

## Selén v prevencii a podpornej liečbe nádorov mäkkých tkanív

### Selenium in the prevention and subsidiary therapy of cancer of soft tissues

Andrea Raganová • Andrea Gažová • Igor Tomo • Viera Kristová

Došlo 13. apríla 2018 / Prijaté 10. mája 2018

#### Súhrn

Selén ako antioxidant priťahuje pozornosť predovšetkým vďaka svojej protirakovinovej aktivite. Tento prehľad prináša pohľad na selén a jeho zlúčeniny ako látky schopné pôsobiť proti nádorom v mäkkých tkanivách. Výsledky štúdií odhaľujú významný vzťah medzi nízkou hladinou selénu v krvi a rizikom vzniku rakoviny. Selénová suplementácia je dôležitá v prevencii vzniku nádorových metastáz. V súčasnosti je snaha lepšie objasniť antikancerózný účinok selénu a poskytnúť ďalšie dôkazy terapeutického využitia doposiaľ málo preskúmaných látok obsahujúcich organické zlúčeniny selénu.

**Kľúčové slová:** selén • prevencia nádorov • liečba nádorov • mäkké tkanivá

#### Summary

Selenium as an antioxidant has attracted attention because of its anticancer activity. This review presents a view on selenium and its compounds exerting influence against cancer in the soft tissues. The results reveal a significant strong association between a low selenium level in blood and a cancer risk. Seleno-supplementation is important in the prevention of metastatic cancer. These results help to elucidate the anticancer effect of selenium providing further evidence to exploit novel anticancer agents targeting selenium-containing organic compounds.

**Key words:** selenium • cancer prevention • cancer treatment • soft tissues

#### Úvod

V posledných rokoch sa venuje zvýšená pozornosť úlohe vitamínov, stopových prvkov a iných živín v prevencii

a liečbe onkologických ochorení. Optimálny prívod antioxidantov stravou má preventívnu aj terapeutickú hodnotu, nakoľko hrá významnú úlohu v etiológii patologického procesu. Selén patrí medzi esenciálne stopové prvky. Do organizmu sa dostáva vo forme selenocysteínu, selenometionínu a anorganických solí. Doporučená denná dávka je 55 µg a tolerovaná denná horná hranica príjmu pre dospelých je 400 µg. V tele dospelého človeka nájdeme 5–15 mg selénu, vždy viazaného na tkanivové proteíny alebo vo forme selénoproteínov. Selénové výživové doplnky obsahujú organicky viazaný selén v selénových kvasinkách a selénometionín a anorganický selén vo forme seleničitanu sodného a selénanu sodného. Organická forma (v obohatených pivovarníckych kvasinkách) a syntetická forma L–selénometionínu sú zo zdravotného hľadiska považované za najlepšie a najbezpečnejšie. Selenizované kvasinky majú zvýšenú biologickú dostupnosť a zníženú úroveň neabsorbovaného selénu, ktorý je vylučovaný stolicou. Keďže anorganický selén nie je tak dobre absorbovateľný a okrem toho seleničitan sodný reaguje s vitamínom C, dochádza k následnej inhibícii jeho absorpcie.

Selén je známy svojimi antioxidantnými vlastnosťami (koenzým glutationperoxidázy). Nepriamo sa podieľa na syntéze hormónov štítnej žľazy, ktoré majú významnú regulačnú funkciu. Medzi jeho ďalšie potenciálne vlastnosti patria antiproliferačné účinky, indukcia apoptózy a modulácia hladiny androgénov. Nedostatok selénu môže narušiť syntézu hormónov štítnej žľazy, metabolizmus rastového hormónu a IGF 1 (insulin-like growth factor 1), môže taktiež spôsobiť dermatitídy, stratu nechťov či vlasov. Hlavným ukazovateľom zásobenia organizmu selénom je krvné sérum, moč, vlasy a nechty, pričom hladina selénu v krvnom sére a v moči odráža krátkodobý stav príjmu selénu potravou, množstvo selénu vo vlasoch, nechťoch a pečeni sa mení až po dlhšej dobe. Selén ako esenciálny stopový prvok je významný z hľadiska udržiavania mnohých životných funkcií v organizme. V tkanivách sa vyskytuje v organických zlúčeninách, ktoré sú viazané na selénoproteíny s aktívnym miestom selenocysteínom, ktorý moduluje biochemické procesy v bunkách a ovplyvňuje imunitný systém, tvorí podstatnú zložku antioxidantných enzýmov, ktoré chránia bunku pred agresívnym účinkom voľných radikálov a sú

MUDr. Andrea Raganová (✉) • A. Gažová • V. Kristová  
Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK  
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR  
e-mail: andrea.raganova@fmed.uniba.sk

I. Tomo  
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky  
LF UK Bratislava, SR

produkované v priebehu fyziologického oxidatívneho metabolizmu (obr. 1). Niektoré z hlavných biochemických vlastností selénu sa objavili len v posledných 5 rokoch, hoci bolo známe, že sa jedná o významný stopový prvok, už pred 40 rokmi. Účinok selénu je potenciován vitamínom E, ktorý bráni jeho stratám z organizmu a udržuje ho v aktívnej forme.

### Selén a kancerogéza

Selén výrazne ovplyvňuje funkčnosť imunitného systému, napomáha proliferatívnej odpovedi lymfocytov na stimuláciu antigénom, uľahčuje pohyb a funkciu fagocytárných buniek, nakoľko tieto závisia od hladiny selénu vo fagocytoch. Dostatočný príjem selénu umožňuje obnovenie aj starobou zníženej imunitnej funkcie buniek. Organické zlúčeniny selénu sú výraznými modifikátormi biologickej odpovede, stimulujú tvorbu rôznych cytokínov, vrátane faktorov kontrolujúcich proliferáciu buniek, pomáhajú adekvátnej funkcii T-lymfocytov, pri nízkej hladine dochádza k ich redukcii.

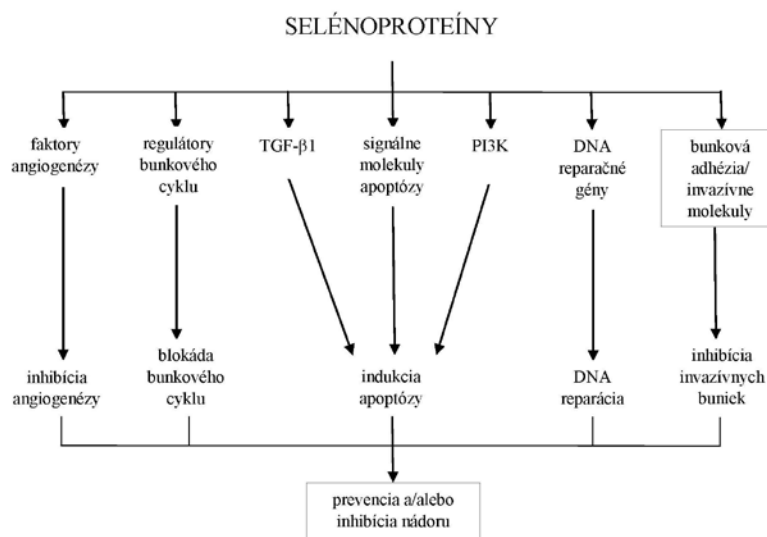
V súčasnosti sa selén dostáva do centra záujmu vedeckého bádania, nakoľko disponuje aktivitami, pri ktorých sa predpokladá nielen možné zníženie rizika vzniku rakoviny, ale aj súčinnosť v špecifickej inhibícii rastu nádorových buniek a následnej možnej pozitívnej modulácie terapie onkologických pacientov. Viaceré štúdie poskytujú dôkazy inhibičného efektu selénových zlúčenín v priebehu chemicky indukovanej kancerogézy. Selén je dôležitou súčasťou antioxidantných enzýmov, ktoré chránia bunky proti účinku voľných radikálov. Mechanizmy protirakovinového účinku selénu zahŕňajú ochranu pred oxidačným stresom, stimuláciu opravy DNA, indukciu apoptózy

v predrakovinových štádiách, zníženie reaktívnych foriem karcinogénov a pozitívne ochranné pôsobenie metabolických enzýmov. Dôležitá je priama väzba na DNA. Selén pôsobí antikarcinogénne pravdepodobne prostredníctvom selénoproteínov, bielkovín, do ktorých je selén zabudovaný vo forme selénových aminokyselín. V súčasnosti je zvýšený záujem o podrobné preskúmanie „protnádorových“ aktivít zlúčenín obsahujúce selén, ktoré sú známe z experimentov na zvieracích modeloch. Viaceré výsledky štúdií dokumentujú schopnosť selénu ovplyvniť metabolizmus, génovú expresiu, interakciu so sírou a následnú špecifickú úlohu pri vzniku rakoviny. Poznatky ostatných rokov naznačujú potenciál selénu nielen v prevencii, ale aj v terapii nádorových chorôb. Selén ako doplnok farmakoterapie, prípadne rádioterapie, zvyšuje účinnosť onkologickej liečby. Onkologická liečba, aplikujúca látky využívajúce kovy, je v súčasnosti považovaná za jednu z veľmi efektívnych stratégií, nakoľko ióny kovov sú schopné viazania sa v nukleových kyselinách s rôznou pevnosťou. Vlastnosti selénu v oblasti predchádzania nádorových ochorení sú známe dlhodobo, ale molekulárny základ zostáva naďalej nedostatočne objasnený. Poznatky mechanizmu absorpcie, distribúcie, metabolizmu a eliminácie selénu v organizme sú dôležité pre návrh liečebných stratégií pri aplikácii selénu samostatne alebo v zlúčeninách. V poslednej dobe boli v odbornej literatúre publikované viaceré práce, z ktorých vyplýva, že vplyv zlúčenín selénu na karcinogézu v klinike zatiaľ nebol potvrdený<sup>1)</sup>.

### Selén a rakovina prostaty

Epidemiologické štúdie ukazujú, že nízka hladina selénu je spojená s dysfunkciou imunitného systému a vyšším

### Signálne dráhy aktivované selénom



Obr. 1. Úloha selénoproteínov v metabolizme bunky

rizikom niektorých nádorových ochorení, vrátane karcinómu prostaty. Selén vykazuje antiproliferatívne a antiangiogénne účinky<sup>2)</sup>. U mužov s vysokým genetickým rizikovým profilom sa zistilo, že používanie výživových doplnkov obsahujúcich selén môže zmierniť riziko pokročilého štádia karcinómu prostaty, zatiaľ čo kyselina acetylsalicylová, ibuprofén a vyšší príjem zeleniny môžu zmierniť riziko nižších štádií ochorenia<sup>3)</sup>. Zdá sa však, že môže existovať U efekt v závislosti od dávky, kde veľmi vysoké hladiny selénu môžu mať nepriaznivé účinky. U osôb, ktoré majú nedostatok selénu, užívaním selénových výživových doplnkov dochádza k zvýšenej expresii selenoenzýmov, čím sa zvyšuje ochrana pred antioxidantmi, ľudia s vysokými nadbytočnými hladinami selénu nemajú prospech z príjmu selénových suplementov. Suplementácia selénu 140 µg/deň a viac po diagnostikovaní nemetastatickej rakoviny prostaty môže zvýšiť riziko úmrtia na rakovinu prostaty<sup>4)</sup>

### Úloha selénu v liečbe hepatocelulárneho a kolorektálneho karcinómu

Hepatocelulárny karcinóm patrí k nádorom s častým výskytom. Je dokázaný vzťah medzi rizikom jeho vzniku a nedostatkom selénu. U pacientov s nižšou hladinou selénu bol pozorovaný zvýšený výskyt hepatocelulárneho karcinómu. Na základe skúmania asociácie medzi hepatocelulárnym karcinómom a sérovou koncentraciou selénu a selénoproteínu P bol zistený signifikantný pokles hladín selénu a selénoproteínu P (patrí medzi hlavné selénoproteíny v krvi, predpokladá sa, že chráni bunkové membrány voči oxidačnému poškodeniu, eliminuje ióny kadmia, ortuti a transportuje selén do jednotlivých orgánov) u onkologických pacientov oproti kontrole<sup>5)</sup>. V experimentoch na myšiach, ktoré mali nedostatok selénoproteínov, bola pozorovaná hepatokarcinogéza indukovaná nitrozamínom. Výsledky štúdie naznačujú komplexnú úlohu selénu v navodení karcinogézy pečene, ktorá zahŕňa interakciu medzi selénoproteínmi, zlúčeninami selénu a toxínmi a je závislá na genotype<sup>6)</sup>. Je známe, že doxorubicín je veľmi účinný v humánnej onkologickej terapii, ale jeho klinické použitie je limitované závažnými vedľajšími účinkami. Zdá sa, že kombinácia doxorubicínu so selenocysteínom môže byť vysoko účinnou cestou na dosiahnutie antikanceróznej synergie v liečbe hepatocelulárneho karcinómu<sup>7)</sup>.

Antioxidanty chránia bunky pred poškodením a selén ako antioxidant nie je výnimkou. Je schopný v procese prevencie nádorového bujnenia zvyšovať aktivitu imunitných buniek a potláčať rozvoj cievneho zásobenia tumoru. Rakovina hrubého čreva je tretím najčastejšie diagnostikovaným nádorovým ochorením v Európe. Slovensko je v jej výskyte na nelichotivom prvom mieste v rámci štátov Európy. Na základe meraní sérových hladín selénu onkologických pacientov bolo možné určiť vzťah medzi hladinou tohto stopového prvku a rizikom kolorektálneho karcinómu, sérová koncentrácia selénu

pod 60 µg/l predstavuje nárast rizika<sup>8)</sup>. Antikancerózne účinky selénu nám umožňujú osvetliť štúdium vzťahu medzi autofágiou a apoptózou v bunkách kolorektálneho karcinómu po aplikácii seleničitanov<sup>9)</sup>.

### Zlúčeniny selénu v terapii nádorov prsníka

Na základe aplikácie výživových doplnkov so seleničitanom sodným, metylseleničitou kyselinou a selénometionínom, ako aj stravy deficitnej na selén a stravy bohatej na selén myšiam môžeme usudzovať, že výživové doplnky obsahujúce anorganické seleničitany poskytujú len krátkodobé utlmenie nádorového rastu, zatiaľ čo suplementy obsahujúce komplexy organických seleničitanov umožňujú výraznejšie obmedzenie nádorovej progresie<sup>10)</sup>. Dáta zároveň ukazujú, že organické suplementy sú schopné redukovať metastázy rakoviny prsníka, zatiaľ čo anorganické môžu skôr potencovať ich exacerbáciu. Zlúčeniny selénu by mohli byť prospešné v onkológii aj tým, že zlepšujú efektívnosť bežných chemostatík, čo bolo pozorované *in vitro* s tumorovými bunkami prsníka. Adícia selénu vo forme kyseliny seleničitej zvýšila terapeutický efekt taxolu a doxorubicínu nad úroveň účinnosti samotných látok<sup>11)</sup>. Zložitosť gémovej regulácie vytvára prekážky k presnému pomenovaniu mechanizmov, ktoré vytvárajú vzory charakteristík gémovej exprese rôznych klinických fenotypov rakoviny prsníka. Glutathion peroxidáza odbúrava jedovatý a karcinogénne pôsobiaci peroxid vodíka, je nevyhnutnou zložkou antioxidantného systému v organizme katalýzou redukcie lipoperoxidov a peroxidov vodíka. Aktivita glutathion peroxidázy závislej od selénu koreluje s endogénnou expresiou a signifikantne zvyšuje rezistenciu voči 3-butylhydroperoxidu. Berúc do úvahy špecifickú úlohu glutathion peroxidázy v procese nádorového ochorenia prsníka, výsledky naznačujú mechanizmus v následnom ovplyvňovaní onkogenézy a množení buniek karcinómu prsníka<sup>12)</sup>.

Na základe prieskumu u pacientov s karcinómom prsníka, selén spolu s relaxačnými technikami, vitamínom C a meditáciou patrí k najčastejšie používaným metódam doplnkovej a alternatívnej medicíny na potlačenie vedľajších účinkov terapie a posilnenie imunitného systému a celkovej životaschopnosti<sup>13)</sup>.

### Zlúčeniny selénu v liečbe karcinómu pankreasu

Vzťah medzi príjmom selénu a rizikom karcinómu pankreasu sa dnes stáva menej nejasným. Nedávno bola publikovaná metaanalýza, ktorá sumarizovala dôkazy z viacerých epidemiologických štúdií zaoberajúcich sa týmto vzťahom. Na jej základe môžeme predpokladať, že vyšší príjem selénu by mohol potlačiť možné riziko karcinogézy v pankrease<sup>14)</sup>. Potvrdzujú to aj výsledky metaanalýzy, ktorá hodnotila výstupy zo štúdií skúmajúcich vzťah príjmu antioxidantov a rizikom vzniku nádoru pankreasu. Tie naznačujú, že zvýšený

prijem selénu, vitamínu C a vitamínu E redukovujú riziko vzniku nádoru pankreasu<sup>15)</sup> podobne ako zvýšený príjem karoténu, luteínu, lykopenú, vitamínu C a E, selénu a zinku<sup>16)</sup>. V rámci zefektívnenia terapie nádorov pankreasu bola podrobnejšie skúmaná asociácia medzi sérovou koncentráciou selénu a medi. Výsledky boli prekvapivé, v kontrolnej skupine boli priemerné hladiny selénu a medi 76 µg/l a 1,098 µg/l, pričom boli zásadne odlišné od tých, ktoré boli namerané onkologickým pacientom – 60 µg/l a 1,432 µg/l<sup>17)</sup>.

### Selén a karcinóm pľúc

Epidemiologické štúdie poukazujú na zvýšenie rizika karcinómu pľúc medzi dospelými s nízkou hladinou selénu v krvi. V procese karcinogenézy epiteliálnych buniek bronchov u ľudí boli zistené postupne sa znižujúce hodnoty selenoproteínu P. Zdá sa, že down-regulácia tohto proteínu by mohla zohrávať kľúčovú úlohu v procese genézy karcinogénnych buniek v pľúcach<sup>18)</sup>. Selén je súčasťou enzýmu glutatión peroxidázy, ktorá, ako bolo spomenuté vyššie, patrí medzi ochranné antioxidantné mechanizmy chrániace bunku proti poškodeniu reaktívnymi peroxidmi inhibíciou a deštrukciou endotelových peroxidov a má podstatný význam pri detoxikácii produktov lipidovej peroxidázy. Sérové hladiny glutatión peroxidázy boli významne nižšie u pacientov, ktorí podstúpili chirurgickú liečbu, než u pacientov, ktorí mali už inoperabilné štádium pľúcneho karcinómu alebo metastázy<sup>19)</sup>. Látky obsahujúce selén môžu tiež modulovať liečebné účinky ionizujúceho žiarenia v tumorových líniiach a tkanivách. Selenometionín selektívne zvyšuje citlivosť k ionizujúcemu žiareniu v líniiach rakovinových pľúcnych buniek, zatiaľ čo nemá žiaden efekt na línie normálnych pľúcnych buniek<sup>20)</sup>.

### Zlúčeniny selénu v liečbe metastáz rakoviny mozgu

Poznatky posledných rokov ukazujú, že rozvoj metastáz, ktoré sú hlavnou príčinou úmrtí pri onkologických ochoreniach, môže byť čiastočne ovplyvnený diétou. V rámci štúdie s cieľom zistenia účinnosti suplementácie rôznymi zlúčeninami selénu sa zistilo, že selénom obohatené kvasnice by mohli byť cennou látkou pri potláčaní tvorby metastáz pri onkologických ochoreniach mozgu<sup>21)</sup>. Progresia tumoru v mozgu by mohla byť zmiernená špecifickými selenoproteínmi. Zlúčeniny obsahujúce selén sa javia byť efektívnejšie ako ich glykoproteínové kontroly, z čoho sa dá predpokladať, že selén by mohol byť regulátorom retardácie metastatického procesu<sup>22)</sup>.

### Záver

Výskum posledných troch dekád je upriamený na selén a jeho zlúčeniny ako na látky napomáhajúce v terapii nádorových ochorení. Selén so svojimi antioxidantnými vlastnosťami má schopnosť chrániť bunky pred

poškodením. Poznatky zo štúdií nám naznačujú, že niektoré zlúčeniny selénu by mohli byť prospešné v spomalení rastu tumoru zvyšovaním aktivity imunitných buniek a potláčaním rozvoja cievneho zásobenia nádoru. Výsledky z ostatného obdobia odhaľujú významnú asociáciu medzi nízkou sérovou hladinou selénu a vyšším rizikom vzniku onkologických chorôb. Deficit selénu v strave má za následok nedostatočnú expresiu selenových proteínov, ktoré majú protizápalové a antioxidantné účinky, ide o glutatión peroxidázu s ochranným účinkom biomolekúl pred poškodením oxidatívnym stresom a tioredoxín reduktázu, ktorá regeneruje oxidovanú kyselinu askorbovú na aktívnu antioxidantnú formu. V súčasnosti je dôležité zamerať sa na detailnejšie objasnenie protirakovinových účinkov selénu a získanie nových dôkazov na možné využitie doposiaľ málo známych antikancerózných látok – organických zlúčenín obsahujúcich selén. Použitie selénu v klinickej praxi v prevencii a liečbe onkologických ochorení zostáva doposiaľ v teoretickej rovine a ďalší výskum je v súčasnej dobe žiaduci.

**Stret záujmov:** žiadny.

### Literatúra

1. Vinceti M., Filippini T., del Giovane C., Dennert G., Zwahlen M., Brinkman M., Zeegers M.P., Horneber M., et al. Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018; 29(1): CD005195. doi: 10.1002/14651858.CD005195.pub4
2. Klein E. A., Thompson I. M. Chemoprevention of prostate cancer: an updated view. *World J Urol.* 2012; 2012;30, 189–194.
3. Loeb S., et al. Do environmental factors modify the genetic risk of prostate cancer? *Cancer epidemiology biomarkers and prevention.* 2015; 24, 213–220.
4. Kenfield S. A., Blarigan E. V., et al.: Selenium supplementation and prostate cancer mortality. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; 107, 360–367.
5. Hughes D. J., Duarte-Salles T., Hyvsiar S., Trichopoulou A., et al. Cancer risk and vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 2016; 104, 406–414.
6. Kasaikina M. V., Turanov A. A., Avanesov A., Schweizer U., et al. Contrasting roles of dietary selenium and selenoproteins in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2013; 34, 1089–1095.
7. Fan T., Zheng W., Xiaovan F., Xialing L., et al. Strategy to enhance the therapeutic effect of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma by selenocystine, a synergistic agent that regulates the ROS – mediated signaling. *Oncotarget.* 2014; 5, 2–4.
8. Lener H., Gupta S., Scott R. J., et al. Can selenium levels act as a marker of colorectal cancer risk? *BMC Cancer.* 2013; 13, 1204–1208.
9. Yang G., Hui L., Kaiyuan H., Yali C., et al. Selenite – induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cell in vitro and in vivo. *Oncology report.* 2016; 35, 1255–1264.
10. Chen J. M., Pabhu K. S., Das A., Mastro A. M. Dietary selenium supplementation modifies breast tumor growth and metastasis. *Int. J. Cancer.* 2013; 133, 2054–2064.
11. Brozmanová J. Selén a rakovina: od prevencie k liečbe. *Klin. Onkol.* 2011; 24, 171–179.
12. Kulak M. V., Cyr A. R., Woodfield G. W., Boqachek M., et al. Transcriptional regulation of the GP × 1 gene by TFAP2C and aberrant CPG methylation in human breast cancer. *Onkogene* 2013; 32, 4043–4051.

13. **Huebner J., Muendstedt K., Prott F. J., Micke O., et al.** Online survey of Patients with breast cancer on Complementary and alternative medicine. *Breast care* 2014; 9, 60–63.
14. **Wang L., Wang J., Liu X., Liu Q., Zhang G., Lianq L., et al.** Association between selenium intake and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of observational studies. *Bioscience reports* 2016; 36, 123–126.
15. **Chen J. M., Jiang W., Shao L., Zhong D., Wu Y., Cai J.** Association between intake of antioxidants and pancreatic cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2016; 67, 744–753.
16. **Han X. S., Li J., Brasky T. M., Xun P., Stevens J., et al.** Antioxidant intake and pancreatic cancer risk: the vitamins and lifestyle study. *Cancer* 2013; 119, 1314–1320.
17. **Lener M. R., Scott R. J., Wiechowska-Kozłowska A., et al.** Serum concentrations of selenium and copper in patients diagnosed with pancreatic cancer. *Cancer research and treatment* 2016; 48, 1056–1064.
18. **Tan X., Wsn Y. P., Li M. X., Chen S. H., et al.** Downregulation of selenium-binding protein 1 associated with poor prognosis in lung squamous cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 2016; 14, 1112–1119.
19. **Oh I. J., Kim H. E., Song S. Y., Na K. J., et al.** Diagnostic value of serum glutathione peroxidase 3 levels in patients with lung cancer. *Thoracic cancer* 2014; 5, 425–430.
20. **Shim S. H., Yoom M. J., Kim M., et al.** Enhanced lung cancer cell killing by the combination of selenium and ionizing radiation. *Oncol. Rep.* 2007; 17, 209–216.
21. **Wrobel J. K., Seelbach M. J., Chen L., Power R. F., Toborek M.** Supplementation with selenium-enriched yeast attenuates brain metastatic growth. *Nutr. Cancer* 2013; 65, 563–570.
22. **Wrobel J. K., Wolff G., Xiao R., et al.** Dietary selenium supplementation modulates growth of brain metastatic tumors and changes the expression of adhesion molecules in brain microvessels. *Biological trace element research* 2016; 172, 395–407.