic alter-

ations are unavoidable in the progression of this disease. Increased lipid peroxidation (6, 7), increased superoxide production *in vitro* (8) and *in vivo* (9) have been observed related to the glycemic control of the diabetic patients.

Selenium plays an important role in protecting against oxidative injury and is an essential constituent of the glutathione peroxidase enzyme.

Swedish authors (10) observed that serum Se was higher in diabetic children compared to healthy controls. While Se was related to lipids and lipoproteins in the healthy children, no such correlation was found in the diabetics (11). Conflicting results have been described concerning the behavior of GSH-Px activities in diabetics. Häglöf *et al.* (12) found no change in the enzyme activity of erythrocytes or lymphocytes of dia-

To whom correspondence should be addressed: Dr. M. Agnes Cser,
Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Kinderklinik, Stoffwechsellabor, Universitätsstraße 1,
D-40225 Düsseldorf 1

betic children. Others registered increased (13), decreased (14, 15) values or no change in cells (16), but increased activity in the plasma (16).

The aim of the present study was to investigate Se concentrations, GSH-Px activities in plasma and erythrocytes and their relation to plasma lipids and lipoproteins in diabetic as compared to healthy children from two different geographical regions.

Materials and Methods

Two studies were carried out, one in Budapest, Hungary from March to June 1990, and one in Düsseldorf, Germany from November 1990 to February 1991. The Budapest study involves 40 children with type I diabetes mellitus and 38 healthy controls. The Düsseldorf study had 18 diabetic and 16 healthy children (Table 1). Diabetics had their regular check-ups as outpatients, healthy children were waiting for minor surgical interventions. The healthy children were between the 5th and 95th percentiles for height and weight. Below the 10th percentile for both height and weight were one Hungarian and two German diabetics. None of the patients were obese. 4 ml EDTA blood was taken in a fasting state between 8–9 a.m. Informed consent was obtained from one or both parents and from each child. Protocols were approved by the University Committee on Research.

Within two hours plasma was separated, erythrocytes were washed three times with isotonic saline. Hungarian aliquots for Se and GSH-Px measurements were transported on dry ice to Düsseldorf and all samples were kept at -80°C until analysis.

Table 1. Clinical data of healthy and diabetic children

	Hungarians		Germans	
	diabetics	healthy	diabetics	healthy
Number of patients	40	38	18	16
Mean age (a)	12.6 \pm 3.0	12.1 \pm 3.2	12.1 \pm 2.9	12.0 \pm 3.4
Age range (a)	5–18	5–19.5	4.5–15.5	4.5–17
Males/ Females	22/18	22/16	9/9	8/8
Hemoglobin (g/L)	137 \pm 8.9	130 \pm 9.9	133 \pm 7.5	136 \pm 6.9
Packed cell volume (%)	40 \pm 2.5	38 \pm 3.1	39 \pm 2.2	40 \pm 2.1
Pl. triglyceride (mmol/L)	0.62 \pm 0.23*	0.39 \pm 0.11	0.68 \pm 0.43	ND
Pl. T. cholesterol (mmol/L)	4.50 \pm 0.89	4.22 \pm 0.71	4.45 \pm 0.62	ND
Pl. HDL-cholesterol (mmol/L)	1.78 \pm 0.37*	2.02 \pm 0.32	1.54 \pm 0.34	ND

Values given as mean \pm SD. * $p < 0.001$ compared to healthy Hungarians, ND = not determined.

Selenium was measured in whole blood and plasma samples by atomic absorption spectrophotometry with hydride generation (17). Accuracy of the selenium measurement was established by using two reference materials. Bovine liver (NIST 1577a US Department of Commerce, Gaithersburg) was found to be $705 \pm 16 \mu\text{g/Kg}$ of Se ($n = 10$), the certified value was $710 \pm 70 \mu\text{g/Kg}$ of Se. Human reference blood (Seronom TM Trace Elements Nycomed Oslo, Norway) was estimated to be $91.3 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$ of Se ($n = 12$), the certified Se value was $90 \mu\text{g/L}$. In each assay there were pooled plasma and whole blood measured for precision. The coefficients of variance were 3.5% within day and 5% between test days. Erythrocyte selenium was calculated from the individual packed cell volume results of each child.

Glutathione Peroxidase (EX.1.11.1.9.) activity was estimated in plasma according to Flohé and Günzler (18) and in erythrocytes using the method of Wendel (19). Two different plasma and erythrocyte pools were used. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.7% and 5.7% in measuring plasma and 3.6% and 6.2% in measuring erythrocyte GSH-Px activities respectively.

Plasma Glucose determinations were done by the glucose oxidase method (20). Triglycerides (TG) and Total Cholesterol (TC) were measured enzymatically by commercially available kits (Boehringer GmbH Mannheim Germany). HDL-Cholesterol was determined after phospho-wolframat and MgCl_2 precipitation (Sera-pack Reanal-Miles, Italy) the supernatant of the centrifugate was measured by spectrophotometry (21). Precipit E.L. (Boehringer GmbH Mannheim, Germany) served as quality control. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test (unpaired) and correlations were computed using linear regression analysis by the least squares method.

Results

Diabetic and healthy children from both countries were of similar age, sex ratio and hematological status (Table 1). The plasma TG values were significantly higher in diabetics compared to controls. The plasma TC levels of the Hungarian diabetics were in the normal range, but the HDLC values were lower than that in healthy children. German diabetics had similar TG and HDLC levels as did the Hungarian diabetics. The characteristic parameters of the two groups of diabetic patients (Table 2) did not differ with one exception in the German group. The highest blood glucose measured during the test day (1–2 days prior to the blood sampling) was higher in the German diabetics. Carbohydrate intake and trend in human insulin therapy were alike. The Se contents of all three blood compartments were significantly higher in diabetics com-

Characteristic clinical parameters of the diabetic state

	Hungarians	Germans
% of diabetics ^a	49.5 (19-104)	57 (10-135)
Caloric intake	194 ± 36	187 ± 37
Glucose during fasting (mmol/L)	4.8 ± 1.8	5.3 ± 0.9
Glucose during load (mmol/L)	7.7 ± 2.5	10.3 ± 4.6
Glucose during load (mmol/L)	11.6 ± 3.6	15.5 ± 6.3*
Insulin (µmol/L)	0.37 ± 0.16	0.37 ± 0.15
Insulin ^b	0.61 (0.23-0.82)	0.54 (0.30-0.83)

Values given as mean ± SD or medians (°) with P10 and P90 in brackets.
* $p < 0.05$

Healthy controls of the same country (Figure 1). German diabetics had the highest erythrocyte, blood and plasma Se values and these were higher than those of the healthy German children (Table 1). There were larger differences, among the two groups, where diabetics had much higher Se values than the healthy children ($p < 0.001$ in each compartment). Comparing the two groups of children, the Hungarians had significantly lower Se values in whole blood, plasma and erythrocytes. The differences between the two groups were similar in all compartments. In the same way, with the healthy children again having lower Se values than the diabetics in each blood compartment.

Se (µmol/L)

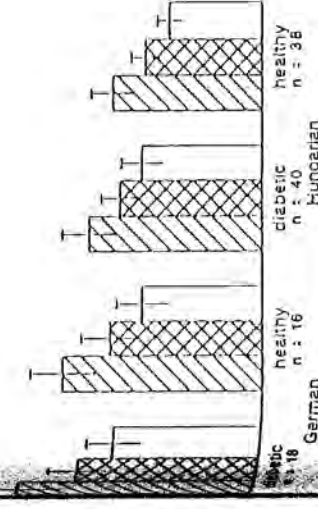


Figure 1. Selenium concentrations (mean ± SD) in erythrocytes (□), plasma (▨), and plasma (□) of diabetic and healthy children in Germany and Hungary.

GSH-Px activity showed a similar pattern in German and Hungarian children. Diabetics had higher enzyme activities than healthy controls. This did not reach significance in the German groups (Table 3). The erythrocyte activities were found to be between 6.0-6.7 U/g Hb without any difference among the four groups. There were strong linear correlations ob-

Table 3. Glutathione peroxidase activity in the plasma (U/L) and in erythrocytes (U/g Hb) of German and Hungarian children.

	Germans	Hungarians
Healthy		
Plasma	126 ± 29 (16)	95 ± 16 (36)
Erythrocytes	6.91 ± 1.45 (15)	6.50 ± 1.01 (36)
Diabetic		
Plasma	141 ± 27 (18)	110 ± 21* (40)
Erythrocytes	5.95 ± 1.25 (18)	6.72 ± 1.51 (40)

Values given as mean ± SD, * $p < 0.001$ compared to healthy Hungarians; the number of observations are in brackets.

served between plasma Se and TC ($r = 0.8535$, $n = 38$, $p < 0.001$), between plasma Se and HDLC ($r = 0.5696$, $n = 38$, $p < 0.001$) and between plasma Se and TG ($r = 0.7669$, $n = 38$, $p < 0.001$) in the healthy Hungarian children. No such relation was observed in the diabetics.

The plasma Se correlated positively with plasma GSH-Px activity in diabetics ($r = 0.3767$, $n = 40$, $p < 0.01$), but it failed to reach significance in the healthy Hungarian children. Plasma GSH-Px activity showed correlation with the mean blood glucose level in all diabetics ($r = 0.4999$, $n = 56$, $p < 0.001$). Erythrocyte GSH-Px activity was not associated with any biochemical parameters in the healthy children. In diabetics the erythrocyte enzyme activity correlated with TG levels (Figure 2) and a negative correlation was seen with HDLC (Figure 3).

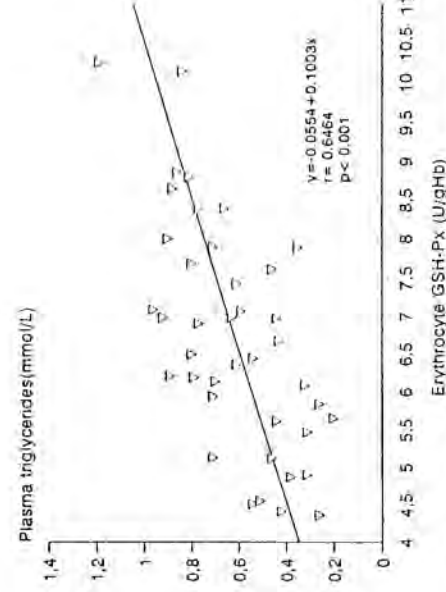


Figure 2. Positive linear correlation between plasma triglycerides and erythrocyte GSH-Px activity in diabetic Hungarian children ($n = 40$).

Discussion

Our results are in agreement with the observation of Swedish authors (10, 11) who described repeatedly that diabetic children had higher plasma selenium than their matched healthy pairs. We were able to confirm this

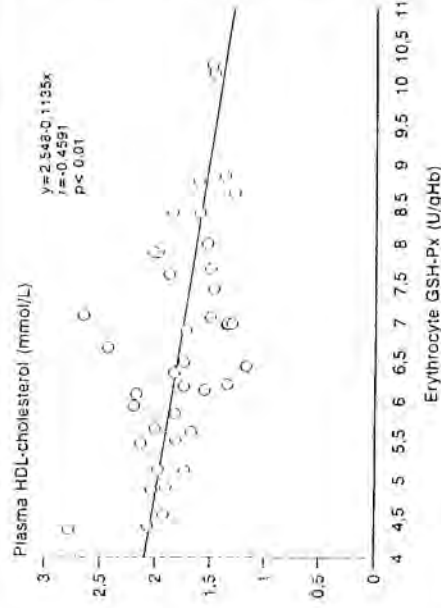


Figure 3. Negative linear correlation between plasma HDL-cholesterol and erythrocyte GSH-Px activity in diabetic Hungarian children ($n = 40$).

and show in addition that the selenium content of erythrocytes calculated for volume or for g hemoglobin was also significantly higher in the German and Hungarian diabetics than in the healthy controls. The whole blood-plasma ratio was almost identical in all four groups of children ($Q = 1.24$). Our data demonstrate that diabetics have more Se both in the cellular and extracellular compartment of the blood irrespective of the geographical region or eating habits.

Similar erythrocyte Se content as in our observations in the healthy German children has been reported by others (22, 23, 24). The Hungarian values are below these levels. Plasma or whole blood Se were found to associate rather well with dietary Se intake (25, 26, 27). The Se state in Germany is lower as it is in the United States (5), but it is higher than that in Scandinavia (28). There are only sporadic data from Hungary by Boda (29), Szabó (30) and recently by Alfthan (31). Gondi (32) reported that more than 90 percent of Hungarian soil samples had a Se-level lower than $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ in this country. This explains the differences in blood Se between the two groups of healthy children. However, it leaves the question still open, which mechanisms of regulation ensure the higher blood Se levels, especially for the Hungarian diabetics who most likely have a lower Se intake than the German diabetics. We found that independent of the Se provided by a certain geographical supply, diabetics maintained a higher blood Se status.

Diabetics have been recommended to follow a diet with higher protein intake, lower fat intake and containing less saturated fatty acids than non-diabetics. No investigations exist supporting the thesis that these diet alterations in diabetics would lead to higher Se intake. On the other hand, there are no data on increased retention of Se due to decreased urinary or fecal Se excretion at present. In our study all diabetics had normal renal function and were free of any gastrointestinal symptoms.

In addition to the higher blood Se in diabetics, their plasma GSH-Px values were also higher than those in healthy children. In the literature, plasma GSH-Px activity proven to be an appropriate marker of short-term changes of Se intake (33) and correlations between plasma Se and plasma GSH-Px were reported only when plasma Se levels were low. This was observed, for example, in healthy children from New Zealand and England (34, 35), in malnourished Sudanese children (36), and in dietetically treated children with metabolic diseases (37). Se-dependent GSH-Px activities are known to be affected by a number of factors other than Se intake, such as age, sex and oxidant stressors (38). Besides Se and the mean blood glucose, no other parameters correlated with plasma GSH-Px activity among the diabetics. Whether increased plasma GSH-Px induced by hyperglycemia, needs further investigations. Additionally, the Se contents of erythrocytes were also higher in diabetics than in healthy children; however, their enzyme activities were not different. Another selenoenzyme localized in membranes (39, 40) might have increased.

Our observations on lipids are only partly in agreement with these of the Swedish authors (11). Both of these studies revealed that plasma Se is related to plasma triglycerides and cholesterol only in the healthy groups of children.

Studies on relations of Se to lipoproteins are inconclusive. In healthy Scandinavian children and adults positive and inverse associations were found between Se and different lipoprotein fractions (11, 41, 42, 43, 44).

Our findings in healthy children are in agreement with the observations of Luoma (45) of healthy young Finnish adults and of Spagnolo (46) of healthy, 12–13 year-old Italian children. All of these studies showed positive correlations between plasma Se and HDL-cholesterol.

The associations between GSH-Px and lipids or lipoproteins are not the same in diabetics as they are in healthy children. The lipoprotein fractions of diabetics differ from those of the healthy not just quantitatively but also qualitatively through glycation, oxidation and non-specific binding of macromolecules (47, 48, 49). The only previous work on serum Se values in diabetic children excluded any association of these values to lipoproteins (11). In the present study, however, not Se but erythrocyte GSH-Px activities had a positive association with the elevated triglycerides and a negative correlation with HDL-cholesterol in the diabetic children. Patients with primary hypercholesterolemia or hypertriglyceridemia did not show altered plasma Se concentrations as compared to matched, healthy controls (50).

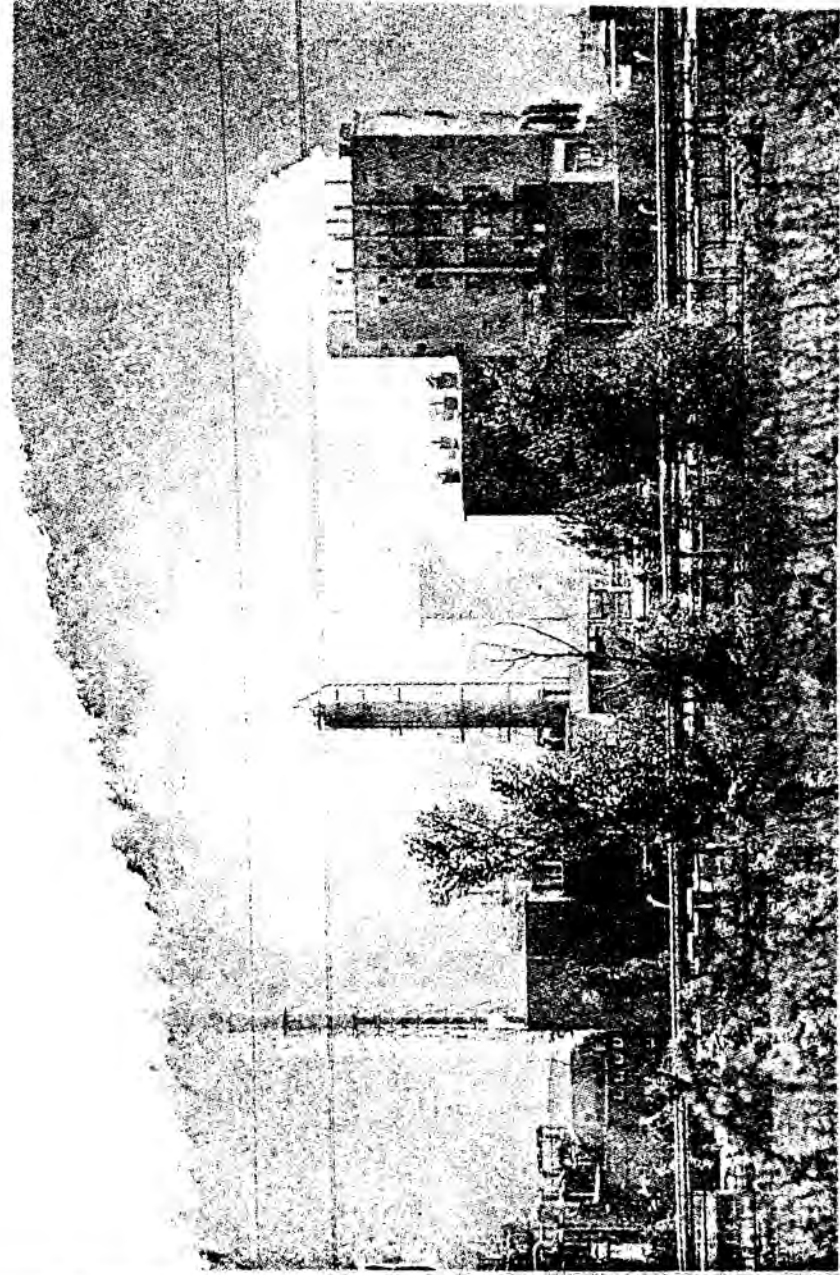
um binding to lipoproteins has been repeatedly reported in the past four decades and results have been conclusive. Alfa 2 lipoproteins (corresponding to HDL) as well as beta lipoproteins (corresponding to LDL) were described as sites of ⁷⁵Se binding in rats, mice and human (51, 52, 53, 54).

On the literature and on our own results we suggest that both LDL and HDL lipoproteins are associated with certain Se levels.

REFERENCES

1. Kumpulainen, T., Raunan, P., Kirjarinta, M. & Lappalainen, L. (1977) Selenium content of whole blood and serum in adults and children of different ages from different parts of Finland. *Pharmacol. Toxicol.* **40**, 465-475.
2. Verzie, R.L., Rea, H.M., Thomson, C.D. & Robinson, M.F. (1978) Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 1413-1418.
3. Wilson, B.L. & Lokitsch, G. (1988). Direct determination of selenium in serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background and a reduced palladium modifier. *Clin. Chem.* **34**, 709-714.
4. Hinch, G., Halsstead, A.C., Wadsworth, L., Quigley, G., Hinch, L. & Jacobson, B. (1988) Age- and sex-specific pediatric reference intervals and correlations for zinc, copper, selenium, iron, vitamin A and E and related proteins. *Clin. Chem.* **34**, 1618-1621.
5. Stock, I., Kasparek, K., Harbisch, H.D., Feinendegen, L.E. & Renner, H.J. (1977) The selenium state of healthy children I. Selenium concentration at different ages; Activity of glutathione peroxidase of erythrocytes at different ages; Selenium content of food of infants. *Eur. J. Pediatr.* **125**, 81-88.
6. Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoaka, S., Oshishi, N. & Kikuchi, K. (1979) Lipid peroxide levels of plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* **21**, 104-107.
7. Staki, I., Hagira, M., Tsunokawa, H., Musaki, N. & Yagi, H. (1978) Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem. Med.* **25**, 373-378.
8. Sirtori, K. & Amori, S. (1988) Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* **37**, 832-837.
9. Sirtori, A., Giuliano, D., Quatraro, A., Dello-Russo, P. & Amori, P.J. (1991) Metabolic control may influence the insulin superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Medicine* **8**, 540-542.
10. Medhin, M., Ewald, U., Platin, L.O. & Tuvemo, T. Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Paediatr. Scand.* **73**, 109-114.
11. Medhin, M., Ewald, U. & Tuvemo, T. (1988) Serum selenium is related to low-density lipoproteins in healthy children with diabetes. *Acta Paediatr. Scand.* **77**, 109-114.
12. Medhin, M., Ewald, U. & Tuvemo, T. (1988) Serum selenium is related to low-density lipoproteins in healthy children with diabetes. *Uppsala J. Med. Sci.* **93**, 149-158.
13. B., Marklund, S.L. & Holmgren, G. (1983) CuZn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Endocrinol.* **102**, 235-239.
14. Sirtori, B., Varga, Sz.L., Szabó, L. & Witas, H. (1982) The effect of diabetes on the activities of the peroxidase metabolism. *Horm. Metabol. Res.* **14**, 77-79.
15. S.N., Nath, N. & Rathi, A.B. (1984) Glutathione and its system in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol.* **247**, 14-15.
16. Sivas, A., Uysal, M. & Öz, H. (1987) Erythrocyte lipoperoxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res.* **19**, 89-90.
17. Kaji, H., Kurasaki, M., Ito, K., Saito, T., Saito, K., Nioka, T., Kojima, Y., Ohsaki, Y., Ide, H., Tsuji, M., Kondo, T. & Kawakami, Y. (1985) Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type 2 (Non-Insulin-Dependent) diabetic women. *Klin. Wochensch.* **63**, 765-768.
18. Lombeck, L., Papadaki-Papandreou, O., Kamini, F., Laryea, M.D., Jiang, Y.F. & Leitzmann, P. (1989) A screening method for the evaluation of selenium status. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **3**, 175-178.
19. Flohé, L. & Günzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 105 (Packer, L. ed.) Academic Press Inc., London, pp. 114-121.
20. Wendel, A. (1981) Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 77 (Jacoby W.B. ed.) Academic Press Inc., London, pp. 325-333.
21. Trinder, P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Am. Clin. Biochem.* **6**, 24-27.
22. Lopes-Virella, M.F., Stone, P., Ellis, S. & Colwell, J.A. (1974) Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.* **23**, 882-884.
23. Oster, O., Schmiedel, G. & Prellwitz, W. (1988) Correlations of blood selenium with hematological parameters in West German adults. *Biol. Trace Elem. Res.* **15**, 47-81.
24. Nève, J., Vertongen, F. & Capel, P. (1988) Selenium supplementation in healthy Belgian adults: response in platelet glutathione peroxidase activity and other blood indices. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**, 139-143.
25. Campbell, D., Bunker, V.W., Thomas, A.J. & Clayton, B.E. (1989) Selenium and vitamin E status in healthy and institutionalised elderly subjects: analysis of plasma, erythrocytes and platelets. *Brit. J. Nutr.* **62**, 221-227.
26. Nève, J., Vertongen, F. & Molle, L. (1985) Selenium deficiency. *Clin. Endocrinol. Metab.* **14**, 629-656.
27. Aaseth, J. & Thomassen, Y. (1989) Selenium concentrations in human tissues. In: *Selenium in Medicine and Biology*, (Nève, J., Favier, A. eds). Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp. 149-158.
28. Yang, G.Q., Gu, L.Z., Zhou, R.H., Yin, S.A., Yan, B.W., Liu, Y.Q. & Liu, Y.Q. (1989) Studies of maximal daily Se intake of safety in selenium area in China. I. Se intake and tissue Se levels of the inhabitants. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **3**, 77-87.
29. Thorling, E.B., Overad, K. & Geboers, J. (1986) Selenium status in Europe-huma data, a multicenter study. *Am. Clin. Res.* **18**, 3-7.
30. Boda, M. & Németh, I. (1989) Selenium levels in erythrocytes of children with celiac disease. *Orv. Hetilap* **130**, 2087-2090.
31. Szabó, C., Bálint, S., Nyeszt, E., Medgyesi, T., Tamaskovics, A. & Podmaniczky, G. (1981) Trace element deficiency in healthy subjects based on multi-element analysis of serum and plasma. *Orv. Hetilap* **132**, 395-400.
32. Alfthan, G., Bögye, G., Aro, A. & Feher, J. (1992) Assessment of the selenium status of Hungarians. Poster ISTERH Thir

- Internat. Conference and NTES Fourth Nordic Conference on Trace Elements in Health and Disease, 25–29 May, Stockholm
32. Gondi, F. (1990) Thesis: *Selenium in the geochemical environment*. Hungarian Academy of Sciences, Budapest
 33. Thomson, C.D., Rea, H.M., Doesburg, V.M. & Robinson, M.F. (1977) Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br. J. Nutr.* **37**, 457–460
 34. McKenzie, R.L., Rea, H.M., Thomson, C.D. & Robinson, M.F. (1978) Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 1413–1418
 35. Lloyd, B., Robson, E., Smith, I. & Clayton, B.E. (1989) Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activity. *Arch. Dis. Child.* **64**, 352–356
 36. Ahmed, H.M., Lombeck, I., El-Karib, A.O., El-Amin, E.O., Menzel, H. & Frosch, D. (1989) Selenium status in Sudanese children with protein-calorie malnutrition. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **3**, 171–174
 37. Steiner, G., Menzel, H., Lombeck, I., Ohnesorge, F.K. & Bremer, H.J. (1982) Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state. *Eur. J. Pediatr.* **138**, 138–140
 38. Ganther, H.E., Hafeman, D.G., Lawrence, R.A., Serfass, R.E. & Hoeksma, W.G. (1985) Selenium and glutathione peroxidase in health and disease – a review. In: *Trace elements in human health and disease*, Vol. II (Prasad, A.S., Oberlas D.eds.) Acad. Press, New York, pp. 165–234
 39. Ursini, F., Maiorino, M., Leonelli, M., Fianto, N. & Gregolin, C. (1982) A pig heart peroxidation inhibiting protein with glutathione peroxidase activity on phospholipid hydroperoxides. *Biochem. Internat.* **5**, 575–583
 40. Ursini, F., Maiorino, M. & Gregolin, C. (1986) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int. J. Tiss. React.* **VIII**, 99–103
 41. Virtamo, J., Valkela, E., Alfthan, G., Punsar, S., Huuttonen, J.K. & Karvonen, M.J. (1985) Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am. J. Epidemiol.* **122**, 276–282
 42. Ringstad, J., Jacobsen, B.K. & Thomassen, Y. (1987) The Tromsø heart study: relationship between the concentration of selenium and risk factors for coronary heart disease. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **1**, 27–31
 43. Salonen, J.T., Salonen, R., Seppänen, K., Kantola, M., Parvainen, M., Alfthan, G., Mäenpää, P., Taskinen, E. & Rauramaa, R. (1988) Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischemic heart disease in Eastern Finnish men. *Atherosclerosis* **70**, 155–160
 44. Salonen, J.T., Salonen, R., Seppänen, K., Kantola, M., Suntuinen, S. & Korpela, H. (1991) Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherosclerosis. *Brit. Med. J.* **302**, 756–760
 45. Luoma, P.V., Sotaniemi, E.A., Korpela, H. & Kumpulainen, J. (1984) Serum selenium, glutathione peroxidase activity and high density lipoprotein cholesterol – effect of selenium supplementation. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **46**, 469–472
 46. Spagnolo, A., Morisi, G., Marano, G., Righetti, G., Maietta, A. & Menotti, A. (1991) Serum selenium and precursors of cardiovascular risk factors in adolescents. *Eur. J. Epidemiol.* **7**, 654–657
 47. Wolff, S.P. & Dean, R.T. (1987) Glucose autooxidation and protein oxidation: the role of autooxidative glycosylation in diabetes mellitus and aging. *Biochem. J.* **245**, 243–250
 48. Hunt, J.V., Dean, R.T. & Wolff, S.P. (1988) Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation: glucose autooxidation as a cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biochem. J.* **256**, 205–212
 49. Mullarkey, C.J., Edelstein, D. & Brownlee, M. (1990) Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **173**, 932–939
 50. Malle, E., Sattler, W., Prenner, E., Leis, H.J., Karadi, I., Knipping, G., Romics, L. & Kostner, G.M. (1991) Platelet membrane fluidity in type IIA, type IIB and type IV hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* **87**, 159–167
 51. McConnell, K.P. & Levy, R.S. (1962) Presence of selenium-75 in lipoproteins. *Nature* **195**, 774–776
 52. Sandholm, M. (1974) Selenium carrier proteins in mouse plasma. *Acta pharmacol. et toxicol.* **35**, 424–428
 53. Hirokaa, T. & Galambos, G.T. (1966) Selenium metabolism III. Serum proteins, lipoproteins and liver injury. *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 321–328
 54. Burk, R.F. (1974) In vivo ⁷⁵Se binding to human plasma proteins after administration of ⁷⁵SeO₃²⁻. *Biochim. Biophys. Acta* **372**, 255–265.



KÖRNYEZETI ÁRTALMAK ÉS A LÉGZŐRENDSZER

III. kötet

SCHWEIGER OTTÓ ÉS SZABÓ TIBOR

TATA

1993.

Selen status egészséges gyermekekben és felnőttekben.

Írta: Cser Ágnes dr (1), Sziklai—László Ibolya dr. (2), Menzel Heimit dr (3),
Lombeck Ingrid dr (1)

Több, mint másfél évszázada fedezte fel Bertzelius a selen (2) és mindössze 20 éve tudjuk, hogy essentialis nyomelem az ember számára (20). A glutathion peroxidáz enzim alkotóelemeként fontos szerepe van a sejtek anyagcseréjében, hidrogenperoxidot és superoxidokat neutralizál, antioxidatív hatásával védi a sejtek integritását (15, 27). Az elmúlt évtizedben számos tanulmány jelent meg különböző országok népességének selen és glutathion peroxidáz értékeiről, melyek a geológiai környezettől függően széles skálát mutatnak egészséges populációkban is (21, 24, 29). A selen status a talaj — élelmiszerláncsal bevitt selen mennyiségétől és a selen biológiai felhasználhatóságának mértékétől függ (25). Munkánk megkezdésekor kevés adat létezett a magyar lakosság selen állottságára vonatkozóan (4, 8). 1991-ben Gondi számolt be arról, hogy a magyar talaj selenben szegény (9). Cser munkatársai alacsony vér és plazma Se értékeket találtak 5—20 éves fiatalokban (5, 6). Az elmúlt évben Szabó munkatársai (22), Gondi (10) és Alfthan (1) munkacsoportjai alacsony plazma és szérum selen szintet mértek felnőttekben, és gyermekek köröm mintáiban (1). A jelen munka az első tanulmány, melyben egyidejűleg vizsgáltuk a selen status több paraméterét egészséges gyermekekben és felnőttekben egyaránt.

Vizsgált egyének, módszerek:

161 magyar, 1—15 éves gyermeket és 67, azonos korú és nemű német gyermeket vizsgáltunk. 16 és 60 év közötti 147 felnőtt eredményeit Oster 1988-ban közölt adataihoz hasonlítottuk. Reggeli órákban, szűrővizsgálaton megjelent vagy kisebb sebészeti beavatkozás előtt álló, egészséges egyéntől étkezés előtt vettünk vért egyszerű használatos, nyomelemek mérésére alkalmas, EDTA-t tartalmazó, Greiner típusú polystyrol esővekbe. 2 óra belül, jégen szállítottuk a mintákat a laboratóriumokba, centrifugálással szeparáltuk a plazmát, a vörösvérsejteket háromszor mostuk 0.9%-os NaCl-el. A magyar mintákat -70°C -n tároltuk, szárazjégen szállítottuk Düsseldorfba. A selen (Se) meghatározást hidrid felétes, atomabsorpciós spectrometriával, Perkin Elmer AAS 1100 és MHS 20 készülékeken, EDL lámpával végeztük (13). Két referencia anyagot mértünk. Bovine liver (NBS 1577a US Dept. of Commerce, Gaithersburg) 705 ± 16 ng Se/g (n=10), a certifikált érték 710 ± 70 ng Se/g volt. A SeronormTM ver Trace Elements Nycomed, Oslo, Norvégia) 90.5 ± 2.3 ug Se/L (n=26), a certifikált 90 ug Se/L volt. Vér és plazma poolt határoztunk meg minden mérésnél, a variációs koeficienssek 3.5% munkanapon belül és 5% a mérési napok között. Glutathion peroxidáz (GSH-Px) a plazmában Flohé és Günzler (7), a vörösvérsejteken Wendel (27) szerint mértük. Nemzetközi standard nem létezik, saját poolt mértünk minőségi kontrollként. A meghatározáson belüli variáció 3.7 ill. 3.6% volt a plazmában ill. vörösvérsejteken, a napok közötti 5.7 és 5.6%-nak adódott. A statisztikai feldolgozást SPSS TM computer programmal végeztük.

Eredmények:

A vörösvérsejtek, vér és plazma Se szintek a magyar gyermekekben szignifikánsan alacsonyabbak, mint a németekben (1. Táblázat), az átlagos különbségek meghaladják a 30 százalékot. A gyermekek koruk szerint 3 csoportra osztva, 1—5, 6—10 és 11—15 évesekre, hasonló különbségek észlelhetők a magyarok és németek között. 1—10 éves kor között a vér Se tartalma az életkorral párhuzamosan növekszik ($y=0.03x+0.63$, $r=0.535$, $n=76$, $p<0.001$) a magyar gyermekeknél, hasonló tendencia észlelhető a német gyermekeknél is. A felnőtt korcsoportokban a 3 Se paraméter nem mutat lényeges különbséget 50 éves korig, az 51—60 évesek értékei azonban szignifikánsan alacsonyabbak, mint 21—30 éveseké (1. Táblázat). A felnőttek Se szintjeit hasonlítva az Oster által mért értékekhez, a magyarok értékei alacsonyabbak (3. Táblázat). A plazma GSH-Px aktivitása szintén a német gyermekekben magasabb, mint a magyarokban, mindhárom korcsoportban (4. Táblázat). Felnőttekben a plazma GSH-Px aktivitása magasabb, mint a gyermekekben, 16—20 év között 117 ± 20 U/L, 50 éves kor után esőkkendő tendencia látható, az átlagérték 100 ± 29 U/L. A reprodukív életkorban lévő nők enzim szintjei magasabbak, mint az azonos korú férfiaké. A vörösvérsejtek GSH-Px aktivitása az életkorral növekvő tendenciát mutat a magyar és német gyermekek-

ben is, 11—15 éves kor között a német gyermekek értékei szignifikánsan magasabbak, mint a magyaroké (5. Táblázat). A vörösvérsejt enzim $6.87 + 1.45 - 6.19 + 1.38$ U/g Hb közötti a felnőttekben, korcsoportok közötti különbség nincs. A reprodukzív életkorú nők magasabb sejt enzim aktivitást mutatnak, mint az azonos korú férfiak. A plazma Se és a plazma GSH-Px aktivitása között szoros, pozitív koreláció van 1—15 éves korban (ábra) és 16—60 éves korban is ($y=93x+43$), $r=0.577$, $n=147$, $p<0.001$). A vörösvérsejtek Se tartalma és enzim aktivitása között ugyancsak minden életkorban pozitív összefüggés észlelhető (gyermekekben: $y=0.239x+3.696$, $r=0.516$, $n=160$, $p<0.001$; felnőttekben: $y=0.445x+2.57$, $r=0.615$, $n=147$, $p<0.001$).

Megbeszélés:

A plazma Se szint gyorsan változik a Se bevittől függően (11, 18). A vér és vörösvérsejtek Se szintje a chronicus Se ellátottságot tükrözik, legalább 4—6 hét után jelzik a megváltozott Se bevitt (11, 24). Mindhárom Se paraméter alacsonyabb a magyarokban, mint az európai átlag (12, 25) és hasonló az Európában mért legalacsonyabb értékekhez, melyeket Ausztriában (26) és Jugoszláviában (16) észleltek. Vizsgálataink megerősítik más magyar szerzők megfigyeléseit (1, 10, 22). A Se szintek kortól függősége alacsony Se status esetén is észlelhető ugyanúgy, mint magasabb Se statusú gyermekekben (14). A plazma GSH-Px aktivitás a legérzékenyebb paraméter a Se bevitt követő gyors változások mérésénél, különösen a kívántnál alacsonyabb Se status megítélésakor (23). A vörösvérsejt GSH-Px a legstabilabb paraméter, mert a Se a csontvelőben épül a sejtbe és a megváltozott Se status csak a frissen képződött sejteket érinti (19). Különböző országokban és laboratóriumokban mért GSH-Px szintek nem hasonlíthatók össze, mert a módszer nincs standardizálva. Saját méréseink egyazon laboratóriumban készültek, így elfogadható jelentőségű, hogy a magyarokban mért enzim aktivitások alacsonyabbak, mint a németeké. Plazma Se és plazma GSH-Px aktivitás, valamint vörösvérsejt Se és enzim szint közötti függetlenül fennálló szoros összefüggés ezen paraméterek között azt bizonyítja, hogy a magyar populáció Se statusa nem megfelelő. A magyar táplálkozási szokások számos rizikófaktort hordoznak, melyek közrejátszhatnak magas morbiditású betegségek kialakulásában (3). Alacsony Se status újabb rizikófaktort jelenthet. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy milyen lépéseket kell tennünk a fiziológias Se status kialakításához Magyarországon.

- Alfhan, G., Bogye, G., Aro, A., Fehér, J.: The human selenium status in Hungary. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1992, 6, 233 — 238.
- Berzelius, I.J.: Sur deux métaux nouveaux (lithium et sélénium). *Schweigger J.* 1817.21, 1818 — 1823.
- Biró, Gy., Pfaff, Gy.: Risikofaktoren in der Ernährung der ungarischen Bevölkerung. *Ermährungswissenschaft* 1992. 39, 403 — 409.
- Boda, M., Németh, I.: Coeliákias gyermekek vörös vérséjt szelén szintjének vizsgálata. *Orv. Hetilap* 1989. 130, 2087 — 2090.
- Cser, A., László—Szikszai, I., Menzel, H., Zs+R., Lombeck, I.: Selen bei jugendlichen Diabetikern. In: *Men- gen- und Spurenelemente 11. Arbeitstagung 1991. Szerkesztő: Anke M. és Mitsai, Friedrich—Schüler—Uni- versität Jena*, 1 — 8.
- Cser, A., Sziklai—László, I., Menzel, H., Lombeck, I.: Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993. megjelenés alatt.
- Flohé, L., Günzler, W.A.: Assays of glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, 105. Vol. Szerkesz- tő: Packer, L. Academic Press Inc. London, 114 — 121.
- Gergely, A., Tekes, M., Milotay, K., Biró, Gy.: Selenium and aluminium in Hungarian nutrition. *Trace Element Symposium 1989*, Jena.
- Gondi, F.: Szelén a geokémiai környezetben. *Kandidátusi értekezés 1990.*
- Gondi, F., Pantó, Gy., Fehér, J., Bogye, G., Alfhan, F.: Selenium in Hungary. The rock—soil—human system. *Biol. Trace Elem. Res.* 1992. 35, 299 — 306.
- Levander, O.A., Sutherland, B., Morris, V.C., King, J.C.: Selenium balance in young men during selenium dep- lection and repletion. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981. 34, 2662 — 2669.
- Lockitch, G.: Selenium: clinical significance and analytical concepts. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1989. 27, 483 — 541.
- Lombeck, I., Papadaki—Papandreou, O., Kamin, F., Laryea, M.D., Jiang, Y.F., Leitzmann, P.: A screening me- thod for the evaluation of selenium status. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1989. 3, 175 — 178.
- Lloyd, B., Robson, E., Smith, I., Clayton, B.E.: Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase acti- vity. *Arc. Dis. Child.* 1989. 64, 352 — 356.
- Machlin, L.J., Bendich, A.: Free radical tissue damage. protective role of antioxidant nutrients. *FASEB* 1978. 1, 441 — 445.
- Maksimovic, Z.J., Djusic, I., Jovic, V., Rsumovic, M.: Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biol. Trace Elem. Res.* 1992. 33, 187 — 196.
- McKenzie, R.L., Rea, H.M., Thomson, C.D., Robinson, M.F.: Selenium concentrations and glutathione peroxi- dase activity in blood of New Zealand infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.* 1978. 31, 1413 — 1418.
- Néve, J., Vertongen, F., Capel, P.: Selenium supplementation in healthy Belgium adults: response in platelet glu- thathione peroxidase activity and other blood indices. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988. 48, 139 — 143.
- Perona, C., Guidi, G.C., Piga, A., Cellerino, R., Menna, R., Zatti, M.: In vivo and in vitro variations of human erythrocyte glutathione peroxidase activity as results of cell aging, selenium availability and peroxide activa- tion. *Brit. J. Haematol.* 1978. 39, 399 — 408.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G.: Selenium: biochemi- cal role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973. 179, 588 — 590.
- Schamberger, R.J., Gunsch, M.S., Willis, C.E., McCormack, L.J.: Selenium and heart disease. II. Selenium and other trace metal intakes. In: *Trace Substances in Environmental Health*. 12. Vol. Szerkesztő: Hemphill, D.D. University of Missouri Press, Columbia 1978. 48.
- Szabó, G., Bálint, S., Nyeste, E., Medgyesi, I., Tamaskovics, A., Podmaniczky, G.: Egészséges emberek hiányos nyomelem ellátottsága a serum és plazma multielemes analízise alapján. *Orv. Hetilap* 1991. 132, 395 — 400.

23. Thomson, C.D., Rea, H.M., Doesburg, V.M., Robinson, M.F.: Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand infants and children. *Am.J.Clin.Nutr.* 1978. 31, 1413 — 1418.
24. Thomson, C.D., Robinson, M.F.: Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *Am.J.Clin.Nutr.* 1980. 33, 303 — 323.
25. Thorling, E.B., Overad, K., Geboers, J.: Selenium status in Europe—Human data a multicenter study. *Annales Clin.Res.* 1986. 18, 3 — 7.
26. Tiran, B., Tiran, A., Petek, W., Rossipal, E., Wawschinek, O.: Selenium status in Styria (Austria). *Trace Elem.Med.* 1992. 9, 75 — 79.
27. Ursini, F., Bindoli, A.: The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys.Lipids* 1987. 44, 255 — 276.
28. Wendel, A.: Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*, 77. Vol. Szerkesztő: Jacoby, W.B. Academic Press Inc. London, 325 — 333.
29. Westermarck, T., Rauanu, P., Kirjaranta, M., Lappalainen, L.: Selenium content of whole blood and serum in adults and children of different ages from different parts of Finland. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1977. 40, 465 — 475.

1. Táblázat: Selen szintek (umol/L) egészséges, 1—15 éves korú gyermekekben

	Vörös vörsejt	Vér	Plazma
Magyarok n=161	1.096±0.239***	0.800±0.118***	0.616±0.102***
Németek n=67	1.439±0.290	1.069±0.202	0.852±0.1195
Különbség %-ban	31	34	38

M + SD értékek, significancia**=p<0.001 magyar és német összehasonlítás

2. Táblázat: Selen szintek (umol/L) 16—60 éves, egészséges felnőttekben

Kor (évek)	n=	Vörös vörsejt	Vér	Plazma
16—20	16	1.200±0.253	0.919±0.139	0.750±0.093
21—30	30	1.258±0.254	0.976±0.152	0.782±0.141
31—40	50	1.251±0.245	0.961±0.151	0.749±0.132
41—50	29	1.183±0.246	0.908±0.161	0.715±0.147
51—60	22	1.064±0.225**	0.828±0.174**	0.672±0.188*

M+SD értékek, significancia**=p<0.05, 21—30 évesekhez hasonlítva

3. Táblázat: Selen szintek (ug/L) egészséges felnőttekben

	n=	Vörös vörsejt	Vér	Plazma
16—60 éves magyarok	147	94±19***	73±12***	58±11***
17—60 éves németek	160	131±15	93±18	66±13
Oster 1988	39	28	14	
Különbség %-ban				

M+SD értékek, significancia***=p<0.001 magyar és német összehasonlítás

4. Táblázat: Plazma glutathion peroxidase (U/L) egészséges gyermekekben

	Kor (évek)	Magyarok	Németek
	1—5	88±20*** (42)	117±21 (19)
	6—10	92±18*** (59)	127±30 (33)
	11—15	(60)	(15)

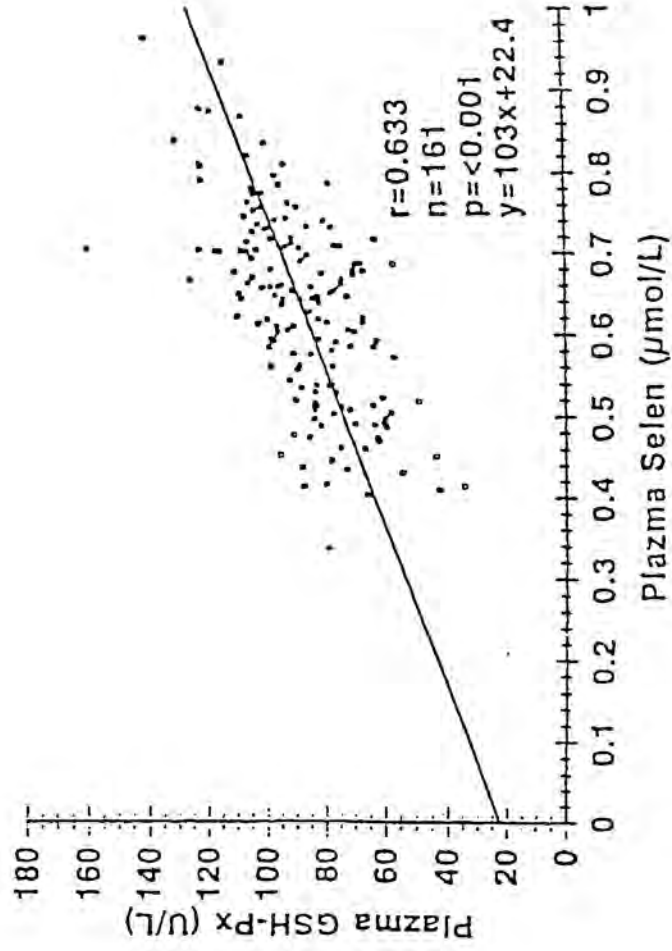
M+SD értékek, significancia***=p<0.001 magyar és német összehasonlítás, esetszám zárójelben

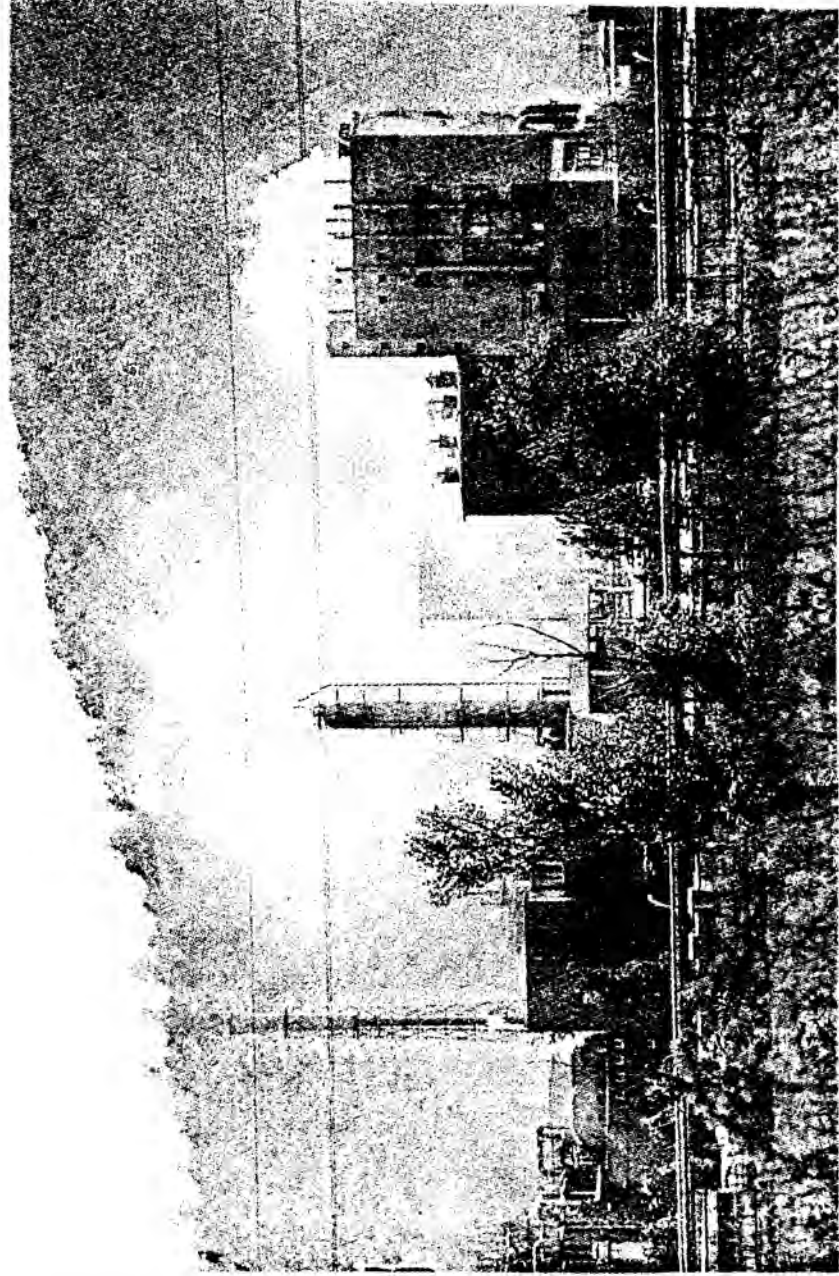
5. Táblázat: Vörösvérsejt glutathion peroxidase (U/g Hb) egészséges gyermekekben

	Kor (évek)	1—5	6—10	11—15
Magyarok	5.44±0.90	5.84±0.99 (42)	6.12±0.97** (59)	(60)
Németek	5.28±1.35	6.21±1.49 (19)	7.24±1.61 (33)	(15)

M±SD értékek, signifikancia**=p<0.01 magyar és német összehasonlítás, esetszám zárójelben

1-15 éves magyar fiúk, leányok





KÖRNYEZETI ÁRTALMAK ÉS A LÉGZŐRENDSZER

III. kötet

SCHWEIGER OTTÓ ÉS SZABÓ TIBOR

TATA

1993.

Nyomelemek a környezetben és az emberi szervezetben

Írta: Sziklainé László Ibolya dr., Cser Ágnes dr.*, Rausch Henrik dr., Prof. Dr. Ingrid Lombeck*

A nyomelemek fontossága

Már régen felismerték, hogy bizonyos nyomelemek jelenléte és adott koncentrációja az élő szervezetek megfelelő működésében fontos szerepet játszik. Betegségek, vagy terápiás beavatkozások, környezeti ártalmak esetében azonban ezek a nyomelemszintek megváltoznak. Minthogy a biológiai eredetű minták analízisekor gyakran igen kis koncentrációban jelenlévő nyomelemek meghatározása, illetve igen kis koncentráció változások nyomonkövetése a feladat, ezért a nyomelemtutásban — humánbiológiai és környezetkémiai vonatkozásban egyaránt — csak a nagyrészt enyveségű analitikai módszerek fejlődése hozott előrelépést. Ezen elemek molekuláris biológiai szintű hatásának tisztázását a különböző határterületi tudományokat is átfogó nyomelemtudomány segíti elő.

A nyomelemek osztályozása és biológiai funkcióik

A nyomelemek két nagy csoportra oszthatók: lényeges „essencial” és nem lényeges nyomelemekre. Lényegesek azok a nyomelemek, amelyek az élő szervezetekben az egészséges szövetekben mindig megtalálhatók, biológiai funkciójuk ismert. A lényeges nyomelemek koncentrációjának megváltozása általában funkcionális változások eredménye, következőképpen endogén eredetű. Ezért csak relative kis koncentrációváltozások várhatók. Ha azonban a lényeges elemek nagyobb koncentrációiban vannak jelen, akkor az élő szervezetekben mérgezőek is lehetnek. A nem lényeges nyomelemek azok, amelyek koncentrációjának megváltozását általában környezetü ténylezők okozzák pl. környezetszennyezés, tehát a változás exogén eredetű. Ebből a szempontból a nehézfémek különösen érdekesek, mivel felúsulásuk az emberi és állati szervezetekben egyaránt számos betegség okozója lehet. A nyomelemek fenti osztályozása nem mindig egyértelmű. Egyes elemek a koncentrációtól, oxidációs és koordinációs állapottól, biokémiai hatástól függően lehetnek létfontosságúak, toxikus, carcinogén és/vagy terápiás hatásúak.

A nyomelemek mindegyike egy vagy több élettani jelentőséggel bír, a vitaminokhoz hasonló biológiai fontosságuk van. A lényeges nyomelemeknek négy fő funkciója ismert: szerkezeti elemek (Si), stabilizátorok (Fe, Co), a hormonális működést szabályozók (I), enzim aktivátorok (Cu, Se stb.). A Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn és Se biológiai szerepe már jól ismert. A Cr, Sn, V, F, Si, As és Ni biológiai funkciójának pontos felderítése napjainkban is folyamatban van.

A nyomelemek meghatározásának fontossága az orvostudományban és a környezetvédelem területén

Az utóbbi két évtizedben egyre fokozódik a klinikai érdeklődés a nyomelemek iránt. Ennek a fejlődésnek a főbb okai a következők lehetnek:

- egyre több nyomelem szerepének felismerése az emlősök táplálkozásában,
- új hiánybetegségek klinikai vizsgálata,
- a nyomelemek kedvező biológiai hatásával és toxicitásukkal összefüggő ismeretanyag bővítése,
- a nyomelemek környezetben való feldúsulásának felmérése,
- a nyomelemek természetben végbemenő körforgásának jobb megértése, beleértve bio-geokémiájukat is,
- különböző szennyezések környezetbe történő kibocsátásának korlátozása.

A környezetszennyezés komoly tényező lehet bizonyos krónikus betegségek előfordulásánál, ezért szükséges a normál és a rendellenes nyomelemekkoncentrációk meghatározása az emberi szervezetben, az emberi környezetben és az élelmiszerekben egyaránt. A vizsgált elemek toxikológiai megítélése szempontjából az elemi koncentrációk meghatározása mellett rendkívül fontos a kémiai forma ismerete is. Az eltérő oxidációs állapotokhoz jelentősen változó toxicitás tartozik. Pl. az arzén, mind az As(III) illetve az As(V) oxidációs állapotban (főleg a talajban, talajvízben) nagy mértékben toxikus, míg pl. a dimetil arzénsav sokkal kisebb mértékben az.

Az AEKI Reaktorkémiai Laboratóriumában elsősorban aktivációs analitikai módszerrel végzett kutatásokban fontos helyet foglalnak el, mind az orvosi biológiai, mind a környezetkémi kutatások. A továbbiakban az utóbbi évek két fontosabb kutatási eredményét ismertetjük.

Szelén az emberi környezetben

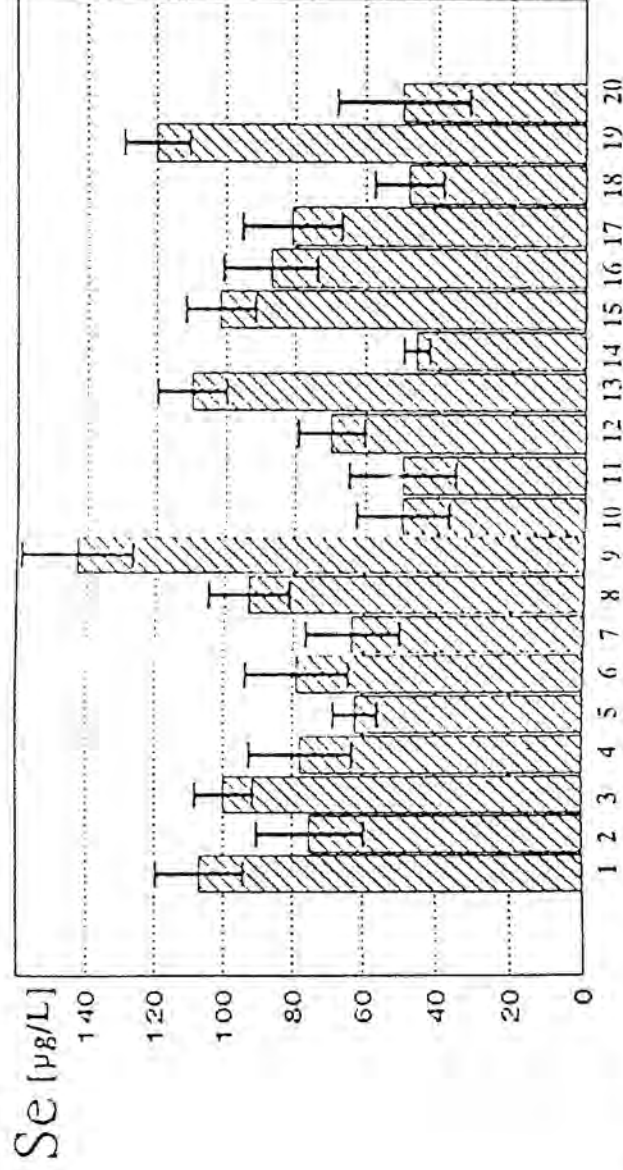
A szelén biológiai fontossága ma már jól ismert. Korábban csak toxikus hatását vizsgálták, ma már tudjuk, hogy a szelén a vörös vérszövetben jelenlévő egyik enzim, a glutathion peroxidáz fontos alkotója. Az elmúlt évtizedek kutatásai jelentős változásokat eredményeztek a szelén szerepének megítélésében, mind az emberi táplálkozásban mind az egészségi állapotról vonatkozóan. Schwarz és munkatársai 1957-ben igazolták először, hogy a szelénnek lényeges biológiai szerepe van. Az utóbbi években végzett kutatások eredményei alapján ma már tudjuk, hogy az emlősök szervezetében három létfontosságú enzimnek és bizonyos fehérjéknek lényeges alkotóeleme a szelén. Daganatellenes hatását már korábban igazolták állatkísérletekben, de ezt a hatást az emberi szervezetben még nem tudták egyértelműen bizonyítani. Ismeretes továbbá, hogy a szelén megvédi a vesét a higany vagy kadmium toxikus hatásától azáltal, hogy csökkenti a toxikus fémek abszorpcióját. Mai ismereteink szerint egyedül a cardiomyopathya (Keshan-betegség) esetében bizonyított, hogy a betegség kialakulása az alacsony szelén-ellátottsággal függ össze. Klinikai vizsgálatok szerint azonban számos egyéb, az emberi szervezetben kialakuló körképben a szelén-hiány is fontos szerepet játszik.

Szelén-hiánnyal összefüggő betegségek

- Táplálkozási zavarok (alutápláltság, teljes mesterséges táplálást igénylő állapot, felszívódási zavarok),
- Speciális diétái igénylő betegségek (Phenylketouria, Maple-syrup betegség),
- Keshan-kór, Szívizom betegségek,
- Vesezületeti izomsorvadás,
- Hasnyálmirigy betegségek,
- Daganatos megbetegedések,
- Egyéb betegségek (diabéteszes retina elváltozások, szemlencse degeneráció, coeliakia)

A humán szelén státusz változása a földrajzi környezettel

A szelén a környezetből, elsősorban a táplálékkal kerül be az emberi szervezetbe és ott rövid idő alatt felszívódik. A szelén ún. normál koncentrációja a vérben földrajzi ingadozásokat mutat (1. ábra). Ennek egyik oka a talaj szelén-



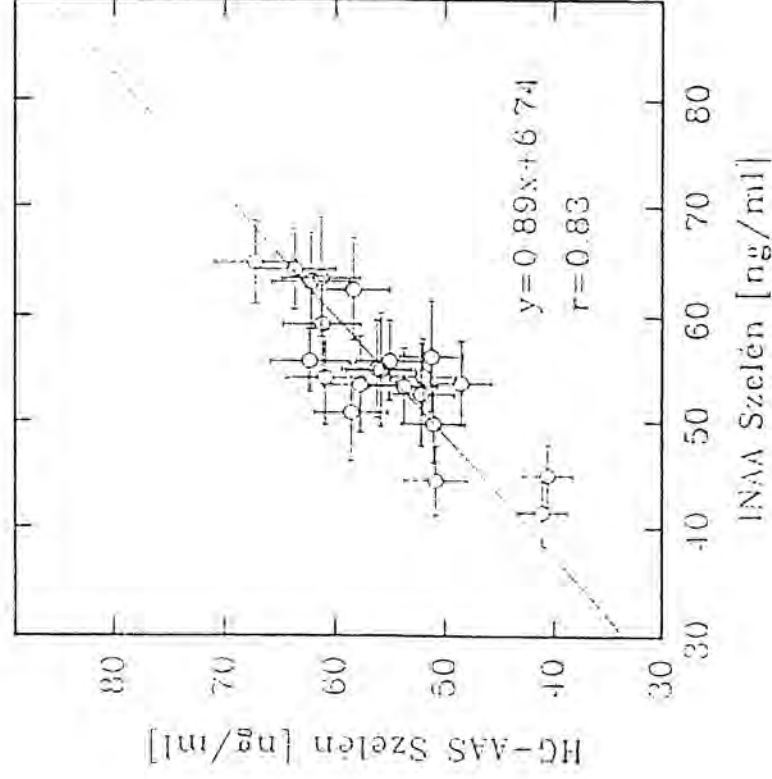
1. ábra A plazma szeléntartalmának változása a különböző országokban ($\mu\text{g/L}$) + SD. A számok jelentése: 1—Anglia, 2—Ausztrália, 3—Belgium, 4—Dánia, 5—Finnország, 6—Franciaország, 7—Görögország, 8—Hollandia, 9—Kanada, 10—Korea, 11—Lengyelország, 12—Németország, 13—Norvégia, 14—Olaszország, 15—Portugália, 16—Spanyolország, 17—Svájc, 18—Új Zéland, 19—USA, 20—Jugoszlávia.

tartalmának változása a különböző országokban. Thorling⁶ és Lyengar⁷ összefoglaló tanulmányai szerint a különböző országokban mért plazma-szelén átlagértékek széles határok között változnak (46 µg/L—Olaszország, és 143 µg/L—Kanada). A szelén státusra vonatkozó előzetes vizsgálataink szerint Magyarországon a felnőtt lakosság (20—60 év életkor) plazma-szelén értékei 58—65 µg/L között változnak⁸. Lombeck és munkatársai⁹ vizsgálták a plazma-szelén értékek változását egészséges és anyagcserebetegségben szenvedő gyermekekben az életkor függvényében. Azt találták, hogy az életkor és a szelén koncentráció között pozitív korreláció van.

Szelén meghatározások RNAA és AAS módszerekkel

A reaktor-neutron aktivációs analitikai módszer egyik jelentős alkalmazási területe az orvosi biológiai szempontból fontos nyomelemek vizsgálata. A düsseldorfi H. Heine egyetem III. sz. Gyermekklinika Anyagcsere Laboratóriumával és a SOTE II. sz. Gyermekklinikával közös kutatási program keretében 1991. óta folytatunk humánszelén-státusra vonatkozó vizsgálatokat. A kutatási együttműködés keretében vizsgáltuk magyar és német egészséges és cukorbetegségben (diabetes mellitus) szenvedő, 5—18 éves korú gyermekek teljes szelén státusát, valamint annak változását az életkor és a földrajzi környezet függvényében.

Laboratóriumunkban aktivációs analitikai eljárást dolgoztunk ki a szelén mikrokoncentrációban történő meghatározására. A mintavételezés és előkészítés részleteit, valamint a gamma spektrometriás méréseket egy korábbi dolgozatban részletesen ismertettük¹⁰. A vérminták besugárzása a BME Tanreaktorában (100kW, termikus neutronfluxus = $1.4 \cdot 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) történt. Az atomabszorpciós spektroszkópiai méréseket Düsseldorfban végeztük.



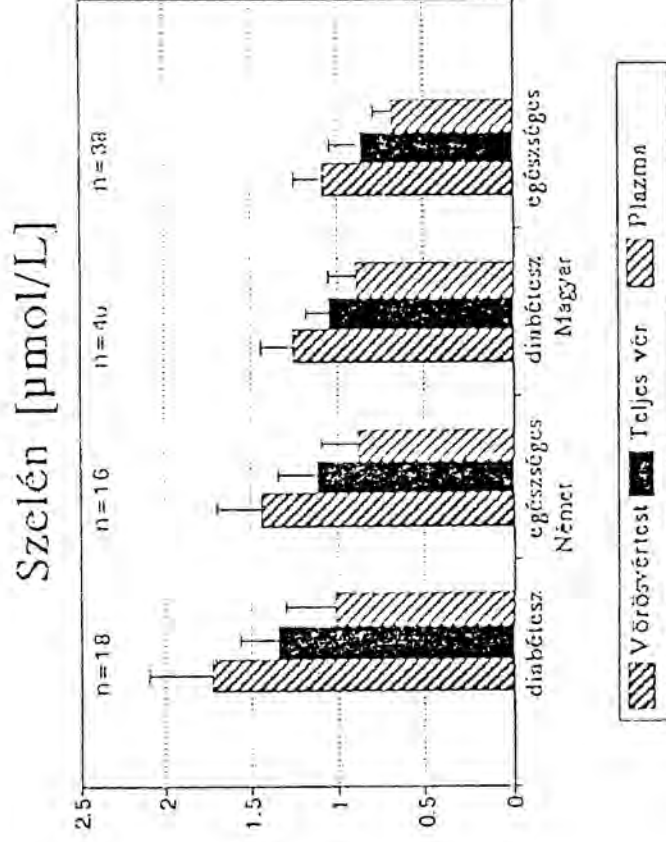
2. ábra INAA és HG-AAS módszerekkel végzett szelén-meghatározások eredményeinek összehasonlítása (22 plazma mintára)

Összehasonlító szelén méréseket végeztünk a Se-75 hosszú felezési idejű ($T_{1/2} = 120$ nap) izotópot felhasználva, ronesólásmentes neutron aktivációs analízissel (INAA) és hidrid-gerjesztéses atomabszorpciós spektroszkópiai módszerrel (HG-AAS). Az egészséges magyar gyermekek plazma mintáira kapott eredmények jó egyeztetést mutattak, az eltérés kisebb, mint 10% volt (2. ábra).

Az egészséges magyar gyermekeknél mért teljes vér, plazma és vörösvérsejt szelén tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az ugyanolyan életkorú egészséges német gyermekek értékei ($p < 0.001$).

A szelénhez kötött glutathion peroxidáz enzim aktivitása német gyermekekkel összehasonlítva szintén alacsonyabb a magyar egészséges csoportban. A teljes vér vagy a plazma szelén tartalma szorosan összefügg a szelén felvétellel (pl. táplálkozással). A kapott eredmények arra utalnak, hogy Magyarországon alacsonyabb a szelén ellátottság. Ezt alátámasztják a különböző típusú talajok, illetve néhány élelmiszer vizsgálati eredményei is^{11,12}.

Cukorbetegekben mind a magyar, mind a német csoportban magasabb szelénszintet mértünk a plazmában, vörösvérsejtből és teljes vérben, mint az egészséges gyermekekben¹³. A magyar és német egészséges ill. cukorbeteg gyermekek szelén státuszának összehasonlítása az 3. ábrán látható.



3. ábra Magyar és német egészséges ill. cukorbeteg gyermekek szelén státuszának összehasonlítása.

A cukorbetegekben mért enzim aktivitás szintén nagyobb az egészséges csoportban mért értékeknél. Megállapítottuk, hogy a földrajzi környezettől, táplálkozási szokásoktól függetlenül a cukorbetegek szelén-státusa magasabb, mint az egészségeseké. Mériési eredményeink és egyéb klinikai paraméterek összefüggésének vizsgálatán megállapítottuk, hogy cukorbetegekben a plazma glutathion peroxidáz aktivitása a plazma triglicerid értékkel pozitív, ill. a HDL-koleszterinnel negatív korrelációban van¹³. Ismereteink szerint összehasonlító hazai adatok nem állnak rendelkezésre, hasonló mérések Magyarországon nem történtek.

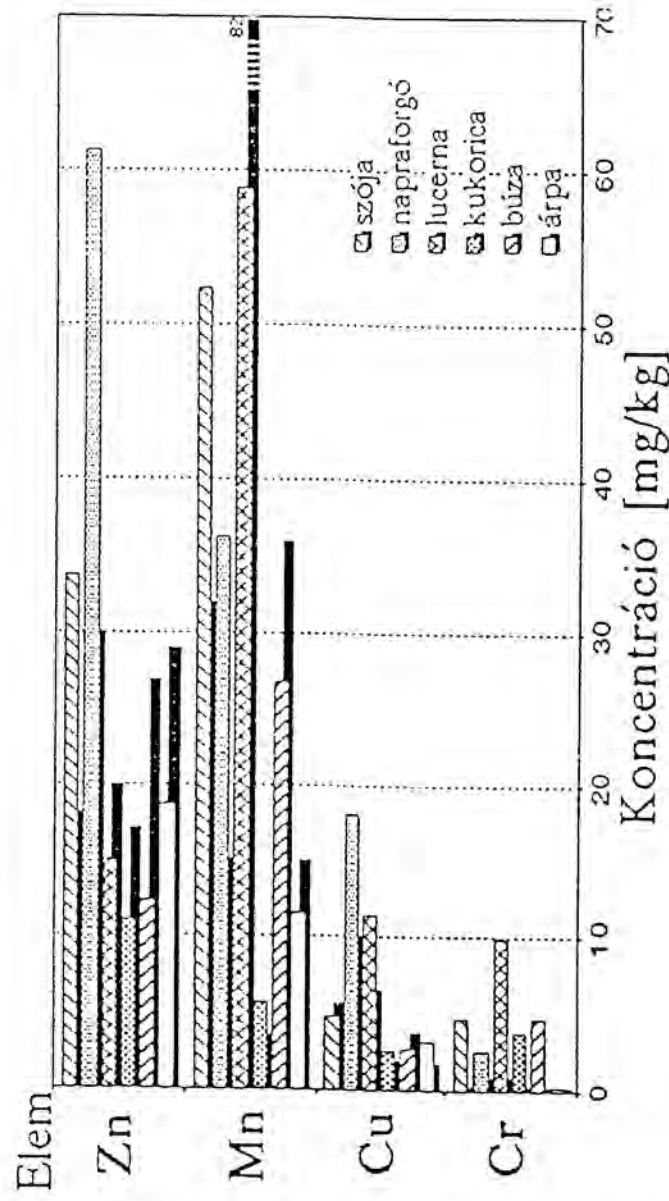
Kutatási programunkat a 2983. sz. OTKA pályázat, valamint a Magyar—Német tudományos együttműködést koordináló OMFB projekt (témaszám: 28) támogatta.

Toxikus fémek eloszlása mezőgazdasági terményekben

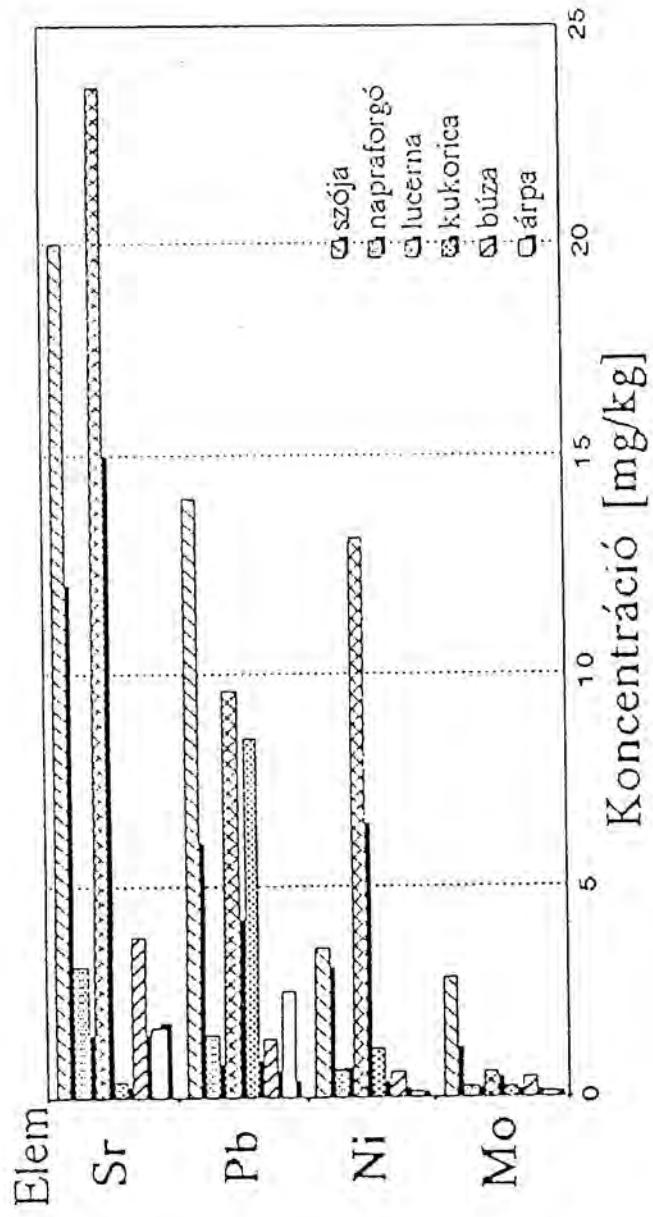
A környezetszennyezés napjainkban egyre növekvő problémát jelent. A levegő, a talaj és a vizek szennyeződése megváltoztatja a tápláléklánc nyomelemeloszlását, kibát az emberre, tehát biológiai életfolyamatainkra is. Kiemelkedő a toxikus komponensek légköri lerakódásának jelentősége és ennek a bioszférára való hatása. Számos elem carcinogén hatását igazolták már és becslések szerint a különböző betegségek mintegy 25—30%-a kedvezőtlen környezeti hatásoknak tulajdonítható. A különböző nemzetközi ajánlások, valamint hazai kutatások eredményei alapján a biológiai szervezetre, követezkésképpen a környezet állapotára kritikusnak tekinthető elemek: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Ti, V és Zn, mint toxikus fémek érdemelnek figyelmet. A nagyerzékenységű, sokelemes neutron aktivációs analitikai módszerrel a kiválasztott elemek együttes hatása pl. a megoszlási arányok, korrelációk vizsgálhatók. Következtetések vonhatók le adott emissziós források eredetire, jellemzőire vonatkozóan (pl. Br/Pb a közlekedés, az AS/Se/S arány széntüzelésű erőmű okozta szennyezésre utal).

Együttműködve az „Alapítvány a levegőszennyezettség által veszélyeztetettekért” alapítvánnyal, Tatabánya ipari körzetéből (szénbánya, erőmű, kohó, öntöde) származó aeroszol porok (<10 µm) toxikus elemtartalmát már korábban vizsgáltuk, az eredményeinket publikáltuk¹⁶. Takintettel arra, hogy a légszervi megbetegedések (amelynek egyik oka a jelentős porszennyezés) aránya igen magas ebben a körzetben, az aeroszol vizsgálatokhoz kapcsolódóan, az ipari létesítmények környékén gyűjtött néhány mezőgazdasági terményben: árpa, búza, kukorica, lucerna, napraforgó, repcse és szója, is mértük a toxikus és egyéb elemek eloszlását. A vizsgálatok célja az volt, hogy ellenőrizzük az ipari eredetű porok toxikus fémkomponensei feldúsulnak-e jelentős mértékben a különböző terményekben. Eredményeinket a 1. táblázatban foglaljuk össze. A kapott értékek arra utalnak, hogy a legtöbb terményben a Cr, Ni és Pb koncentrációja valami vel magasabb, mint az irodalomban található átlagos szintek. Más elemekre nem találtunk jelentős dúsulást. Néhány, toxikológiai szempontból fontos elem (Zn, Mn, Cu, Cr, Sr, Pb, Ni és Mo) eloszlását az egyes terményekben az irodalomban található átlagértékekkel¹⁶ összehasonlítva mutatja a 4. és 5. ábra.

Meg kell jegyezni azonban, hogy egy ilyen összehasonlítás és a környezetszennyezés mértékének becslése igen összetett problémakör és a következtetések levonása is gondos körültekintést igényel. Az eddigi mérési eredmények átfogó megállapításokat nem engednek meg, a vizsgálatokat egy kiterjesztett kutatási program keretében folytatni kell. Szükséges az ún. hazai háttérértékek meghatározása, az aeroszol komponensek mérése és mennyiségi megoszlásuk nyomomonkövetése a bioszférában biomonitorok alkalmazásával (pl. azonos talajban és környezetben nevelt standard fű és káposzta).



4. ábra Toxikus elemek eloszlása különböző terményekben az irodalomban található átlagértékekkel összehasonlítva (folytonos fekete vonal)



5. ábra Toxikus elemek eloszlása különböző terményekben az irodalombau található átlagértékekkel összehasonlítva (folytonos fekete vonal)

Toxikus és egyéb elemek eloszlása mezőgazdasági terményekben

I. Táblázat

Elem	Minta		Árpa		Búza		Kukorica		Lucerna		Napraforgó		Szója		Repce	
	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%	[mg/kg]	σ%
Na	64.60	4.2	39.20	4.4	25.80	4.7	1100.00	6.7	62.60	4.5	81.10	4.4	70.40	4.1	3800.00	5.5
K	3800.00	5.5	2400.00	6.7	3800.00	6.0	24700.00	7.5	15500.00	6.6	18900.00	6.4	10300.00	10.0	0.02	14.0
Sc	0.02	14.0	0.01	17.0	0.01	11.0	0.01	14.0	0.01	14.0	0.27	11.0	0.01	9.6	650.00	9.5
Ca	650.00	9.5	3200.00	6.3	-	11200.00	5.5	3900.00	8.2	12300.00	6.3	4100.00	8.1	151.00	8.9	0.08
Cr	0.23	11.0	4.70	7.0	3.80	7.8	9.80	11.0	2.60	7.8	4.70	8.6	2.80	7.1	11.40	5.2
Mn	11.40	5.2	26.90	4.7	5.70	9.5	58.90	9.5	36.30	4.9	52.40	5.2	47.80	4.9	0.04	9.6
Fe	69.40	17.0	71.50	9.5	51.70	13.5	62.60	11.0	77.20	12.0	112.00	15.0	151.00	8.9	0.04	9.1
Co	0.04	9.6	0.03	9.8	0.07	9.6	0.02	10.0	0.09	9.1	0.68	6.6	0.08	9.1	0.04	9.1
Ni	0.14	15.0	0.62	10.0	1.20	9.8	13.10	6.4	0.65	11.0	3.50	8.9	0.86	9.6	0.14	15.0
Cu	5.20	8.3	2.70	10.0	2.70	6.5	11.20	9.5	18.00	9.8	4.80	9.2	3.10	9.4	5.20	8.3
Zn	18.70	9.7	12.80	9.1	11.00	9.8	14.80	11.0	61.30	5.8	51.40	7.6	48.70	6.8	18.70	9.7
Se	-	-	0.04	15.0	0.03	15.0	0.23	10.0	0.15	12.0	0.21	15.0	-	-	0.03	15.0
As	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br	1.93	5.8	0.45	12.0	0.84	8.3	12.50	8.3	1.90	5.6	3.70	6.4	1.20	9.1	0.45	12.0
Rb	1.50	6.4	7.60	11.0	3.30	12.0	4.70	10.0	8.70	11.0	20.70	6.9	5.30	9.9	1.50	6.4
Sr	1.70	15.0	3.80	7.8	0.42	10.0	23.60	12.0	3.10	12.0	20.00	13.0	11.00	13.0	1.70	15.0
Mo	0.15	13.0	0.48	9.2	0.27	10.0	0.62	10.0	0.28	13.0	2.80	13.0	0.26	9.7	0.15	13.0
Ba	1.70	11.0	5.10	11.0	0.62	9.2	11.00	9.4	0.75	12.0	17.10	11.0	0.86	9.9	1.70	11.0
Cs	-	-	-	-	0.52	11.0	-	-	0.04	10.0	0.31	11.0	-	-	-	-
La	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.57	10.0	-	-	-	-
Pb	2.50	13.0	1.40	11.0	8.50	11.0	9.60	11.0	9.60	11.0	14.00	11.0	1.70	14.0	2.50	13.0
U	-	-	0.53	15.0	-	-	-	-	-	-	1.60	12.0	0.52	9.4	-	-

1. K. Schwarz, C.M. FOLTZ, J. Am. Chem. Soc., 79 (1957) 3292.
2. A.T. DIPLOCK, Biol. Trace Elem. Res., 33 (1992) 155.
3. S.E. RAPTIS, G. KAISER, G. TÖLG, Fresenius Z. Anal. Chem. 105 (1983) 316.
4. X. CEHN, G. YANG, I. CHEN, Z. WEN, K. GE, Biol. Trace Elem. Res., 2 (1980) 91.
5. H. ZUMKLEY, Biol. Trace Elem. Res., 15 (1988) 139.
6. E.B. THORLING, K. OVERVAD, J. GEBOERS, Annals of Clin. Res., 18 (1986) 3.
7. G.V. IYENGAR, Biol. Trace Elem. Res., 12 (1987) 263.
8. Á. CSER, I. SZIKLAI-LÁSZLÓ, H. MENZEL, I. LOMBECK, „Selenium Status in Hungary” megjelenés alatt.
9. I. LOMBECK, K. KASPAREK, H. HARBISCH, L.E. FEINENDEGEN, H.J. BREMER, Eur. J. Pediatr. 125 (1977) 81.
10. I. SZIKLAI-LÁSZLÓ, Á. CSER, I. LOMBECK, „3rd Int. Conf. on Nuclear and Radiochemistry”, Vienna, Austria, 7—11. Sept. 1992. In press in the „J. Radioanal. Nucl. Chem.”
11. F. GONDI, GY. PANTÓ, G. BOGYE, G. ALFTHAN, Int. Symp. on Selenium Beograd, Yugoslavia, 1991.
12. A. GERGELY, M. TEKES, K. MILOTAY, GY. BIRÓ, Prof. of the 6th Int. Trace Elem. Symp. Leipzig, Germany, 1989.
13. Á. CSER, I. SZIKLAI-LÁSZLÓ, H. MENZEL, I. LOMBECK, J. Trade Elem. Electrolytes Health Dis. (in press).
14. H. RAUSCH, R.F. BARANYAI, SZ. SÁNDOR, I. SZIKLAI-L., SZ. TÖRÖK, É.P. ZEMPLÉN, The Science of the Total Environment, 130/131 (1993) 317.
15. H. RAUSCH, I. SZIKLAI-L., S. SÁNDOR, T. SZABÓ, „3rd Int. Conf. on Nuclear and Radiochemistry”, Vienna, Austria, 7—11. Sept. 1992. In press in the „J. Radioanal. Nucl. Chem.”
16. ALINA KABATA-PENDIAS, H. PENDIAS, Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986.



IVC
SPUREN-
ELEMENTE

11. ARBEITSTAGUNG
1991

UNIVERSITÄT JENA · UNIVERSITÄT LEIPZIG

M. A. G.

Selen bei jugendlichen Diabetikern

A. Cser*, J. Laszlo-Sziklai**, H. Menzel°R. Zaß°, I. Lombeck°°
II Universitätskinderklinik Budapest*
Kernforschungsanlage Budapest**
Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf°
Universitätskinderklinik Düsseldorf°°

Beim Diabetes Mellitus Typ I kommt es zu einer Störung des Fettstoffwechsels, die zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation führt. In den β -Zellen der Pankreasinseln wurden niedrige Aktivitäten der Enzyme nachgewiesen, die vor toxischen Sauerstoffmetaboliten schützen (7). Zu diesen Enzymen zählt auch die selenabhängige Glutathionperoxidase.

Es wurden unterschiedliche Glutathionperoxidase-Aktivitäten in Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und Typ II im Vergleich zu Gesunden gefunden. Während Häglöf und Mitarb. (8) erniedrigte Spiegel bei diabetischen Kindern beschrieben, beobachtete Matkovics und Mitarb. (11) erhöhte Spiegel bei erwachsenen Diabetikern. Im Plasma wurde die Glutathionperoxidase-Aktivität bei diabetischen Erwachsenen bisher nur von Kai und Mitarb. (9) untersucht. Sie fanden erhöhte Enzymaktivitäten bei Frauen mit Typ II Diabetes mellitus.

Bei diabetischen Ratten (Streptozotozin induziert) war der Selengehalt im Plasma erhöht (2). Schwedische Autoren (4,5) fanden bei diabetischen Kindern wiederholt erhöhte Selenpiegel.

Das Ziel dieser Arbeit war die Selenkonzentration im Plasma und Vollblut sowie die Glutathionperoxidase-Aktivitäten in Plasma und Erythrozyten bei diabetischen Kindern von zwei Ländern zu untersuchen und mit den Werten gesunder Kinder zu vergleichen.

Material und Methoden

Die Studie umfaßt 40 ungarische und 18 deutsche Kinder mit Diabetes mellitus Typ I und 38 gleichaltrige gesunde ungarische Kinder aus Budapest bzw. 16 gesunde deutsche Kinder aus Düsseldorf zum Vergleich. Das Verhältnis Jungen/Mädchen war bei den gesunden und kranken Kindern nicht unterschiedlich. In der Tab.1 sind klinische Daten der Patienten wiedergegeben. Die Proben wurden morgens nüchtern von Patienten bei Routineuntersuchungen und von Gesunden bei kleinen chirurgischen Eingriffen abgenommen. Die Zustimmung der Eltern und der Ethikkommission lag vor.

KLINISCHE DATEN DIABETISCHER KINDER

	ungarische	deutsche
Anzahl (n)	40	18
Alter (Jahre)	12,9 ± 3,0	12,1 ± 2,9
Geschlecht (m/w)	22 / 18	9 / 9
Diabetesdauer (Monate)*	49,5 (19-104)	57,0 (10-135)
Kohlenhydratzufuhr (g/d)	194 ± 36	187 ± 37
Altinsulin (I.E./kgxd)	0,37 ± 0,16	0,37 ± 0,15
Verzögerungsinsulin (I.E./kgxd) *	0,61(0,23-0,82)	0,54(0,30-0,83)

Mittelwert und Standardabweichung mit Ausnahme von (*)

Median (10. Perz., 90 Perz.) Tabelle 1

4 ml EDTA-Blut wurde in Proben für Vollblut, Plasma und gewaschene Erythrozyten aufgeteilt. Die ungarischen Proben wurden auf Trockeneis verschickt. Alle Proben wurden bis zur Analyse in Düsseldorf bei -80°C aufbewahrt.

Die Messung der Selengehalte (Plasma, Vollblut) erfolgte in Doppelbestimmungen mit der Atomabsorptionsspektrometrie mit Hydridtechnik (Perkin Elmer 1100 B + MHS 20) nach schrittweiser Maßveraschung mit Salpetersäure:Perchlorsäure (5:2).

Als Referenzmaterial wurden "bovine liver" (NBS bovine liver N°1577a US Department of commerce Gaithersburg) und Seronorm(TM) (Trace Elements, Nycomed Oslo, Norway) untersucht.

	Referenzwerte	eigene Meßwerte
Bovine liver	710 ± 70 ng/g	705 ± 16 ng/g (n=10, VK=2.2%)
Seronorm(TM)	90 ug/l	91,3 ± 2,8 ug/l (n=12, VK=3,1%)

Außerdem wurde in jeder Meßserie der Selengehalt von einem Pool-Plasma bestimmt. Der Variationskoeffizient betrug 3,5% innerhalb eines Meßtages bzw. 5% von Tag zu Tag. Der Selengehalt der Erythrozyten wurde entsprechend dem Selengehalt von Plasma, Vollblut und dem roten Blutbild errechnet. Die Aktivität der Glutathionperoxidase (EC.1.11.1.9.) wurde im Plasma nach der Methode von Flohé und Günzler(3) mit tert.-Butylhydroperoxid bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurden zwei Pool-Plasmen untersucht. Der Variationskoeffizient innerhalb eines Meßtages lag bei 3,7% bzw. von Tag zu Tag bei 5,7%.

Die Aktivität der Glutathionperoxidase in Erythrozyten wurde im transformierten Hämolysat nach der Methode von Wendel (14) auch mit tert.-Butylhydroperoxid durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurden Erythrozyten-Pool-Proben gemessen. An einem Tag ergab sich ein Variationskoeffizient von 3,6% bzw. von 6,2% von Tag zu Tag.

Ergebnisse

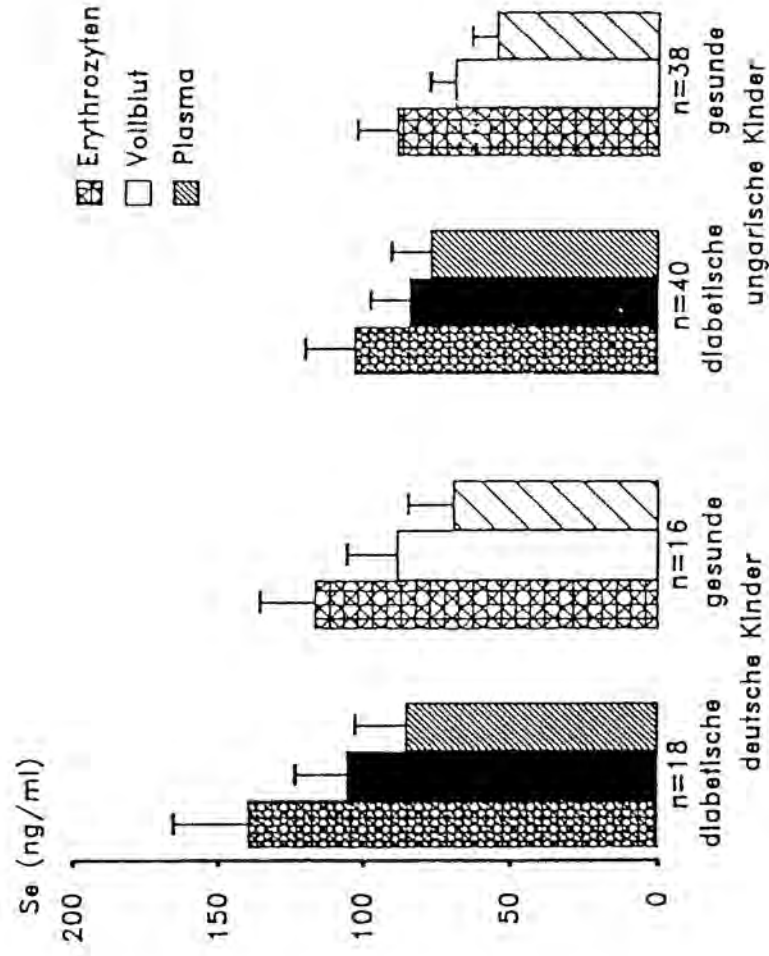
1. Bei den beiden Gruppen diabetischer Kinder aus Ungarn und Deutschland war die Alters- und Geschlechtsverteilung und die Dauer der Erkrankung gleich. Die Kohlenhydratzufuhr und der Insulinbedarf/kg Körpergewicht waren ebenfalls nicht unterschiedlich (Tabelle 1).

2. Die Selengehalte in Erythrozyten, Vollblut und Plasma (Abb.1) waren bei den deutschen diabetischen und gesunden Kindern signifikant höher als bei den ungarischen diabetischen und gesunden Kindern. In beiden Ländern zeigten die Diabetiker in allen Kompartimenten (Vollblut, Erythrozyten, Plasma) höhere Selenwerte als die entsprechenden Gesunden (Abb.1).
3. Die Glutathionperoxidase Aktivität im Plasma (Tabelle 2) war in den deutschen Proben ebenfalls höher als in den ungarischen ($p < 0,001$). Die ungarischen Diabetiker wiesen höhere Werte als die gesunden ungarischen Kinder auf ($p < 0,001$). Bei den deutschen Diabetikern war im Vergleich zu den Gesunden nur ein Trend zu höheren Werten zu beobachten ($p < 0,1$).

Glutathionperoxidase-Aktivität in Plasma (U/l) und Erythrozyten (U/g Hb) deutscher und ungarischer Kinder. (Mittelwert und Standardabweichung)

	Deutsche K.	Ungarische K.
Gesunde	Plasma 126 ± 29 (16)	95 ± 16 (36)
	Erythrozyten 6.91 ± 1.45 (15)	6.50 ± 1.01 (36)
Diabetiker	Plasma 141 ± 27 (18)	110 ± 21 (40)
	Erythrozyten 5.95 ± 1.25 (18)	6.72 ± 1.51 (40)

Tabelle 2



Selenkonzentration in Erythrozyten, Vollblut und Plasma diabetischer und gesunder deutscher bzw. ungarischer Kinder. (Mittelwert und Standardabweichung)

Signifikanz-Werte

	Diabetiker Deutsche/ Ungarn		Gesunde Deutsche/ Ungarn		Diabetische/ Gesunde/ Diab.	
	Se	p	Se	p	Se	p
Erythrozyten	Se	<0.001	Se	<0.001	Se	<0.01
Vollblut	Se	<0.001	Se	<0.001	Se	<0.01
Plasma	Se	<0.001	Se	<0.001	Se	<0.01

Abb. 1

4. Plasma-Selen und Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität waren in allen 4 Gruppen positiv korreliert ($p < 0,01$ - $p < 0,001$).
5. Die Glutathionperoxidase-Aktivität in den Erythrozyten war bei den ungarischen Kindern sowie bei den deutschen Kindern vergleichbar.

Diskussion

Unsere Ergebnisse bestätigen die der schwedischen Autoren (4,5), die bereits 1984 bei diabetischen höhere Plasma-Selenwerte gemessen hatten als bei gesunden Kindern. Wir fanden außerdem höhere Selenwerte in den Erythrozyten der Patienten. Der Selengehalt bezogen auf Ig Hämoglobin betrug durchschnittlich 413 ng bei den deutschen Diabetikern, 344 ng bei den deutschen Gesunden, 297 ng bei den ungarischen Diabetikern und 255 ng bei den gesunden Ungarn. Das Verhältnis von Vollblut-Selen zu Plasma-Selen ($Q=1,24$) war bei Diabetikern und Gesunden gleich.

Die Selenversorgung ist in Deutschland niedriger (10) als in den Vereinigten Staaten von Amerika, jedoch etwas höher als in den skandinavischen Ländern Finnland und Schweden (13). Es gibt nur wenige Daten über die Selenversorgung in Ungarn (1). Kürzlich berichtete Gondi und Mitarb. (6), daß der Selengehalt in vielen Regionen Ungarns im Boden niedrig ist. Das führt dazu, daß der Selenstatus ungarischer Kinder aus Budapest niedriger ist als der deutscher Kinder aus Düsseldorf. Es ist jedoch ungeklärt, warum die Diabetiker in beiden Ländern höhere Selenpiegel haben als die Gesunden. Die Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität zählt zu den Parametern, die bei Menschen mit einem niederen Selenstatus gut die Selenexposition widerspiegelt (12). In unserer jetzigen Untersuchung finden wir eine positive Korrelation der Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität mit dem Selengehalt. Bei den ungarischen Diabetikern war die Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität höher als bei den Gesunden, bei den

deutschen Diabetikern zeigte sich nur ein Trend zu höheren Werten gegenüber den Gesunden. Im Unterschied dazu waren jedoch die Glutathionperoxidase-Aktivität der Erythrozyten der beiden diabetischen Gruppen nicht verschieden von den Gesunden.

In weiteren Studien muß untersucht werden, warum nur die Kurzzeitparameter Plasma-Selen und Plasma-Glutathionperoxidase-Aktivität sowie die mittellangfristigen Parameter Vollblut-Selen und Erythrozyten-Selen bei den Diabetikern gegenüber Gesunden erhöht sind, jedoch nicht die Erythrozytenenzyme.

Zusammenfassung

Bei ungarischen und deutschen diabetischen Kindern wurde der Selengehalt im Plasma, Vollblut sowie die Glutathionperoxidase-Aktivität in Plasma und Erythrozyten untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen gleichalter gesunder ungarischer und deutscher Kinder verglichen. Es zeigte sich, daß insgesamt der Selenstatus aller ungarischen Kinder niedriger war als derjenige der deutschen. Der Selengehalt in Plasma und Erythrozyten sowie die Glutathionperoxidase-Aktivität im Plasma waren höher bei den diabetischen Kindern als bei den gesunden Kindern aus Ungarn bzw. Deutschland. Die Plasma-Selenwerte und die Plasma-Glutathionperoxidase korrelieren bei Gesunden und Diabetikern sowohl bei dem niederen Selenstatus in Ungarn als auch bei dem höheren Selenstatus in Deutschland. Die Erythrozyten-Glutathionperoxidase-Aktivität zeigte dagegen keine Unterschiede zwischen Diabetikern und Gesunden.

Literatur

1. Boda, M., I. Németh, (1989): Orv. Hetilap, 130, 2087-2090.
2. Dohi, T., K. Kawamura, K. Morita, H. Okamoto, A. Tsujimoto (1988): Horm. metabol. Res. 20, 671-675.
3. Flohè, L., W.A. Günzler. (1984): In: Packer L. (ed.) Methods in Enzymology Press Inc London. 105, 114-121.
4. Gebre-Medin, M., U. Ewald, L.O. Platin, T. Tuvemo (1984): Acta Paediatr. Scand. 73, 109-114
5. Gebre-Medin, M., U. Ewald, T. Tuvemo (1988): Upsala J. Med. Sci. 93, 57-62.
6. Gondi, F., Gy Panto, G. Bögye, G. Alfthan (1991): Int. Symp. on Selenium Beograd, Yugoslavia.
7. Grankvist, K., L. Marklund, I.-B. Täljedal (1981): Biochem. J., 192, 393-398
8. Hägglöf, B., S.L. Marklund, G. Holmgren (1983): Acta Endocrinol. 102, 235-239.
9. Kai, H., M. Kurasaki, K. Ito, T. Saito, K. Saito, T. Niioaka, Y. Kojima, Y. Ohsaki, H. Ide, M. Tsuji, T. Kondo, K. Kawakami (1985): Klin. Wochenschr. 63, 765-768.
10. Lombeck, I., K. Kasperek, H.D. Harbisch, L.E. Feinendegen, H.J. Bremer (1977): Eur. J. Pediatr. 125, 81-88.
11. Matkoviics, B., Sz.I. Varga, L. Szabò, H. Witas (1982): Horm. metabol. Res. 14, 77-79.
12. Steiner, G., H. Menzel, I. Lombeck, F.K. Ohnesorge, H.J. Bremer (1982): Eur. J. Pediatr. 138, 138-140.
13. Thorling, E.B., K. Overad, J. Geboers (1986): Annals of Clinical Research 18, 3-7.
14. Wendel, A. (1981): In: Jacoby W.B. (ed.) Methods in Enzymology 77, 325-333.