

Uloga unosa selenija hranom u etiologiji endemske nefropatije

Klapec, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2001

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:534512>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International / Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**PREHRAMBENO TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU**

TOMISLAV KLAPEC

**ULOGA UNOSA SELENIJA HRANOM U ETIOLOGIJI
ENDEMSKE NEFROPATIJE**

DOKTORSKI RAD

OSIJEK, RUJAN 2001

UDK: 546.23:664:616.61–036.22 (043)

ZNANSTVENO PODRUČJE: Biotehničke znanosti

ZNANSTVENO POLJE: Prehrambena tehnologija

INSTITUCIJA U KOJOJ JE RAD IZRAĐEN: Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek

VODITELJICA: dr. sc. Milena L. Mandić, red. prof.

BROJ STRANICA: 94

BROJ SLIKA: 7

BROJ TABLICA: 13

BROJ PRILOGA: 1

BROJ LITERATURNIH REFERENCI: 225

DATUM OBRANE: 14. rujna 2001.

SASTAV POVJERENSTVA ZA OBRANU:

1. dr. sc. Milana Ritz, red. prof., predsjednica
2. dr. sc. Milena L. Mandić, red. prof., članica, voditeljica
3. dr. sc. Marijan Šeruga, red. prof., član

INSTITUCIJE U KOJIMA JE RAD POHRANJEN:

Knjižnica Prehrambeno tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u
Osijeku, Kuhačeva 18,

Gradska i sveučilišna knjižnica, Osijek, Europska avenija 24,

Nacionalna i sveučilišna knjižnica, Hrvatske bratske zajednice b. b., Zagreb,

Sveučilište u Rijeci, Riječke revolucije 7,

Sveučilište u Splitu, Livanjska 5.

Tema rada prihvaćena je na 2. sjednici Senata Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku održanoj 22. prosinca 1999. godine.

ULOGA UNOSA SELENIJA HRANOM U ETIOLOGIJI ENDEMSKE NEFROPATIJJE

Svrha istraživanja bila je odrediti opskrbljenost selenijem (Se) stanovništva područja u kojem se javlja endemska nefropatija (EN), i temeljem toga procijeniti njegovu ulogu u nastanku ove bolesti. Provedene su analize namirnica s endemskog i kontrolnog (u kojem nema pojave ove bolesti) područja, te utvrđena potrošnja istih korištenjem validiranog upitnika učestalosti namirnica. Prehrambene navike su ispitane u uzorku kontrolne populacije, te u tri podskupine endemske populacije: članovi obitelji u kojoj je bilo pojave EN, ispitanici u čijoj obitelji nije bilo pojave EN, te skupina pacijenata od ove bolesti. U skupini pacijenata su utvrđene značajke prehrane i unos Se koji mogu utjecati na prognozu bolesti. Nema većih razlika između kontrolne i endemske populacije u unosu osnovnih hranjivih tvari. Identični udjeli hranjivih tvari članova obitelji i pacijenata upućuju na moguću etiološku ulogu prehrambenih navika u razvoju EN i tumora mokraćnog trakta. Endemska populacija ima prosječno viši unos Se od kontrolne, pri čemu najveći dio ispitanika ima dnevni unos viši od preporučenih vrijednosti. Nepostojanje deficita Se u endemskoj populaciji ipak ne isključuje značenje ovog elementa u etiologiji EN dok se ne odredi izloženost pravom uzročniku bolesti.

KLJUČNE RIJEČI: selenij, endemska nefropatija, unos hranom, upitnik učestalosti namirnica

THE ROLE OF DIETARY SELENIUM INTAKE IN THE ETIOLOGY OF ENDEMIC NEPHROPATHY

The aim was to estimate provision of selenium (Se) to the population of area affected with endemic nephropathy (EN), and assess this as possible risk factor in the etiology of the disease. Analyses of foods from both endemic and control (with no occurrence of EN) areas, and food consumption data using a validated food frequency questionnaire, were performed. There were three subgroups of endemic population: members of families in which EN occurred, subjects with no familial occurrence of this disease, and also a group of EN patients. In the group of patients, some features of nutrition and Se intake could influence the prognosis of the disease. There are no major differences between control and endemic populations in intakes of elementary nutrients. Identical ratios between nutrients in the group of patients and the group of patients' family members could be an indication of etiological role of nutritional habits in EN and urinary tract tumours. Endemic population has a higher average Se intake compared to control population, with most subjects having dietary Se intake above recommended values. However, the lack of Se deficit in endemic population does not preclude its etiological role in EN until exposure to actual causative agents is known.

KEYWORDS: selenium, endemic nephropathy, dietary intake, food frequency questionnaire

Neizrecivo sam zahvalan voditeljici prof. dr. sc. Mileni L. Mandić kao ključnoj osobi u omogućavanju pretvorbe početne ideje istraživanja u konačni oblik rada.

Hvala i članovima Stručnog povjerenstva za ocjenu rada, prof. dr. sc. Milani Ritz, te prof. dr. sc. Marijanu Šerugi na susretljivosti i korisnim savjetima.

Također hvala dr. med. Stjepanu Čeoviću na ustupljenim informacijama i rezultatima vlastitih istraživanja o endemskoj nefropatiji.

Za pomoć u provedbi eksperimentalnog dijela rada i obradi podataka hvala Antoniji, mr. sc. Jerici Grgić, Suzani, Nataši, Vladi, dr. sc. Ljiljani Primorac, Vinku, Nataliji, Valentini & Mariu, Vedranu, Danieli... te članovima obitelji i prijateljima na 'logističkoj' podršci.

	str.
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SELENIJ – METABOLIZAM, ULOGA U LJUDSKOM ORGANIZMU, POTREBE I IZVORI	4
2.1.1. Metabolizam	4
2.1.2. Uloga u ljudskom organizmu	5
2.1.2.1. Djelovanja selenija vezana za selenoproteine	5
2.1.2.2. Ostale uloge selenija	7
2.1.2.3. Veza selenija s bolestima	8
2.1.2.3.1. <i>Virusne bolesti</i>	8
2.1.2.3.2. <i>Bolesti srca i krvnih žila</i>	9
2.1.2.3.3. <i>Rak</i>	9
2.1.2.3.4. <i>Ostale bolesti</i>	11
2.1.3. Potrebe i izvori	11
2.2. ENDEMSKA NEFROPATIJA	12
2.2.1. Opće značajke bolesti i aktualne etiološke teorije	12
2.2.2. Istraživanja veze selenija i endemske nefropatije	13
2.3. METODE PROCJENE PREHRANE U EPIDEMIOLOŠKIM STUDIJAMA	14
2.3.1. Prednosti, nedostaci i izvori grešaka metoda	15
2.3.2. Postupci provjere kakvoće metoda	20
2.3.2.1. Ispitivanje valjanosti i ponovljivosti upitnika učestalosti namirnica	23
2.4. METODE ODREĐIVANJA UKUPNOG SELENIJA U BIOLOŠKIM UZORCIMA	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. RAZVOJ UPITNIKA UČESTALOSTI NAMIRNICA	30
3.1.1. Ispitivanje valjanosti i ponovljivosti upitnika učestalosti namirnica	31
3.1.1.1. Statistička obrada	32
3.2. ISPITIVANA POPULACIJA I PROVEDBA UPITNIKA	33
3.3. OBRADA UPITNIKA I KOMPJUTORSKI PROGRAM ZA PRERAČUNAVANJE NAMIRNICA U HRANJIVE TVARI	34
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	35
3.5. KEMIJSKA ANALIZA SELENIJA U NAMIRNICAMA I TLU	35
3.5.1. Prikupljanje, čuvanje, usitnjavanje i homogenizacija uzoraka	35
3.5.2. Razaranje uzoraka smjesom kiselina	35
3.5.3. Određivanje ukupnog selenija u uzorcima hidridnom tehnikom atomskog apsorpcijskog spektrometra	36
3.5.4. Provjera kakvoće metoda	37
3.5.5. Statistička obrada	37
4. REZULTATI	38
5. RASPRAVA	56
6. ZAKLJUČCI	77
7. LITERATURA	79
8. PRILOZI	88
9. ŽIVOTOPIS	93

1. UVOD

Selenij kao esencijalni element ima velik broj bioloških funkcija u ljudskom tijelu, te je tako opskrbljenost ovim elementom važna za zdravlje ljudi. Osim već općepoznate antioksidantne uloge djelovanjem glutathion peroksidaze ^{1, 2}, selenij se nalazi u aktivnom centru tioredoksin reduktaze koja reducira nukleotide u sintezi DNA, i pomaže u održanju unutarstanične redoks ravnoteže ³. Najnovija istraživanja potvrđuju i izvanstanično antioksidantno djelovanje selenoproteina P ⁴. Također, kao selenoproteini su identificirani jodotironin 5'-dejodinaza (5'-IDI), enzim koji sudjeluje u metabolizmu štitnjače ⁵, ili selenofosfat sintetaza koja je neophodna u sintezi selenoproteina ⁶. Selenoprotein iz mitohondrijske kapsule spermija je zapravo jedan oblik glutathion peroksidaze koja nakon sazrijevanja spermija polimerizira u gradivni protein ⁷. Postoji znatno veći broj selenoproteina čija uloga nije razjašnjena, a neki učinci selenija u organizmu se ne mogu objasniti djelovanjem poznatih selenoproteina. Ovdje treba spomenuti jačanje imuniteta ⁸, ulogu u reprodukciji ⁹, zaštitu od trovanja teškim metalima ¹⁰, te manji rizik obolijevanja od raka ¹¹.

Endemska nefropatija je bolest koja se javlja u zemljopisno ograničenom području nekoliko zemalja, koje u Hrvatskoj obuhvaća jedan dio Brodske Posavine ¹². Etiologija ove bolesti je još uvijek nepoznata, ali endemske značajke upućuju na uzročnika vezanog za okoliš. Deficit selenija u svim endemskim područjima Jugoslavije naveo je neke autore na zaključak o etiološkoj ulozi nedostatne opskrbljenosti ovog elementa ¹³. Prethodna istraživanja selenija u Istočnoj Slavoniji uključuju Požešku kotlinu gdje je bilo pojave bolesti domaćih životinja uzrokovanih deficitom selenija, i utvrđena je niska količina selenija u tlu i žitaricama ¹⁴. Ustanovljen je i suboptimalni unos selenija hranom kod ljudi na uzorku stanovnika Osijeka ¹⁵. Sve navedeno je dalo poticaj ovom istraživanju, kojim bi se odredila opskrbljenost stanovništva endemskog područja selenijem. Veliki značaj statusa selenija za zdravlje ljudi, naročito s obzirom na druge vjerojatne etiološke činioce ¹⁶, mogao bi imati presudan utjecaj na rizik obolijevanja od endemske nefropatije i uz nju vezane tumore, te na samu prognozu bolesti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SELENIJ – METABOLIZAM, ULOGA U LJUDSKOM ORGANIZMU, POTREBE I IZVORI

2.1.1. Metabolizam

Apsorpcija i metabolička pretvorba ovise o kemijskom obliku elementa i statusu selenija pojedinca. Organski oblici elementa su uglavnom bolje bioraspoloživi od anorganskih zbog bolje apsorpcije, mogućnosti pohrane (npr. selenoaminokiseline koje se ugrađuju u proteine nespecifičnom zamjenom metionina selenometioninom, te cisteina selenocisteinom), te slabijeg izlučivanja bubrezima¹⁷. Očito je stoga da će omjer različitih oblika Se u pojedinoj namirnici utjecati na bioraspoloživost ovog elementa (npr. bolja bioraspoloživost Se iz pšenice gdje se najveći dio elementa nalazi u obliku selenometionina, za razliku od gljiva gdje se nalazi u anorganskim oblicima)¹⁸. U nekoliko radova je utvrđena slabija apsorpcija Se iz ribe i morskih plodova što se objašnjava kompleksiranjem sa živom u neraspoloživi oblik¹⁰. Pokazalo se da su i organski i anorganski oblici manje više jednaki u pretvorbi u biološki djelatni oblik elementa u organizmu, sudeći po aktivnosti selenoenzima^{19, 20}. Mnogi drugi sastojci hrane poput vitamina A, C, E, B₂, B₆, unosa bjelanjčevina, i dr., navodno utječu na bioraspoloživost različitih oblika Se^{17, 18}. Utjecaj unosa bjelanjčevina se u znatnoj mjeri može svesti na adekvatnost unosa metionina jer kod nedostatnog unosa ove aminokiseline više selenometionina se ugrađuje u proteine na njezinom mjestu, i time je manje Se raspoloživo za izgradnju selenoproteina^{17, 21}.

Transport Se u organizmu najvjerojatnije uključuje vezanje za albumin¹⁷, a utvrđeno je i postojanje male molekule koja nastaje prilikom crijevne apsorpcije Se, za koju se tvrdi da bi mogla imati ulogu u transportu²².

Ključni metabolit u pretvorbi anorganskih i organskih oblika Se je vodik selenid (H₂Se). Nastaje iz selenita preko selenodiglutationa (GS₂SeSG) redukcijom tiolima ili NADPH-ovisnim reduktazama²³, a isto tako može se osloboditi iz selenocisteina djelovanjem liaza. Selenometionin je, uz selenocistein, najčešći oblik Se u hrani, i on se može transsulfuracijskim mehanizmom prevesti u selenocistein. Selenocistein se, za razliku od selenometionina, nespecifično ugrađuje u proteine tek kod visokih koncentracija, ali se najčešće metabolizira pretvorbom u H₂Se. Metabolička pretvorba H₂Se može ići putem metilacije, pri čemu redom nastaju metilselenol (CH₃-SeH), dimetilselenid (CH₃-Se-CH₃), te trimetilselenonij ion [(CH₃)₃Se⁺], a moguća je i demetilacija metilselenola u H₂Se²⁴. Vodik selenid je i oblik Se koji se koristi u sintezi selenoproteina. Dosad je identificirano desetak selenoproteina kod sisavaca od kojih svi sadrže Se u obliku selenocisteina koji se u proteinski lanac ugrađuje kotranslacijskim mehanizmom pri

čemu selenocistein nastaje iz vodik selenida i serina²⁵.

Janghorbani i sur.²⁶ su predložili postojanje dva metabolička poola Se u organizmu. Prvi je tzv. izmjenjivi metabolički pool koji uključuje sve oblike Se dobivene redukcijom anorganskog selenita, preko selenida do selenoproteina, te metilirane oblike. Uloga tog poola je upravo sinteza svih organizmu važnih molekula koje sadrže Se. Drugi pool uključuje sve proteine koji sadrže selenometionin i njegova je jedina poznata uloga pohrana Se. Drugi pool može predati Se prvom poolu pretvorbom selenometionina u selenocistein koji se dalje liazama prevodi u selenid. Nasuprot tomu, povećanje drugog poola na račun prvog nije moguće.

Najvažniji put izlučivanja Se je urin s oko 50-70% elementa unesenog hranom¹⁷. Ostatak se uglavnom izlučuje fecesom, dok je izlučivanje preko kože ili respiratornim putem beznačajno. Tek kod toksičnih razina Se izlučivanje respiracijom postaje važno jer metilacijom selenida kao detoksifikacijskim mehanizmom nastaje hlapljivi dimetilselenid. Pojačana je i sinteza trimetilselenonij iona koji postaje glavni metabolit Se u urinu.

2.1.2. Uloga u ljudskom organizmu

Danas prevladava mišljenje da Se najveći dio svoje uloge u organizmu ostvaruje putem selenoproteina. Ipak, u manjoj ili većoj mjeri, poznata je uloga tek malog broja identificiranih selenoproteina. Stoga će ovdje biti dan pregled djelovanja ovog elementa s obzirom na poznate selenoproteine, ali i prema nekim uočenim djelovanjima Se na organizam koja, bar koliko se zasad zna, nisu vezana za neki od poznatih selenoproteina. Posebno poglavlje je veza Se s bolestima, mada je to ponekad teško odvojiti od uloge Se djelovanjem nekog selenoproteina, i/ili djelovanjem na imunitet, i sl.

2.1.2.1. Djelovanja selenija vezana za selenoproteine

Među najbolje proučene selenoproteine ulazi glutathion peroksidaza (GPx). Otkrivena su četiri oblika ovog antioksidantnog enzima koji se razlikuju po građi, mjestu, a donekle i načinu djelovanja. Enzimi unutarstanične lokalizacije su citosolna ili klasična GPx, fosfolipid hidroperoksidna GPx koja je vezana za stanične membrane, te gastrointestinalna GPx. Postoji još i izvanstanična ili GPx u plazmi^{1, 2}. Razlika u načinu djelovanja se zapravo odnosi na supstrate koje mogu reducirati i koji uključuju vodikov peroksid i različite organske hidroperoksidge. Time mogu značajno umanjiti štetu od lipidne peroksidacije. Za razliku od fosfolipid hidroperoksidne GPx, smatra se da klasična GPx zapravo i nije važan antioksidantni enzim nego da joj je osnovna uloga regulacija metabolizma Se, pri čemu se kod deficita ovog elementa raspoloživi Se

preusmjerava na važnije selenoproteine (npr. fosfolipid hidroperoksidna GPx ili 5'-dejodinaza). Tek kad su te metaboličke potrebe podmirene, daljnji porast koncentracije Se dovodi do sinteze ovog enzima, koji tako djeluje kao senzor statusa Se². Činjenice upućuju na zaključak da je pravo mjesto antioksidantnog djelovanja plazmatske GPx najvjerojatnije plućna tekućina i izvanstanični prostor bubrega¹.

Jodotironin 5'-dejodinaza tipa I (5'-IDI) je enzim koji prevodi tiroksin (T₄) u metabolički djelatan oblik 3,3',5-trijodtironin (T₃)⁵. Deficit Se dovodi do pada aktivnosti ovog enzima s posljedičnom promjenom odnosa T₄ : T₃ u korist T₄ u krvi. Postoji teorija da kod kombiniranog deficita I i Se, nedostatak Se zapravo štiti od štetnih učinaka deficita I smanjujući perifernu dejodinaciju T₄ i gubitak I, uz istovremeno povišenje koncentracije H₂O₂ u štitnjači što potiče sintezu tiroidnih hormona²⁷.

Selenoprotein P je najzastupljeniji oblik Se u krvi sisavaca (oko 65% Se u plazmi štakora)²⁸. Slično 5'-IDI i fosfolipidnoj GPx, i ovaj selenoprotein ima prednost sinteze pred klasičnom GPx kod nedostatka Se, što bi moglo upućivati na njegovu važnu ulogu. Hill i Burk²⁸ sugeriraju da djeluje kao izvanstanični antioksidans jer je uočeno da je zaštitni učinak Se protiv lipidne peroksidacije bolje korelirao s porastom koncentracije selenoproteina P nego s porastom aktivnosti klasične i plazmatske GPx. Novi dokazi potvrđuju antioksidantno djelovanje u plazmi⁴.

Selenij se u obliku selenocisteina nalazi u aktivnom centru još jednog enzima koji ima antioksidantno djelovanje. Riječ je o tioredoksin reduktazi (TrxR) koja reducira tioredoksin (Trx) i druge oksidirane stanične komponente, te brojne oksidanse³. Osim enzima, i Trx djeluje kao reducirajući agens u nizu važnih reakcija. Sustav Trx/TrxR se smatra neophodnim za sve rastuće stanice jer osigurava reducirajuće ekvivalente potrebne za sintezu DNA. Postoje dokazi da ima ulogu u patofiziologiji raka, kroničnih bolesti poput reumatoidnog artritisa, AIDS-a i dr., a više razine TrxR u krvi se povezuju i s otpornošću na lijekove (*VIDI Veza selenija s bolestima*)³.

Selenofosfat sintetazom 2 nastaje prekursor selenocisteina, gradivne jedinice svih selenoproteina⁶, dok je selenoprotein iz mitohondrijske kapsule spermija zapravo fosfolipid hidroperoksidna GPx koja je aktivna tijekom sazrijevanja spermija, nakon čega polimerizira u gradivni protein potreban za stabilnost i pokretljivost spermija⁷.

Utvrđeni su također brojni drugi selenoproteini čija uloga nije razjašnjena, npr. selenoprotein W s najvišom koncentracijom u mišićima, srcu i mozgu, selenoproteini iz prostate i testisa, i dr.²⁹⁻³². Budući da neki od spomenutih proteina imaju prednost sinteze kod nedostatnog unosa Se u odnosu na druge selenoproteine, to bi mogla biti naznaka njihove biološke važnosti. Burk i Hill³³ smatraju da većina selenoproteina ima antioksidantnu ulogu s obzirom na redoks svojstva selenolne skupine selenocisteina.

2.1.2.2. Ostale uloge selenija

Uočeno je da deficit Se uzrokuje slabljenje i staničnog i humoralnog imuniteta⁸. S druge strane, suplementacija selenijem (100-200 µg/dan) potiče stanične imune funkcije uključujući odgovor na stimulaciju antigenom, proliferaciju T-limfocita i njihovu diferencijaciju u citotoksične stanice, te aktivnost prirodno-ubilačkih (NK) stanica³⁴⁻³⁶. Ovi učinci Se su posredovani povećanjem ekspresije membranskih receptora za interleukin-2 koji regulira proliferaciju limfocita i diferencijaciju u citotoksične stanice. Utvrđeno je također da aktivirani T-limfociti imaju povećanu aktivnost selenofosfat sintetaze što upućuje na značaj selenoproteina za djelovanje ovih stanica⁸, dok je Taylor³⁷ analizom mRNA nekih T-limfocita ustanovio teorijsku mogućnost kodiranja selenoproteina. Dodatak Se je ujedno povisio koncentracije IgA i IgG antitijela³⁶.

Nedostatak Se dovodi do problema u reprodukciji kod domaćih i pokusnih životinja⁹, te je to potaklo ispitivanje značaja za ljude. Neki autori dovode u vezu niski status Se s ponavljanim spontanom pobačajem, mada su rezultati proturječni⁸. Uloga fosfolipid hidroperoksidne GPx u razvoju spermija objašnjava ustanovljene abnormalnosti srednjeg dijela spermija, krhkost i lom, te smanjenu pokretljivost spermija kod selenodeficitarnih pokusnih životinja^{7, 38}. Osim toga, Se ima još nedovoljno razjašnjenu ulogu u biosintezi testosterona³⁹. Dodatak Se (100 µg/dan) subfertilnim muškarcima s prethodno niskim unosom Se hranom, doveo je do povećanja pokretljivosti spermija⁴⁰ i uspješnije oplodnje⁴¹, mada ima i radova u kojima nije bilo takvih rezultata suplementacijom⁸. Kod nekih slučajeva muške neplodnosti utvrđena je visoka koncentracija Se u spermi⁹, što bi moglo biti posljedica greške u ugradnji Se u fosfolipid hidroperoksidnu GPx spermija.

Selenij pokazuje i zaštitni učinak protiv trovanja živom i drugim teškim metalima poput kadmija, bakra, arsena, olova, i dr.^{10, 42, 43}. Brojnim istraživanjima na različitim vrstama pokusnih životinja je utvrđeno da Se može spriječiti toksične učinke i anorganskih i organskih oblika Hg¹⁰. Točan mehanizam još nije poznat, ali se smatra da se neutralizacija anorganskih oblika Hg i drugih metala temelji na stvaranju spojeva sa selenidom⁴³. Zaštita od metilžive se najvjerojatnije osniva na antioksidativnom djelovanju Se⁴⁴.

Budući da se starenje povezuje s djelovanjem slobodnih radikala⁴⁵, moguće je da Se kao antioksidans može usporiti posljedične degenerativne procese i umanjiti učestalost kroničnih bolesti. Uočeno je da starenjem opada status Se⁴⁶, što slabi mehanizme zaštite od oksidativnog oštećenja. Također, smanjena je aktivnost 5'-IDI⁴⁷, pri čemu rezultirajući hipotiroidizam pogoršava mnoge od uočenih pojava tijekom starenja s obzirom na poticajno djelovanje hormona štitnjače na niz metaboličkih procesa.

Niz studija ukazuje na važnost Se za mozak ⁸. Niski status ovog elementa se povezuje sa senilnošću i ubrzanim gubitkom kognitivnih sposobnosti kod starih osoba, s Alzheimerovom bolešću, te depresijom, konfuzijom, i agresivnim ponašanjem ⁴⁸. Nasuprot tomu, suplementacija Se (ukupno oko 220 µg/dan) je značajno popravila raspoloženje i neke značajke ponašanja ispitanika ⁴⁹.

2.1.2.3. Veza selenija s bolestima

Ustanovljen je velik broj poremećaja i bolesti kod domaćih i pokusnih životinja koji su simptomi deficita Se ⁵⁰. Najčešći su reproduktivni poremećaji, zaostajanje u rastu, i tzv. 'bolest bijelih mišića'. Danas se sa sigurnošću može tvrditi da je nedostatak Se kod ljudi najvažniji etiološki činioc u razvoju kešanske (kardiomiopatija) i Kashin-Beck bolesti (osteoartropatija) ⁵¹. Kod kešanske bolesti se kao najvjerojatniji dodatni etiološki činioc navodi infekcija kardiotoksičnim coxsackie virusom ⁵², dok su kod Kashin-Beck bolesti predloženi mikotoksini, organski spojevi, nedostatak ili suvišak pojedinih elemenata, i dr. ⁵¹. Očito je riječ o međudjelovanju različitih činioca koji dovode do ovih bolesti kod stanja deficita selenija. U daljnjem tekstu je navedeno još nekoliko bolesti za koje postoje naznake važne uloge Se u etiologiji.

2.1.2.3.1. Virusne bolesti

Uočeno je da kod benignog soja coxsackie virusa u miševima s deficitom Se dolazi do mutacija genoma, te nastaje oblik virusa koji može izazvati miokarditis ⁵³. Mutacije genoma RNA-virusa najvjerojatnije nastaju uslijed deficitom selenijem uzrokovane smanjene zaštite od oksidativnih oštećenja ⁵⁴. Smatra se da se slično dešava u razvoju kešanske bolesti, te drugih bolesti čiji su uzročnici RNA-virusi, poput virusa gripe, dječje paralize, hepatitisa, HIV-a, i dr. To bi objasnilo učestalu pojavu novih sojeva virusa gripe u Kini u kojoj postoji selenodeficitarno područje, ili prijelaz HIV-a na čovjeka u selenodeficitarnom Zairu ⁵³. Taylor i sur. ^{55, 56} su također ustanovili da mnogi virusi (npr. HIV-1 i 2, coxsackie virus B3, virusi hepatitisa B i C, i dr.) imaju sposobnost sinteze selenoproteina poput GPx. Ugradnjom Se u virusne selenoproteine se zapravo iscrpljuju zalihe domaćina umanjujući njegovu sposobnost imunog odgovora. Ista skupina autora je predložila da nedostatak Se, i posljedični oksidativni stres i apoptoza (programirana smrt stanice) aktiviraju i virus. Povezanost statusa Se s napredovanjem različitih virusnih bolesti je dokazana u velikom broju radova ⁸.

2.1.2.3.2. Bolesti srca i krvnih žila

Postoji više načina na koji bi Se trebao djelovati zaštitno protiv kardiovaskularnih bolesti. Najvažnije je njegovo antioksidantno djelovanje čime se smanjuju oksidativne promjene lipida i agregacija trombocita⁸. Fosfolipid hidroperoksidna GPx redukcijom hidroperoksida fosfolipida i kolesterilestera povezanih za lipoproteine može smanjiti nakupljanje oksidiranih lipoproteina niske gustoće u stijenci arterija. Sintezom eikozanoida također nastaju hidroperoksidi čije nakupljanje u nedostatku Se inhibira prostaciklin sintetazu (prostaciklin djeluje kao vazodilatator), a stimulira proizvodnju tromboksana koji dovode do agregacije trombocita i djeluju vazokonstriktorno⁸. Uočeno je također da Se može umanjiti izravne i neizravne štetne učinke pojedinih elemenata (Tl, Cd, Hg, Pb, Ba) na kardiovaskularni sustav, te zaštititi od kardiotoksičnih učinaka nekih ksenobiotika (adriamicin), virusa (coxsackie B4), i dr.⁵⁷.

Brojnim epidemiološkim studijama nije utvrđena jasna i jednoznačna veza između statusa Se i bolesti srca i krvnih žila⁸. U Finskoj su npr. provedene dvije velike prospektivne studije, i u jednoj je utvrđen povećan rizik obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti kod koncentracije Se manje od 45 µg/l seruma⁵⁸, a u drugoj nije⁵⁹. Novije studije ponovno daju naslutiti da je veza Se s kardiovaskularnim bolestima očita samo kod niskog statusa Se⁶⁰. Neslaganje između studija se može donekle objasniti statusom drugih antioksidanata poput vitamina E, koji može zamijeniti Se u zaštiti od ateroskleroze⁸. Također, može se očekivati pad koncentracije Se već kod pacijenata s aterosklerozom (znatno prije srčanog ili moždanog udara) jer je riječ o akutnom upalnom stanju u kojem su potrebe za Se veće (*VIDI Ostale bolesti*). Stoga je bolje korištenje dugotrajnih pokazatelja statusa (npr. nokti nožnih prstiju odražavaju unos Se i godinu dana prije uzorkovanja) u ocjeni etiološke uloge Se⁶¹.

2.1.2.3.3. Rak

Temeljem brojnih istraživanja, može se zaključiti da Se djeluje antikarcinogeno na dva načina. Prvi uključuje antioksidantne enzime poput GPx i TrxR, koji spriječavaju oksidativno oštećenje DNA što je osnovni događaj u karcinogenezi, i vrijedi za količine Se koje se uobičajeno unose prehranom. Drugi način antikarcinogenog djelovanja dolazi do izražaja kod visokog unosa Se, znatno višeg od onog pri normalnoj prehrani, pri čemu nastaju metaboliti koji imaju antitumorsko djelovanje. Uočeno je također da status Se utječe na metabolizam karcinogena mijenjajući aktivnost različitih enzima, pri čemu su pozitivni učinci uglavnom vezani za unos Se koji je nekoliko puta viši od uobičajenog¹¹. Ulogu u zaštiti od raka Se vjerojatno dijelom ostvaruje i svojim djelovanjem na imuni sustav, na ekspresiju gena vezanih uz karcinogeni proces,

te utjecajem na stanični ciklus, i inhibicijom angiogeneze tumorskog tkiva^{11, 62}.

Mehanizam antitumorskog djelovanja Se je svojstven kemijskom obliku ovog elementa i na temelju brojnih ispitivanja na kulturama stanica i pokusnim životinjama identificirani su oblici koji imaju snažan učinak na karcinogenezu uz malu popratnu toksičnost²³. Selenit ima snažno antikarcinogeno djelovanje, ali je i toksičan u visokoj koncentraciji jer se tada metabolizira uz stvaranje slobodnih radikala^{63, 64}. Međuprodukt njegova metabolizma je selenodiglutation koji ima snažno antikarcinogeno djelovanje¹¹. Neki autori^{23, 65} su uočili da metilirani spojevi Se (selenobetain, selenometilselenocistein) imaju bolje kemopreventivno djelovanje od selenita uz manju toksičnost. Mehanizam njihovog djelovanja najvjerojatnije uključuje oslobađanje monometiliranih oblika poput metilselenola ($\text{CH}_3\text{-SeH}$) ili metilselenenske kiseline ($\text{CH}_3\text{-SeOH}$) koji kataliziraju reverzibilne promjene cisteinskih ostataka u aktivnim centrima važnih proteina poput transkripcijskih faktora što konačno dovodi do apoptoze²⁴. Osim toga, nukleofilna svojstva selenola bi mogla biti i temelj reakcijama demetilacije DNA, ili uklanjanja metala iz nekih proteina, koje također mogu dovesti do smrti stanica²³. Antikarcinogeni učinak je očekivano slabiji za selenoaminokiseline poput selenometionina i selenocisteina koje se mogu nespecifično ugrađivati u proteine. Aktivnost poznatih antioksidantnih selenoproteina se ne povećava preko određene gornje granice koja odgovara uobičajenim količinama u hrani (oko 0,5 mg/kg hrane)¹¹, mada se kemopreventivni učinci na pokusnim životinjama postižu tek kod 10 puta više koncentracije²³. Prevelik unos Se može i umanjiti aktivnost enzima poput 5'-IDI ili GPx⁶⁶. Tioredoksin reduktaza (TrxR) je selenoprotein koji bi mogao imati važnu ulogu u kemopreventivnim učincima Se (*VIDI Djelovanja selenija vezana za selenoproteine*). Ispitivanjima utjecaja dodatka Se kulturama tumorskih stanica, ili pokusnim životinjama, utvrđen je porast aktivnosti TrxR kod umjerenog suviška Se, te inhibicija aktivnosti kod viših doza ili produžene suplementacije selenijem^{3, 23}. Porast aktivnosti kod nižih suplementacijskih doza objašnjava se pojačanom sintezom TrxR koja svojim antioksidantnim djelovanjem poboljšava rast tumorskih stanica. Inhibicija aktivnosti TrxR kod viših doza Se, koja je u skladu s inhibicijom rasta tumorskih stanica, tumači se djelovanjem monometiliranih metabolita Se i nastankom diselenidnog mosta između metilselenenske kiseline ($\text{CH}_3\text{-SeOH}$) i selenocisteinskog ostatka u aktivnom centru, čime se enzim prevodi u inaktivni oblik²³.

Provedene su brojne epidemiološke studije u kojima je ispitivana veza statusa Se i smrtnosti od raka. Dnevni unos Se, koncentracija u krvi, i žitu, su u najvećem broju ispitivanja obrnuto povezani s učestalošću i smrtnošću od ove bolesti⁶⁷⁻⁷⁰. U prospektivnim studijama se uzima uzorak krvi ili noktiju ispitanika za analizu Se, te prati smrtnost od raka tijekom više godina. Svako oboljeloj se pridružuje zdrava osoba iz praćene skupine, koja oboljeloj odgovara po spolu, dobi, i nekim činiocima rizika poput pušenja, i sl. Dobiveni su rezultati koji

potvrđuju ⁷¹⁻⁷³, ali i oni koji pobijaju ⁷⁴⁻⁷⁶ postavku o zaštitnom djelovanju Se. Nekonzistentnost rezultata je uvjetovana nedostacima svojstvenim svim epidemiološkim studijama ⁷⁷. Stoga su za donošenje konačne ocjene o učinku Se najpouzdanije intervencijske studije u kojima velike skupine ispitanika primaju Se kao dodatak, te se prati učestalost određenih bolesti tijekom dužeg vremenskog razdoblja. U prvoj intervencijskoj studiji sa Se (200 µg/dan, Se iz kvasca) ⁷⁸, nakon prosjeka od 4,5 godina sa 1312 ispitanika, utvrđena je 37% manja učestalost, te 50% manja smrtnost od raka. Pri tome treba napomenuti da je srednji unos Se u kontrolnoj skupini bio oko 90 µg/dan što je više nego u većini europskih zemalja ⁸. Ujedno, to ukazuje i na značaj tzv. kemopreventivne razine unosa ovog elementa hranom, tj. unos koji je viši od potrebnog za optimizaciju aktivnosti selenoenzima, pri čemu nastaju aktivni metaboliti. Yu i sur. ⁷⁹ su proveli dvije suplementacijske studije. U prvoj su pratili učestalost hepatocelularnog karcinoma u skupini od 130000 ispitanika koji su Se dobivali preko selenizirane soli (15 mg Na₂SeO₃ po kg). Nakon šest godina je učestalost raka bila 35% manja u suplementiranoj u odnosu na kontrolnu skupinu. Druga studija je uključivala samo ispitanike s infekcijom virusom hepatitisa B. Nakon četiri godine dodatka 200 µg Se iz kvasca na dan, nije bilo slučajeva raka jetre u suplementiranoj skupini (113 ispitanika), za razliku od sedam slučajeva u kontrolnoj skupini (113 ispitanika) ⁷⁹.

2.1.2.3.4. Ostale bolesti

Niski unos hranom i neadekvatni status Se su dovedeni u vezu s brojnim drugim poremećajima i bolestima. Ipak, često nije jasno da li je utvrđena niža razina Se u krvi ili tkivima posljedica ili uzrok bolesti koja može utjecati na promjene prehrane, slabiju apsorpciju, ili može uključivati upalne procese i/ili oksidativni stres u kojima je povećana potreba za Se ^{80,81}.

Slično ulozi u nastanku bolesti srca i krvnih žila, Se svojim antioksidantnim djelovanjem može kontrolirati štetne međuprodukte poput reaktivnih vrsta kisika i hidroperoksida koji nastaju normalnim procesima u organizmu ⁸. Reaktivne vrste kisika (superoksid anion, hidroksilni radikal, vodikov peroksid) nastaju u respiratornom procesu, te kao sastavni dio funkcija imunog sustava ⁸². Nakupljanje hidroperoksida gore spomenutom sintezom eikozanoida potiče i proizvodnju upalnih prostaglandina i leukotriena. Stoga je logična važnost Se za sva stanja koja uključuju oksidativni stres i upalu ⁸. Dok je etiološki značaj još nerazjašnjen, dodatak Se je doveo do poboljšanja tijeka bolesti poput reumatoidnog artritisa ⁸³, pankreatitisa ⁸⁴, ili astme ⁸⁵.

2.1.3. Potrebe i izvori

Hrana je glavni izvor Se za čovjeka, pri čemu udio Se u namirnici ovisi o više čimbenika.

Udio Se biljnih namirnica u najvećoj mjeri ovisi o razini Se u tlu pri čemu postoje velike zemljopisne razlike, ali na iskoristivost ovog elementa od strane biljaka značajno utječu i padaline, pH i sastav tla⁸⁶. Koncentracija Se u životinjskim tkivima odražava udio Se u biljnoj hrani. Općenito se može reći da razina Se u namirnici korelira s udjelom bjelanjčevina namirnice⁸⁷. Poredak skupina namirnica po očekivanoj razini Se je sljedeći: iznutrice; riba i morski plodovi; jaja; meso; žitarice i proizvodi; mahunarke; mliječni proizvodi, te voće i povrće⁸⁰.

Najnovije preporuke (SAD i EU) dnevnog unosa Se su jednake za muškarce i žene i iznose 55 µg^{88,89}. Preporuke se temelje na radovima u kojima je utvrđen dnevni unos potreban za zasićenje aktivnosti plazmatske GPx^{90,91}. Očito je ipak da je takav dnevni unos, mada dovoljan za optimizaciju enzimatskog i antioksidantnog djelovanja Se, znatno ispod tzv. kemopreventivnih doza Se pri kojima ovaj element stimulira imuni sustav, ili umanjuje rizik od raka⁸.

2.2. ENDEMSKA NEFROPATIJA

2.2.1. Opće značajke bolesti i aktualne etiološke teorije

Endemska nefropatija (EN) je kronična bolest bubrega koja je prvi put opisana pedesetih godina ovog stoljeća^{12, 92}. Bolest je endemskog karaktera zato što se javlja u zemljopisno ograničenom području uz pritoke Dunava u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Jugoslaviji, Rumunjskoj i Bugarskoj⁹³.

Bolest se javlja gotovo isključivo kod seoskog stanovništva, i često su pogođeni članovi iste obitelji. Najčešće obolijevaju osobe starije od 50 godina, a također je uočena zajednička značajka svih oboljelih od najmanje 10 godina života u endemskom području⁹². Bolest počinje nastupom znakova uremije te polako napreduje. Dolazi do funkcionalnih abnormalnosti tubula prije pojave bubrežne insuficijencije⁹⁴. Među stanovništvom endemskog područja, a često upravo kod pacijenata od EN, povećana je učestalost tumora mokraćnog trakta^{92, 95}. Zemljopisna korelacija između ovih oboljenja upućuje na zajednički etiološki čimbenik.

Unatoč dugogodišnjem istraživanju, etiologija ove bolesti je još uvijek nepoznata. Endemska svojstva bolesti usmjerila su istraživanja prema identifikaciji okolišnog uzročnika. Zbog nefrotoksičnih svojstava olova i kadmija, ispitivana je njihova razina u hrani, tlu, vodi, te krvi stanovnika endemskih područja, ali uz proturječne rezultate⁹⁶. Smatra se da, ako ovi elementi i imaju ulogu u nastanku EN-a, oni sigurno nisu primarni uzročnici nego doprinose nastanku bolesti uz neke druge, važnije čimbenike⁹⁷. Feder i sur.^{93, 98} su iznijeli hipotezu po kojoj bi bunarska voda mogla sadržavati topljive aromatske ugljikovodike podrijetlom iz endemskom području bliskih naslaga ugljena (pliocenski lignit). Isti autori su ustanovili da neke od velikih

naslaga ugljena u Sloveniji i Hrvatskoj nisu vezane za endemska područja, te smatraju da je to najvjerojatnije tek jedan od etioloških činitelja. Temeljem sličnosti EN sa svinjskom nefropatijom izazvanom ohratoksinom A, predložena je i hipoteza o ovom mikotoksinu kao uzročnom agensu⁹². Ispitivanjem namirnica, krmiva, i krvi stanovnika endemskih i kontrolnih područja, pored veće učestalosti pozitivnih nalaza na ohratoksin A, utvrđene su i više razine u uzorcima iz endemskog u odnosu na kontrolno područje^{92, 99, 100}. Iako još nema definitivnih dokaza da je ohratoksin A uzročnik endemske nefropatije, gore navedeni podaci, te činjenica da je isti i karcinogen za pokusne životinje¹⁰¹ upućuju na potrebu konačnog rasvijetljavanja uloge ovog mikotoksina. Činjenica da se EN često javlja u više članova iste obitelji, potakla je skupinu bugarskih znanstvenika na ispitivanje genetskog uzroka bolesti¹⁰². Na osnovi rezultata, smatraju da je dio trećeg kromosoma označen kao 3q25, zapravo genetski marker za EN, te da postoji povećana nestabilnost na jednom dijelu trećeg kromosoma. Daljnjim istraživanjima utvrdili su da ta nestabilnost može dovesti do lomova dijelova kromosoma s onkogenima, što bi moglo objasniti čestu povezanost EN s pojavom tumora¹⁰³. Pavlović i sur.¹⁰⁴ su ustanovili da unutar obitelji oboljelih od EN postoji genetski određen nedostatak lecitin-kolesterol aciltransferaze. To može biti uzrokom funkcionalnih abnormalnosti tubula, te autori sugeriraju moguću važnost ove genetske predispozicije u nastanku EN. Kao etiološki čimbenici još su ispitivani virusi, bakterije, biljni toksini, visoke koncentracije nekih elemenata poput mangana, aluminija, te deficit mikroelemenata poput cinka^{13, 104, 105}, te naročito selenija o kojem će biti više riječi u daljnjem tekstu.

2.2.2. Istraživanja veze selenija i endemske nefropatije

U namjeri potvrde hipoteze o kroničnoj intoksikaciji teškim metalima i drugim elementima u etiologiji EN, utvrđene su vrlo niske koncentracije nekih esencijalnih elemenata, pa je to potaknulo istraživanja uloge nedostatka nekih mikroelemenata u nastanku EN¹³. Na temelju utvrđene niske koncentracije Se u tlu, namirnicama, i krvi stanovništva Jugoslavije, skupina autora^{13, 106} predlaže hipotezu o ulozi deficita selenija u nastanku EN. Neke od gore spomenutih razina Se su slične onima utvrđenim u selenodeficitarnim područjima Kine u kojima se javlja kešanska bolest¹⁰⁷. Istraživanjem kešanske bolesti utvrđeno je da Se ipak najvjerojatnije nije jedini čimbenik u nastanku bolesti (*VIDI Veza selenija s bolestim*), te Maksimović¹³ smatra da, iako deficit Se nije ograničen na endemska područja, njegovo postojanje bi moglo pogodene pojedince učiniti podložnijim djelovanju nefrotoksičnih agenasa. Ispitivanjem razine Se u žitaricama s endemskog i područja bez pojave bolesti, Mihailović i sur.¹⁰⁸ su utvrdili niske vrijednosti u oba područja što potvrđuje pretpostavku da Se nije glavni i jedini uzročnik EN. Isti

autori su utvrdili i niže razine ukupnog Se u plazmi i slabiju aktivnost plazmatske glutathion peroksidaze (GPx) pacijenata sa EN u odnosu na zdrave kontrole iz neendemskog područja, ali to se može objasniti činjenicom da se ovaj selenoenzim najvećim dijelom sintetizira upravo u bubrezima¹⁰⁹.

2.3. METODE PROCJENE PREHRANE U EPIDEMIOLOŠKIM STUDIJAMA

Među danas najčešće korištene metode u istraživanjima veze prehrane s bolestima su metode bilježenja (eng. dietary record), metoda 24-satnog prisjećanja (eng. 24-h recall), te upitnik učestalosti namirnica (eng. food frequency questionnaire).

Metode bilježenja uključuju bilježenje, i procjenu količine ili vaganje svih pojedinih namirnica (samo jestivi dio) tijekom određenog vremena, obično sedam dana ili kraće. Kod verzije metode s procjenom veličine porcije, koriste se kuhinjske mjere poput šalice, žlica, i dr., da se ispitaniku olakša određivanje količine. Za meso, kruh i slične namirnice se koriste trodimenzionalni modeli ili fotografije, a za voće i povrće se obično koristi standardna podjela na malo, srednje, ili veliko¹¹⁰. Sve do unazad par godina metoda bilježenja i vaganja (MBV) je smatrana najpouzdanijom metodom, te korištena kao najčešći 'zlatni standard' u određivanju valjanosti drugih metoda.

Metoda 24-satnog prisjećanja (24-hP) podrazumijeva popisivanje svih namirnica konzumiranih u danu prije ispitivanja. Obično zahtijeva prisustvo anketara koji pomaže ispitaniku u prvom redu kod procjene veličine porcije, koristeći modele namirnica i kućne mjere^{111, 112}.

Upitnik učestalosti namirnica (UUN) je danas najčešće korištena metoda ispitivanja prehrane u epidemiološkim studijama. Postoje upitnici koje ispitanici mogu sami popuniti, ili ih provodi anketar, te mogu biti kvalitativni (bez pitanja o veličini porcije, za svaku stavku upitnika se uzima prethodnim studijama utvrđena uobičajena veličina porcije), kvantitativni (kod kojih ispitanici biraju veličinu porcije uz korištenje modela ili fotografija), i semikvantitativni (ispitanik bira veličinu porcije koja može biti i manja ili veća od navedene srednje porcije). Upitnik procjenjuje učestalost konzumacije neke namirnice tijekom prethodno određenog perioda (od sedam dana do nekoliko godina), te se na taj način može odrediti unos neke hranjive tvari u dužem vremenskom razdoblju. Prednost UUN-a je i u relativno niskim troškovima, brzoj provedbi, te mogućnosti samostalne provedbe od strane ispitanika¹¹¹.

Posebne metode se koriste za procjenu unosa hranom hranjivih tvari čiji udio nije dan u tablicama sastava hrane, te za mikroelemente poput selenija čija količina u namirnicama pokazuje veliku ovisnost o zemljopisnom podrijetlu namirnice⁸⁰ (stoga se ne mogu koristiti tablice sastava hrane poput jedinih raspoloživih u Hrvatskoj u kojima su podaci prikupljeni iz tablica drugih

zemalja i drugih izvora ¹¹³), kao i za kontaminante. Najčešće se koriste metoda duplikata obroka (eng. duplicate diet ili portion study), te tzv. metoda tržne košare (eng. market basket method). Duplikati obroka su zapravo verzija metode bilježenja i vaganja kod koje ispitanici istovremeno odvajaju za analizu duplikat svega pojedenog i popijenog tijekom ispitivanog perioda. Metoda tržne košare se sastoji u kemijskoj analizi svih namirnica (ili samo relevantnih za ispitivani nutrijent), koje su ispitanici koristili u određenom vremenskom periodu. Potrošnja namirnica se utvrđuje jednom od metoda procjene prehrane. Na osnovi potrošnje određene namirnice i utvrđene koncentracije nutrijenta u istoj, računa se dnevni unos nutrijenta.

Povijest prehrane (eng. diet history) je metoda koja se temelji na ispitivanju svih aspekata prehrane pojedinca, te se prije koristila kao referentna metoda ^{110, 112}. Uključuje 24-hP da bi se ustanovio 'tipični menu', te uobičajene količine namirnica. Zatim ispitanik ispunjava upitnik kojim se utvrđuje učestalost konzumacije različitih namirnica, uobičajene količine i pojedinosti o pripremi namirnica i jela. Konačno, ispituju se i navike u nabavci namirnica i raspodjela među članovima obitelji. Na temelju prikupljenih podataka se razgovara s ispitanikom i uklanjaju eventualna neslaganja, te se na osnovi unosa namirnica računa unos hranjivih tvari. Ovom metodom se može dobiti prilično dobra procjena prehrane pojedinca, ali su joj nedostaci skupoća, traje dugo, i zahtijeva posebno obučenog anketara.

U rijetko korištene metode ulaze inventurna metoda (eng. inventory method ili household record), te izravno promatranje (eng. direct observation). Kod inventurne metode članovi obitelji ili kućanstva popisuju sve kupljene namirnice tijekom određenog perioda, te na kraju perioda namirnice koje nisu potrošene. Izravno promatranje prehrane ispitanika osigurava točnost kvantitativnog i kvalitativnog mjerenja svih nutrijenata, te je korištena kao referentna metoda ¹¹¹. Riječ je najčešće o vaganju svih namirnica prije posluživanja jela ispitaniku, te ostataka nakon objeda.

2.3.1. Prednosti, nedostaci i izvori grešaka metoda

Pregledom trendova u uporabi i razvijanju metoda procjene prehrane Medlin i Skinner ¹¹⁴ naglašavaju da cilj istraživanja određuje metodologiju, te da nema najbolje metode. Jednodnevne metode su dovoljno dobre za procjenu unosa skupina, npr. kod praćenja trendova u prehrani stanovništva, ili ispitivanja zemljopisnih razlika unutar jedne populacijske skupine ¹¹⁵. Međutim, za epidemiološka istraživanja veze prehrane i bolesti, potrebna je procjena uobičajenog unosa pojedinca, odnosno praćenje unosa tijekom određenog vremenskog perioda. Mjerenje uobičajene prehrane pojedinca je među najtežim zadacima koje si fiziolog može zadati jer postoji niz grešaka tijekom procjene, što može rezultirati sistematskom greškom (u literaturi na engleskom jeziku

sinonim je *bias*), ili velikim slučajnim odstupanjem¹¹⁵. Za razliku od sistematske greške, slučajna odstupanja se mogu ukloniti velikim brojem ponavljanja.

Na prvi pogled najpouzdanija metoda procjene prehrane je tzv. izravno promatranje ispitanika, iako je prilično skupa u provedbi¹¹¹. Također, sama metodologija utječe na ispitanika jer se postavlja pitanje koliko je uobičajena prehrana kad ispitanik zna da se njegova prehrana prati. Uočena je i sklonost ispitanika da žele impresionirati istraživača, te stoga mijenjaju prehranbene navike¹¹⁵. Ova metoda se obično ne provodi kod kuće nego u restoranima i sl.¹¹⁶, te je tu moguća sistematska greška zbog mogućnosti da to ne predstavlja uobičajenu prehranu.

Metode bilježenja su također podložne biasu uslijed promjena prehranbenih navika tijekom ispitivanja zbog svijesti o promatranju prehrane (ujedno možda i zbog toga što subjekti postaju svjesniji koliko zapravo jedu¹¹⁵). Smatra se također da dio promjena ponašanja potječe i od zamornosti same metode, tj. potrebe bilježenja i vaganja svega, te je moguće da ispitanici manje jedu samo iz razloga pojednostavljenja postupka (obično smanjen unos snack proizvoda i slatkiša)^{110, 111}. Bingham i sur.¹¹⁷ ipak, korištenjem biomarkera, nisu ustanovili razlike u unosu tijekom i poslije bilježenja. Metode bilježenja s procjenom veličine porcije mogu znatno precijeniti ili podcijeniti unos nutrijenata jer je sposobnost procjene veličine porcije ispitanika mala¹¹⁸. Bingham¹¹⁵ navodi da se kod procjene veličine uz pomoć modela namirnica i standardnih kuhinjskih mjera poput žlica, šalica i sl., greške uglavnom kreću od 20-50% u odnosu na stvarne vrijednosti (tj. vrijednosti dobivene referentnom metodom), pri čemu su greške za namirnice uvijek veće od grešaka za nutrijente. Stoga neki autori predložu uporabu posebnih vaga s kompjutorskim prikupljanjem podataka, te drugih metoda koje bi ispitaniku olakšale određivanje veličine porcije, uz dobivanje točnijeg rezultata^{110, 119}. Budući da kod metoda bilježenja nema izravnog nadzora ispitanika jer se metode najčešće provode kod kuće, moguće je bilježenje manje količine od stvarno konzumirane.

Svi potencijalni izvori grešaka kod metoda bilježenja vrijede i za metodu duplikata obroka, te postoji dodatni, uslijed potrebe prikupljanja duplikata svega konzumiranog. Ova se metoda danas općenito smatra nepouzdanom zbog sustavno nižih vrijednosti unosa u odnosu na druge metode^{120, 121}. Na točnost mjerenja konačno utječe i točnost kemijske analize. Točnost metode tržne košare se također temelji na kemijskoj analizi namirnica, ali i uporabljenj metodi za procjenu potrošnje namirnica.

Metoda 24-satnog prisjećanja je jeftina, brza, i manje ovisna o anketaru, te daje kvantitativnu mjeru nedavnog unosa hrane¹¹¹. Prednost ove metode je i da se temelji na kratkotrajnoj memoriji, te se stoga smatra kvalitativno i kvantitativno točnijom od metoda koje se temelje na dugotrajnoj memoriji (poput upitnika). Greške uslijed promjene ponašanja se mogu umanjiti ako se ispitanik anketira nepripremljen. Glavni nedostatak 24-hP-a je da nije mjera

uobičajene prehrane pojedinca. Ipak, ova se metoda smatra dovoljno točnom za procjenu srednje vrijednosti velikih skupina ispitanika ¹²². Da bi se dobila mjera uobičajene prehrane pojedinca, i da se ispitanici pravilno kategoriziraju prema unosu nekog nutrijenta u odnosu na referentnu metodu, potrebno je višestruko ponavljanje 24-hP-a ¹²³⁻¹²⁵.

Cilj razvoja upitnika učestalosti namirnica je instrument koji će biti jeftin, brz i provediv samostalno od strane ispitanika ¹¹¹. Najvažnija prednost UUN-a je da se odnosi na dulje vremensko razdoblje, te daje bolju sliku uobičajene prehrane pojedinca (manje slučajne greške uslijed dnevnih i sezonskih varijacija ¹²⁴), povećavajući vjerojatnost ispravnog rangiranja ispitanika (npr. u percentile unosa nutrijenta, VIDI *Postupci provjere kakvoće metoda*), te je time i veća sigurnost veze između prehrane i bolesti. Ujedno, može uključivati više ispitanika povećavajući reprezentativnost uzorka i statističku značajnost studije ¹²⁶. Prednost UUN-a u odnosu na metode bilježenja i metodu 24-satnog prisjećanja je i ta što su kod upitnika sve (ili najveći dio) namirnice kodirane, te to pojednostavljuje primjenu. Najvažniji nedostaci, pored problema vezanih za prisjećanje prehrane, naročito kod upitnika koje ispitanici popunjavaju samostalno, uključuju mogućnost izostavljanja namirnica ako nisu na popisu, probleme s procjenom veličine porcije (težnja odabira srednje porcije kod mogućnosti odabira ¹²⁷), te probleme s procjenom učestalosti konzumacije ¹¹⁵. Uspoređujući UUN i MBV, Flegal i Larkin ¹²⁸ su utvrdili da razlike između metoda u prvom redu ovise o greškama upitnika u procjeni učestalosti konzumacije (dovode do razlika u rangiranju pojedinaca prema unosu nutrijenata), te greškama u procjeni veličine porcije (dovode do razlika u srednjoj vrijednosti). Tjønneland i sur. ¹²⁹ su na osnovi svojih i rezultata drugih autora zaključili da prikupljanje detaljnijih informacija o veličini porcije (npr. pomoću fotografija, u prvom redu namirnica koje ne dolaze u 'prirodnim' mjerama veličine poput šalice, kriške, i dr.), ne popravljaju značajno valjanost upitnika u odnosu na referentnu metodu. Smatraju da bi, ukoliko se pretpostavi da je procjena veličine porcije pojedinca zadovoljavajuća, to mogao biti pokazatelj veće važnosti pravilne procjene učestalosti konzumacije za valjanost upitnika. Neki autori ¹³⁰ preporučuju provedbu UUN-a uz sudjelovanje anketara radi poboljšanja točnosti upitnika, jer je uočeno da se neke namirnice često zaboravljaju, ili ispitanici ne prepoznaju da određena namirnica ulazi u određenu kategoriju.

Kod svih metoda koje se koriste tablicama sastava hrane za preračunavanje količine namirnica u hranjive tvari, kakvoća samih tablica (ili baza podataka) je važna za dobivanje točnih podataka ¹¹¹. Uočeno je da mogu biti izvor i slučajnih i sistematskih grešaka ¹¹⁵. Primjer je sistematska greška u jedinim raspoloživim tablicama sastava hrane u Hrvatskoj gdje je količina ukupne masti dana kao zbroj udjela masnih kiselina ^{113, 131}. Često između različitih tablica postoje znatne razlike u koncentraciji pojedinih nutrijenata ovisno o načinu uzimanja uzoraka, o načinu kemijske analize hrane (npr. moguće je utvrditi i pet puta višu koncentraciju prehrambenih

vlakana ovisno o metodi analize)¹¹⁰, a mogu i izražavati iste nutrijente na različite načine, što nadalje umanjuje njihovu usporedivost. Tablice sastavljene iz više drugih baza podataka često sadrže vrijednosti koje nisu usporedive ni u samoj tablici (npr. vrijednosti za jedan nutrijent uzete iz nekoliko izvora koji su koristili različite analitičke metode ili načine izražavanja)¹³². Primjenjivost tablica znatno može umanjiti i nedostatak podataka za pojedine hranjive tvari, mada je za neke nutrijente bolje koristiti vlastite analizirane vrijednosti nego podatke iz tablica sastavljenih iz više izvora. Primorac i sur.¹³¹, na temelju svojih rezultata, čak sugeriraju da je ponekad bolje koristiti strane, kvalitetnije tablice sastava hrane, ako su nacionalne tablice sastavljene iz različitih, neusporedivih, i zastarjelih izvora. Slučajne greške upotrebom tablica proizlaze iz činjenice da se vrijednosti u tablicama osnivaju na srednjoj vrijednosti dobivenoj analizom reprezentativnog uzorka, ali se odstupanje od stvarne vrijednosti smanjuje povećanjem broja promatranja¹¹⁰.

Kodiranje tj. prevođenje namirnica i jela s obrazaca i upitnika u stavke baze podataka, također može utjecati na točnost metode. Rizik grešaka pri kodiranju je znatno veći kod metoda bilježenja i 24-hP-a u odnosu na UUN kod kojeg ispitanici biraju namirnice s popisa (svakoj stavki upitnika je već unaprijed pridružena određena stavka u bazi podataka)^{127, 130}. Uočena je znatna varijacija (i do 30%) u kodiranju iste namirnice od strane različitih istraživača¹¹¹, pri čemu su najveće greške za hranjive tvari čiji udio prilično varira u sličnim namirnicama (npr. masne kiseline)¹¹⁰.

Sve metode su podložne mogućoj sistematskoj grešci u odabiru ispitanika (tzv. fenomen 'samoodabira'), pri čemu su ispitanici koji pristaju na sudjelovanje u ispitivanju možda zainteresiraniji za svoju prehranu od prosjeka populacije^{128, 133}. Time se vjerojatno eliminira greška uslijed bilježenja manje količine od stvarno konzumirane, ali je uočeno i da su dobrovoljci skloniji pridržavanju prehrambenih preporuka (npr. viši unos povrća, manje mesa). Salvini i sur.¹³⁴ su ustanovili isto, i ovu tendenciju ispitanika smatraju teško uklonivom promjenama samog upitnika. S druge strane, Rimm i sur.¹³⁵ tvrde da razlozi za odbijanje sudjelovanja nisu vezani uz razlike u prehrani ili uz sposobnost provedbe zadatka. Bingham¹¹⁵ također navodi da greške uslijed samoodabira ispitanika nisu velike s obzirom na dobar odziv kod novačenja ispitanika za studije procjene prehrane koje se uglavnom kreću od 70-80%. Može se pretpostaviti da je 'samoodabir' ispitanika to izraženiji što je metoda zamornija u provedbi (npr. MBV ili metoda duplikata obroka). Upravo zbog toga su se i pojavile jednostavnije metode procjene prehrane poput 24-hP-a ili UUN-a koje su znatno manje naporne za ispitanika¹¹⁰. Činjenica da dobrovoljci daju točnije podatke kod ispitivanja prehrane¹³³, može dovesti do toga da se pri ispitivanju valjanosti i ponovljivosti neke metode dobiju rezultati koji precijenjuju kakvoću te metode kad bi se primijenila na manje motiviranoj populaciji. S druge strane, neki autori¹³⁶ smatraju da

referentna metoda treba biti što točnija i preciznija, što su postigli s ispitanicima iskusnim u kvantitativnom mjerenju, koji su bili i novčano nagrađeni za svoj trud. Najbolje bi bilo (na temelju preliminarnog ispitivanja s biomarkerima da se utvrdi otklon od stvarnih vrijednosti) odrediti nekakav koeficijent kojim bi se korigirale vrijednosti dobivene validiranim metodama procjene prehrane u općoj populaciji sklonoj navođenju manje količine od stvarno pojedene i/ili odstupanjima od uobičajene prehrane.

Promjene unosa s vremenom su također izvor slučajnih grešaka, jer (bar u razvijenim zemljama) prehrana znatno varira iz dana u dan te je teško vjerovati da metode koje se osnivaju na kratkom periodu daju dobru procjenu uobičajene prehrane pojedinca ¹¹⁴. Rastuće tržište namirnica dodatno komplicira probleme s obzirom na pojavu namirnica koje izgledaju isto i istog su okusa a različitog sastava, te ih ispitanik ne može razlikovati. Ove dnevne varijacije u unosu namirnica i nutrijenata ovise kako o samom ispitaniku, tako i o nutrijentu (npr. najmanje su za energiju, mast, i dr., a najveće za kolesterol, vitamine, i sl. ¹¹⁰). Radi uklanjanja utjecaja varijacija unosa s vremenom, te da se kod metoda bilježenja ili višestruke metode 24-satnog prisjećanja ispitanici pravilno rasporede u kategorije unosa nutrijenta, potreban je određen broj dana ispitivanja koji se kreće od sedam za energiju i ugljikohidrate npr., do 18 za kolesterol ¹¹⁵. Uočene su i razlike između tjednih srednjih unosa pojedinca, ali su znatno manje od dnevnih varijacija. Sezonske varijacije su minimalizirane u razvijenim zemljama za većinu hranjivih tvari osim nekih vitamina, ali treba očekivati značajna odstupanja u unosu pojedinih namirnica i nutrijenata u seoskim i nerazvijenim sredinama ¹¹⁰. Dnevne (u manjoj mjeri i tjedne i sezonske) varijacije unosa hrane su glavni izvor varijacije kod metoda bilježenja i ponavljanih 24-satnih prisjećanja ¹²⁴. Povećanje broja dana bilježenja će smanjiti dnevne varijacije, a ponavljanje metode bilježenja tijekom sva četiri godišnja doba će smanjiti sezonske varijacije, samo uz uvjet da ispitanicima provedba ne postane prezamorna. Neki autori ¹²⁷ stoga predlažu najviše dva uzastopna dana bilježenja, višestruko ponavljanih tijekom određenog perioda. Tjønneland i sur. ¹³⁷ smatraju da preopsežne metode bilježenja mogu potaknuti ili pogoršati i druge izvore greške karakteristične za metodu. Willett i sur. ¹³⁶ osim toga nisu dobili puno bolje slaganje s upitnikom uz četiri u odnosu na dva sedmodnevna MBV-a.

Navođenje manje količine od stvarno pojedene (eng. underreporting) je vrlo čest fenomen u ispitivanju prehrane, možda i češći izvor sistematske greške kod metoda bilježenja nego kod UUN-a ^{138, 139}. Sawaya i sur. ¹⁴⁰ su npr. utvrdili bolje slaganje unosa energije dobivenih 24-hP-om i UUN-om (u posebnim populacijama) od onih dobivenog MBV-om, sa stvarnom potrošnjom energije mjerenom tehnikom dvostruko označene vode, te doveli u pitanje uobičajeno davanje primata MBV-u u odnosu na druge metode. Larkin i sur. ¹⁴¹ su također izrazili sumnju u neporecivu valjanost MBV-a kao referentne metode. Rezultati radova nekih autora sugeriraju da

je underreporting češći u nekim podskupinama populacije, npr. kod pretilih osoba^{142, 143}. Kroke i sur.¹⁴² su pak ustanovili da su i uz UUN i 24-hP gotovo svi ispitanici navodili manju količinu hrane od stvarno unesene (mjereno biomarkerima), u prosjeku za 22%. Mertz i sur.¹⁴⁴ su ustanovili u prosjeku 18% niži unos energije mjereno metodom bilježenja u odnosu na unos potreban za održanje težine, pri čemu je 81% ispitanika podcijenilo svoj unos. Uporabom biomarkera, Bingham¹¹⁵ je utvrdila da je oko 20% ispitanika navodilo manju količinu od stvarno konzumirane ili 'je riječ o osobama na dugotrajnoj dijeti'. Usporedbom MBV-a, UUN-a, i biomarkera, Samaras i sur.¹³⁹ su utvrdili da se uz metode bilježenja, osim uslijed namjernog navođenja manje količine, dobivaju niže vrijednosti unosa i uslijed promjena prehrane za vrijeme trajanja studije pri čemu se navodi stvaran, ali samo privremeno smanjen unos.

Sposobnost prisjećanja prehrane može biti značajan izvor greške kod metoda koje se na njoj temelje poput 24-hP-a i UUN-a. Kod prve metode, nesposobnost ispitanika u prisjećanju što su pojeli i popili u posljednja 24 sata može biti značajan izvor greške, te Bingham^{110, 115} navodi opseg odstupanja od referentnih vrijednosti od 4-400%. Autorica tvrdi da je 24-hP naročito podložan greškama vezanim uz memoriju, mada je ukupno pripisivanje odstupanja problemima s memorijom upitno s obzirom da nisu uklonjeni ostali izvori grešaka poput procjene veličine porcije, ili dnevne varijacije, a i točnost referentne metode je samo pretpostavka. Bergman i sur.¹⁴⁵ smatraju da je precijenjivanje unosa uz UUN posljedica činjenice da se potrošnja namirnica koje se jedu rjeđe od jednom tjedno slabije pamti od namirnica koje se koriste češće. Ponavljanje nekog zadatka (npr. konzumacija namirnice) poboljšava memoriju i povećava mogućnost prisjećanja¹⁴⁶. Bergman i sur.¹⁴⁵ također tvrde da UUN nije dovoljno točan ako ispitivana populacija koristi širok opseg namirnica, naročito ako se namirnice ne jedu svaki dan (npr. u tom radu 90% namirnica se konzumira rjeđe od jednom tjedno), te smatraju da je MBV točnija metoda. Ipak, i ovakve tvrdnje se temelje na pretpostavci da je referentna metoda (MBV) bez grešaka, iako i sami autori navode da ne znaju da li prehrana bilježena tijekom tri dana predstavlja uobičajenu prehranu ispitanika, te da li su ispitanici točno naveli konzumirane namirnice¹⁴⁵. Prilagođavanje metodologije procjene prehrane saznanjima o funkcioniranju memorijskih mehanizama bi umanjilo utjecaj prisjećanja na kakvoću metoda¹¹⁴.

2.3.2. Postupci provjere kakvoće metoda

Prehrambena epidemiologija se kritizira zbog toga što ne daje konzistentne rezultate u istraživanju veze prehrane i bolesti, a po nekim autorima¹¹⁰ to je djelomice posljedica metoda procjene prehrane neodgovarajuće kakvoće.

U procjeni kakvoće neke metode na koju utječu slučajne i sistematske greške potrebno je

razmotriti njezinu preciznost i točnost ¹²⁴. Preciznost je mjera podudarnosti rezultata dobivenih ponavljanjem iste metode na istoj skupini ljudi, i izražava se kao reproducibilnost (ponovljivost) metode ¹¹². Točnost utvrđuje tendenciju metode da precijeni ili podcijeni stvarne vrijednosti, te identificira druge interferirajuće činioce. Točnost metode, koja se smatra znatno važnijom značajkom kakvoće od preciznosti ¹²⁴, se određuje njenom usporedbom s referentnom metodom, ili tzv. ‘zlatnim standardom’ u postupku nazvanom validacija (određivanje valjanosti). S obzirom da se niti za jednu od najčešće korištenih referentnih metoda procjene ne može sa sigurnošću tvrditi da određuje stvaran unos, tj. da je bez grešaka koje umanjuju njenu valjanost, ovaj proces se još naziva relativnom validacijom zato što se ispitivana metoda uspoređuje s drugom, tradicionalnijom metodom za koju se pretpostavlja da je veće valjanosti ¹²⁸. Važno je da su izvori grešaka kod ispitivane i referentne metode drukčiji jer će se u protivnom dobiti iskrivljena slika o valjanosti metoda ¹²⁷. Stoga bi uporaba biomarkera mogla postati općeprihvaćena referentna metoda ¹²⁴. Validacija upitnika učestalosti namirnica je posebna po tome što se on smatra valjanim iako ne mora nužno biti točan. Važnija je njegova sposobnost rangiranja ispitanika prema unosu nutrijenta, pri čemu se UUN smatra dovoljno dobrim za primjenu u epidemiologiji, tj. pri ispitivanju veze prehrane s bolesti, ukoliko kategorizira pojedince prema unosu hranjive tvari sukladno tzv. referentnoj metodi ^{126, 137, 142, 147-149}.

Biomarkeri ili biološki markeri potrošnje hrane su biokemijski pokazatelji koji odražavaju unos pojedine hranjive tvari (npr. koncentracija u serumu). Prednost biomarkera je u tome da daju neovisnu mjeru valjanosti metode ¹¹⁰. Naime, za razliku od svih standardnih metoda, uključujući tzv. referentne (osim izravnog promatranja), biomarkeri ne ovise o sposobnosti i kooperativnosti ispitanika. Osim toga, biomarkeri bi mogli i zamijeniti uobičajene metode. Primjer često korištenog biomarkera je dušik iz urina prikupljenog tijekom 24 sata ¹¹⁵. Ovaj biomarker je koreliran s unosom dušika uz pretpostavku da su ispitanici u ravnoteži dušika (tj. da nema nakupljanja uslijed rasta ili popravka mišićnog tkiva, ili gubitka zbog gladovanja ili ozljede). Tehnika dvostruko označene vode je općeprihvaćena kao najpouzdanija metoda određivanja ukupnog energijskog unosa, također uz pretpostavku energijske ravnoteže ispitanika ¹⁴². Ova metoda procjenjuje proizvodnju ugljičnog dioksida na temelju diferencijalnih stopa nestajanja stabilnih izotopa ²H i ¹⁸O. Uporabom biomarkera su uklonjeni mnogi izvori sistematskih grešaka karakterističnih za standardne metode, a i slučajne greške su manje, ali je poželjno i da su metode jeftine, lako izvedive, te da ne utječu na uobičajenu prehranu ¹¹⁰.

Rangiranje subjekata po unosu je dostatna mjera kakvoće procjene neke metode za epidemiološke svrhe, ali je i točnost metode (podudaranje srednjih vrijednosti ispitivane i ‘referentne’ metode) poželjno za formuliranje preporuka i usporedbu različitih studija ¹³⁴.

Za usporedbu neke metode s referentnom metodom računaju se i koeficijenti korelacije

(najčešće Pearsonovi ili Spearmanovi), obično i prije i nakon podešavanja za ukupni energijski unos ¹⁴⁹. Koeficijenti korelacije odražavaju sposobnost metode da ispravno (u odnosu na referentnu metodu) razvrsta ispitanike prema unosu hranjive tvari u kategorije, koje se onda uspoređuju s incidencijom ili rizikom obolijevanja od neke bolesti ^{124, 147}.

Reproducibilnost metode se najčešće ispituje računanjem Spearmanovih ili Pearsonovih koeficijenata korelacije ukoliko je riječ o jednom ponavljanju, te računanjem intraclass koeficijenata korelacije ako je riječ o dva ili više ponavljanja ^{135, 150, 151}.

Podešavanje za energijski unos je predloženo bar djelomice zbog težnje kompenzacije učinaka grešaka u mjerenju energijskog unosa uslijed tendencije ispitanika da navode ili manji ili viši unos hrane od stvarnog ^{136, 147}. Podešavanjem se umanjuje interindividualna varijacija za hranjive tvari koje su snažno korelirane s ukupnim energijskim unosom. Osim makronutrijenata, i nutrijenti bez energijske vrijednosti (vitamini, minerali) su korelirani s ukupnim unosom energije jer krupnije, aktivnije, i osobe koje su manje metabolički učinkovite, jedu više svega ¹⁵². U epidemiološkim studijama je stoga energijski unos važan sam po sebi, ali isto tako i u interpretaciji drugih hranjivih tvari. Willett i Stampfer ¹⁵² smatraju da se kod sirove analize (ukupan unos nekog nutrijenta nepodešen za energijski unos) pozitivna veza s bolešću precijenjuje, a podcijenjuje kod analize kod koje se nutrijent izražava u postotku unosa energije. Zbog toga preporučuju mjeru unosa nutrijenta koja je nezavisna o ukupnom energijskom unosu, tj. unos nutrijenta podešen za energijski unos regresijskom analizom. Postupak se temelji na pretpostavci da ispitanik navodi nutrijente u ispravnim proporcijama na UUN-u, iako su možda apsolutne vrijednosti netočne. Ima i suprotnih mišljenja, te Flegal i Larkin ¹²⁸ tvrde da ispitanici navode nutrijente u različitim proporcijama na upitniku u odnosu na MBV zbog kumulativnih učinaka grešaka vezanih uz faktore poput učestalosti, veličine porcije, i dr. Smatraju da zbog toga podešavanje za ukupan unos energije ima ograničenu učinkovitost u popravljaju rangiranja pojedinaca (malo povećanje koeficijenta korelacije između metoda nakon podešavanja).

Kod mjerenja unosa hranjivih tvari ili namirnica uz metode bilježenja ili višestruki 24-hP, dnevna intraindividualna varijacija je često jednaka ili veća od interindividualne varijacije ^{134, 135, 142, 153}, što umanjuje preciznost kategorizacije ispitanika prema unosu hranjive tvari, prigušuje korelaciju prehrane s fiziološkim faktorima (poput lipida u krvi), i drugim metodama, te je teže postići statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti dviju populacija ¹¹⁰. S obzirom da je riječ o slučajnim greškama one se mogu smanjiti povećanjem broja promatranja svakog pojedinca (npr. broja dana bilježenja). Radi umanjenja utjecaja intraindividualne varijacije na korelaciju između UUN-a i metoda bilježenja ili višestruko ponavljanog 24-hP-a, računa se tzv. deatenuirani koeficijent korelacije na osnovi odnosa intraindividualne i interindividualne varijance za ove metode ¹⁴⁹. Na taj način se dobija korelacija između unosa hranjive tvari

dobivene jednim ispitivanjem (UUN) s unosom dobivenim kao srednja vrijednost određenog broja dana kod metoda bilježenja i ponavljane metode 24-satnog prisjećanja.

Još jedan vrlo česti način validacije metode je ispitivanje distribucije podataka za hranjive tvari u percentile (najčešće kvartile ili kvintile), pri čemu se uspoređuju udjeli podataka u percentilima dobiveni ispitivanom u odnosu na referentnu metodu. Na taj način se može vidjeti podudarnost metoda u klasifikaciji pojedinaca ^{142, 149}. Obično se kao mjera dobrog rangiranja pojedinaca uzima visok postotak ispitanika u istom ± 1 percentilu, dok se teškom misklasifikacijom ispitanika smatra raspodjela ispitanika u ekstremne percentile (najviši unos prema najnižem unosu) ispitivanom u odnosu na referentnu metodu.

2.3.2.1. Ispitivanje valjanosti i ponovljivosti upitnika učestalosti namirnica

Relativna valjanost UUN-a se obično ispituje usporedbom s referentnom metodom ili 'zlatnim standardom' (ponavljani 24-hP ili MBV) ¹⁴². Preporučuje se korištenje metode čije su greške neovisne o greškama upitnika da se smanji vjerojatnost umjetnog povećanja koeficijenata korelacije ¹³⁵. Rimm i sur. ¹³⁵ smatraju opravdanom uporabu metoda bilježenja jer se upitnik temelji na sposobnosti pojedinca da se sjeti uobičajene učestalosti unosa tijekom prošlog perioda, dok se MBV temelji na ispitanikovo sposobnosti (i volji) da važe i zabilježi konzumiranu hranu, a ne na memoriji. Osim usporedbe srednjih vrijednosti (koja pokazuje točnost upitnika u odnosu na 'referentnu' metodu), obično se računaju koeficijenti korelacije (prije i nakon podešavanja za ukupni energijski unos i deatenuacije) upitnika s referentnom metodom ¹⁴⁹. Upitnik se validira i ispitivanjem raspodjele ispitanika u kategorije prema unosu hranjivih tvari u odnosu na referentnu metodu. Reproducibilnost upitnika se ispituje njegovim ponavljanjem na istim ispitanicima, te računanjem srednjih vrijednosti i koeficijenata korelacije. Ovisno o vremenskom razmaku između ponavljanja razlikuje se kratkotrajna (do nekoliko mjeseci) i dugotrajna (od jedne do nekoliko godina) reproducibilnost ¹³³.

Višestrukim ponavljanjem 24-satnog prisjećanja se uklanja većina grešaka karakterističnih za metodu, te se u posljednje vrijeme sve češće koristi za validaciju UUN-a ^{125, 130, 142, 154}. U većini radova nisu uočene sustavno niže ili više vrijednosti upitnikom. Jednokratnom provedbom 24-satnog prisjećanja, Bull i Wheeler ¹⁵⁵ su utvrdili niže vrijednosti uz 24-hP u odnosu na UUN i MBV. Na temelju pregleda radova koji su uspoređivali 24-hP s metodom bilježenja ¹¹⁰, u više od polovice radova je utvrđena niža vrijednost uz metodu prisjećanja, na temelju čega autorica zaključuje da ova metoda sustavno teži podcijeniti stvaran unos. Sawaya i sur. ¹⁴⁰ su pak utvrdili bolje slaganje 24-hP-a nego MBV-a s rezultatima dobivenim biomarkerima. Uspoređujući UUN, MBV, i 24-hP za određivanje vitamina A, Russell-Briefel i sur. ¹⁵⁶ su utvrdili najvišu vrijednost

uz UUN, a najnižu uz trodnevni MBV. Ustanovili su također da se slaganje metoda popravljiva višestrukim ponavljanjem MBV-a i 24-hP-a. To se objašnjava smanjenjem utjecaja dnevnih varijacija unosa, te smatraju da je korištenje UUN-a, s obzirom da se odnosi na duže vremensko razdoblje, bolje za određivanje unosa hranjive tvari čiji dnevni unos znatno varira uslijed neredovite konzumacije namirnica s visokom koncentracijom tog nutrijenta.

Usporedbom MBV-a kao referentne metode, s UUN-om su u najvećem broju slučajeva ustanovljene više vrijednosti uz upitnik^{128, 141, 145, 153, 155 134, 151}, mada je u nekim studijama UUN dao i niže vrijednosti u odnosu na MBV^{129, 135, 157}. Jedan od najpouzdanijih radova u kojem je ispitivana valjanost semikvantitativnog UUN-a je usporedio jednogodišnji MBV s upitnikom koji se odnosio na isti vremenski period¹⁴⁷. Obje metode su dale slične rezultate (razlike srednjih vrijednosti ne veće od 10% za većinu hranjivih tvari), pa autori smatraju da se upitnikom može dobiti dobra procjena srednjeg unosa skupine, tj. da je dovoljno točan. Slično je utvrđeno u drugim radovima^{127, 136, 148, 149}.

Uspoređujući UUN i višestruko ponavljani 24-hP, Kroke i sur.¹⁴² su utvrdili opseg koeficijenata korelacije (podešeni za energiju i deatenuirani) od 0,54-0,86 što je u opsegu mnogih drugih validacijskih studija provedenih uglavnom uz MBV ili višestruki 24-hP kao standarde^{125, 127, 135-137, 148, 149, 151, 154, 157}, te zaključuju da UUN ima prihvatljivu relativnu valjanost za ispitivanu populaciju iako je underreporting dokazan kod gotovo svih ispitanika. Osim toga, dobiveni koeficijenti korelacije su slični vrijednostima koje se dobiju za većinu bioloških determinanti bolesti mjerenih u određenom vremenskom razmaku (npr. koeficijent korelacije za reproducibilnost mjerenja serumskog kolesterola je 0,65, ili za sistolički krvni tlak 0,61)^{146, 147}. Na temelju toga se može pretpostaviti da je upitnik s takvim koeficijentima korelacije pri ispitivanju valjanosti i ponovljivosti, dovoljno točan i precizan za procjenu veze prehrane s neakvim zdravstvenim poremećajem. Neki autori^{141, 153, 156} su na osnovi niskih koeficijenata korelacije, bez podešavanja za ukupni energijski unos i deatenuacije, zaključili da UUN i MBV ne rangiraju ispitanike na sličan način. Nakon podešavanja za ukupan energijski unos, Flegal i Larkin¹²⁸ su na istim podacima dobili puno bolje koeficijente korelacije, slične većini drugih studija. Pietinen i sur.¹⁵¹ su pak utvrdili minimalan utjecaj podešavanja za ukupan energijski unos, ali zato znatno poboljšanje korelacije nakon deatenuacije. Usporedbom detaljnog kvantitativnog upitnika (s fotografijama za procjenu veličine porcije)¹⁵¹ s kvalitativnim UUN-om¹⁵⁷, ista skupina autora je utvrdila da se kvantitativnim UUN-om dobije bolje slaganje vrijednosti za pojedince s referentnom metodom (veća valjanost), dok je kvalitativni upitnik bio neznatno reproducibilniji. Primijetili su i da se ponavljanjem upitnika dobije bolje slaganje srednjih vrijednosti sa MBV-om i bolji koeficijenti korelacije, slično nalazima drugih autora^{134, 136}. Objašnjavaju to time da ispitanici možda imaju bolju sliku o svojoj prehrani nakon prve primjene

upitnika, odnosno da su vještiji u procjeni unosa hrane, naročito ako su sudjelovali u metodi bilježenja i vaganja. Osim toga, bolja korelacija nastaje i zbog matematičkih razloga za namirnice s većom interindividualnom varijansom (namirnice koje se ne jedu često imaju manju interindividualnu varijancu) ¹³⁴.

Riboli i sur. ¹³³ su dobili znatno bolje koeficijente korelacije kratkotrajne reproducibilnosti (2-3 mjeseca) za hranjive tvari u odnosu na dugotrajnu reproducibilnost (2-5 godina). Osim pretpostavke da bolje slaganje između upitnika popunjenih u razmaku od nekoliko mjeseci odražava utjecaj sezone, smatraju i da su možda stvarne promjene u prehranbenim navikama tijekom vremena utjecale na dugotrajnu reproducibilnost. Colditz i sur. ¹⁴⁶ su ustanovili da što je veća učestalost korištenja neke namirnice, to je reproducibilnost upitnika bolja. Pietinen i sur. ¹⁵⁷ su utvrdili da je najbolje slaganje između ponavljanja upitnika bilo za namirnice koje se ili jedu svakodnevno (krumpir), ili se ne jedu često (iznutrice). Istovremeno, ispitujući utjecaj dobi, tjelesne mase, pušenja, i unosa alkohola na mjerenje unosa hranjivih tvari UUN-om, utvrđeno je da je reproducibilnost upitnika neznatno manja samo kod ispitanika s visokim unosom alkohola ¹⁴⁶.

Usporedbom rangiranja ispitanika po unosu hranjive tvari uz upitnik i referentnu metodu, većinom se smatra da upitnik dobro klasificira ispitanike ako se 60-70% ispitanika nalazi u istoj $\pm$ 1 percentilnoj kategoriji u odnosu na referentnu metodu ^{125, 127, 135-137, 151, 156, 157}. Usporedbom jednodnevne metode bilježenja s procjenom veličine porcije i UUN-a, provedenih u razmaku od tri godine, dobiveno je također prilično dobro slaganje metoda u raspodjeli ispitanika po unosu hranjive tvari, pri čemu je (za većinu nutrijenata) otprilike 60% ispitanika bilo u istoj $\pm$ 1 kategoriji ¹²⁶.

2.4. METODE ODREĐIVANJA UKUPNOG SELENIJA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Selenij je u biološkim materijalima često prisutan u vrlo malim količinama. Stoga je razumljiva potreba za pouzdanim i osjetljivim metodama. Na kakvoću analize ujedno uvelike utječe plan pokusa koji uključuje sve znanstvene i statističke čimbenike, kao i prikupljanje uzoraka, pohranu i rukovanje uzorcima prije i tijekom pripreme mjerenja, a na samo mjerenje utječe vještina analitičara i postupci nadzora kakvoće ¹⁵⁸.

Uzorkovanje, pohrana i priprema uzoraka moraju biti takvi da se izbjegne kontaminacija uzorka i/ili gubitak elementa. Kod uzimanja uzorka je najvažnije osigurati reprezentativnost i homogenost materijala koji se ispituje. Materijal posuda za čuvanje, površina dodira s uzorkom, te ionski sastav i pH vodenih otopina uzorka su važni u procesima desorpcije i adsorpcije Se ^{159, 160}.

Desorpcija Se se može minimizirati pranjem plastičnih i staklenih posuda sa 10%-tnom dušičnom kiselinom, i ispiranjem deioniziranom vodom. Adsorpcija Se iz otopine se obično spriječava dodatkom kiseline ¹⁶⁰. Kruti uzorci se mogu čuvati duboko zamrznuti, te osušeni ili liofilizirani. Liofilizacijom i sušenjem u običnom sušioniku na temperaturama ispod 120°C ne dolazi do gubitaka Se.

Svi postupci pripreme zahtijevaju prethodno razaranje organske tvari uzoraka. Glavni principi metoda koje se primjenjuju su: vlažno razaranje u otvorenim i zatvorenim sustavima, suho razaranje fuzijom i spaljivanje u mufolnoj peći, sagorijevanje u kisiku pri običnom ili povišenim pritiscima, te razaranje u plazmi kisika ¹⁵⁹. Vlažno razaranje podrazumijeva spaljivanje organske tvari zagrijavanjem s kiselinama. Neki spojevi Se otporni na djelovanje kiselina (npr. selenometionin, selenocistein, i trimetilselenonij ion) zahtijevaju uporabu tvari s visokim oksidacijskim potencijalom ¹⁶¹. Osim toga Se daje lakohlapljive spojeve (tzv. volatilizacija), npr. uslijed pougljenjivanja uzorka, pri čemu nastaju reducirajući uvjeti i može nastati plinoviti H₂Se ¹⁶². Također, hlapljivi halidi selenija mogu nastati u prisustvu halogena ¹⁶⁰. Radi održanja oksidirajućih uvjeta tijekom razaranja u otvorenom sustavu, obično se koristi perklorna kiselina u kombinaciji s dušičnom kiselinom, mada su se i neke druge kombinacije kiselina pokazale jednako učinkovitim ^{160, 163, 164}. Kod otvorenih sustava je prednost u mogućnosti razaranja veće količine uzorka i obično se koriste električki grijani blokovi ili mikrovalni sustavi kojima se mikroprocesorima nadzire vrijeme razaranja i temperatura. Nedostatak je mogućnost kontaminacije iz laboratorijskog zraka, te gubici volatilizacijom. Kod zatvorenih sustava se razaranje (uglavnom male količine uzorka) provodi na povišenim temperaturama i pritisku, te nema gubitaka volatilizacijom ili kontaminacije. Fecher i Ruhnke ¹⁶⁵ smatraju nepotrebnim korištenje potencijalno eksplozivne HClO₄, budući da suvremeni uređaji zatvorenog tipa (mikrovalni sustavi, visokotlačni uređaji za spaljivanje, i dr.), koristeći samo HNO₃, uz visoke temperature i pritiske mogu izvršiti potpunu razgradnju organske tvari. Osnovni nedostatak metoda poput razgradnje fuzijom sa MgO/Na₂CO₃, ili spaljivanje u mufolnoj peći uz dodatak Mg(NO₃)₂/MgO, je dugotrajnost postupka. Vrijeme sagorijevanja u kisiku kod običnog pritiska je brzo mada se mogu razarati samo male količine uzorka ¹⁶⁰. Rjeđe se koristi razaranje u kisiku pod pritiskom zbog opasnosti eksplozije i gubitaka Se. Plazmom kisika se mogu razarati veće količine uzorka (i do 1 g), ali je postupak dugotrajan ¹⁵⁹.

Nakon razaranja uzorka oksidirajućim sredstvima Se se uglavnom nalazi u šesterovalentnom obliku, a kako mnoge metode zahtijevaju Se (IV) oblik, mora se provesti redukcija. Mnoge reducirajuće tvari se mogu koristiti u tu svrhu, ali se ipak najčešće koristi HCl ¹⁶⁰. Preporučuju se različite varijante postupka s obzirom na koncentraciju HCl, vrijeme redukcije i temperaturu otopine.

Postoji velik broj različitih metoda za određivanje ukupnog Se u uzorcima od kojih su najvažnije navedene u daljnjem tekstu prema učestalosti uporabe.

Atomska apsorpcijska spektrometrija se koristi za određivanje Se pomoću dvije tehnike: elektrotermička AAS (ET-AAS) poznata i kao metoda grafitne kivete (eng. graphite furnace, GF-AAS), te tzv. hidridna tehnika (eng. hydride generation, HG-AAS). Elektrotermička tehnika se temelji na atomizaciji anorganskog Se primjenom vrlo visokih temperatura (i viših od 2000°C) koje se postižu zagrijavanjem električnim otporom grafitne kivete. Tako pobuđene čestice su izložene elektromagnetskom zračenju specifičnom za selenij, i apsorpcija tog zračenja je proporcionalna količini elementa. Ova tehnika omogućuje, između ostalog, izravno mjerenje Se u krutim uzorcima, ili u uzorcima krvi ili vode ¹⁶⁰. Zbog interferencije od strane drugih elemenata, Zeemanova background korekcija je neophodna. Visoke temperature uvode problem volatilizacije Se, te se to uklanja dodatkom tzv. modifikatora matriksa (npr. Pd) koje stabiliziraju Se za vrijeme stadija pougljenjivanja ¹⁶². Kod hidridne tehnike se Se (IV) prije atomizacije prevodi u hlapljivi selenij hidrid (SeH₂), te je moguća interferencija od drugih elementa koji stvaraju hidride ¹⁵⁹. Provodi se u šaržnim ili kontinuiranim sustavima sa stalnim protokom, a najnovije izvedbe uređaja uključuju tzv. protočno ubrizgavanje (eng. flow injection, FI). Hidridna tehnika (naročito FI-HG-AAS) je znatno osjetljivija od ET-AAS-a ¹⁵⁹.

Fluorimetrijsko mjerenje Se zahtijeva dodatni korak prije određivanja koji uključuje reakciju Se (IV) s aromatskim diaminom uz nastanak piazselenola čija se fluorescencija mjeri ¹⁶⁶. Prednosti metode su dobra osjetljivost i relativno niska cijena, ali metoda dugo traje, i zahtijeva obučeno osoblje ¹⁵⁹.

Selenij se može mjeriti i atomskom emisijskom spektrometrijom (AES), koja može imati dvije izvedbe s obzirom na izvor pobuđivanja atoma na emitiranje karakterističnog elektromagnetskog spektra: plazmu istosmjerne struje (eng. direct current plasma, DCP), te induktivno povezanu plazmu (eng. inductively coupled plasma, ICP). Ovi emisijski spektrometri su povezani s generatorom hidrida, te omogućuju istovremeno određivanje više različitih elemenata uz niske granice detekcije ¹⁵⁹.

Mjerenjem hidrida selenija masenim spektrometrom s induktivno povezanom plazmom (HG-ICP-MS) se postiže vrlo dobra osjetljivost ¹⁵⁹.

Slično kao kod fluorimetrije, kromatografske metode se temelje na određivanju količine piazselenola koji nastaje nakon reakcije Se (IV) s odgovarajućim reagensom. Obično se koriste visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) sa UV-detektorom, i plinska kromatografija s detektorom elektronskog zahvata (eng. electron capture detector, ECD), te masenim spektrometrom (GC-MS) kao detektorom ¹⁵⁹.

Među rjeđe korištene metode ulazi analiza aktivacijom neutrona (NAA), kod koje se atomi

uzorka bombardiraju neutronima pri čemu dolazi do oslobađanja γ -zraka. Poboljšanje osjetljivosti se postiže inačicom metode s razdvajanjem neutronske aktivacije nastalih radioaktivnih izotopa (RNAA) ¹⁶⁰. Metoda je osjetljiva, točna, i nije potrebno razaranje uzorka. Nedostaci su visoka cijena i dugotrajnost provedbe. Obično se koristi za certifikaciju referentnih materijala i provjeru valjanosti drugih analitičkih metoda. Fluorescencija X-zraka (XRF) (uzorak se podvrgava zračenju niskoenergetskih X-zraka što uzrokuje emisiju fluorescentog svjetla), i protonima izazvana emisija X-zraka (PIXE) omogućuju istovremeno određivanje nekoliko elemenata, a mogu se i izravno analizirati kruti uzorci ¹⁵⁹. Od elektrokemijskih metoda treba spomenuti anodnu (ASV) i katodnu (CSV) stripping voltametriju, kojima su postignute vrlo niske granice detekcije ^{159, 160}.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. RAZVOJ UPITNIKA UČESTALOSTI NAMIRNICA

Razvoj ovdje primijenjenog semikvantitativnog UUN-a se temeljio na prethodnim ispitivanjima prehrane u regiji ^{131, 167}, koja su provedena metodom duplikata dnevnih obroka. Svrha je bila dobiti jednostavan, brz, i jeftin instrument za određivanje unosa selenija većeg broja ispitanika. Uz Se, mjereno je ukupno energije, masti, bjelancevina, ugljikohidrata, zasićenih, jednostruko nezasićenih, višestruko nezasićenih masnih kiselina, linolne kiseline, alkohola, te prehranbenih vlakana. U upitnik su uključene namirnice i jela identificirana na osnovi studije duplikata obroka ¹⁶⁷. U tom ispitivanju je sudjelovao 41 ispitanik i ispitanica koji su prikupljali duplikate i bilježili i vagali sve što su jeli i pili tijekom sedam dana, te je uz ukupno 287 dana bilježenja na raspolaganju bio veliki izbor namirnica i jela. Preliminarnim ispitivanjem, dodane su i namirnice specifične za seosku populaciju koja je ispitivana. Nakon što je dobiven prvobitan popis namirnica, dodatno je povećan izbor namirnica koje su značajan izvor Se, u prvom redu meso i proizvodi. Konačni UUN sadrži 140 namirnica svrstanih u sljedećih deset skupina: voće; povrće; meso i proizvodi; jaja, mlijeko i proizvodi; kruh, tijesto i žitarice; brza hrana, slatkiši, snack proizvodi; masti; pića, te juhe (VIDI *Prilog*). Na anketnom obrascu je također unutar svake kategorije ostavljeno mjesta za namirnice i jela koja nisu na popisu. Za svaku namirnicu je navedena srednja porcija koja je odabrana na osnovi spomenutih prethodnih istraživanja, različitih normativa ¹⁶⁸, a tamo gdje se srednja porcija izražavala komadom srednje veličine (voće), ili posudicom, težina srednje porcije je dobivena srednjom vrijednošću 3-4 neovisna mjerenja. Upitnik je zamišljen kao semikvantitativan, odnosno ispitanicima su bile ponuđene tri kategorije za veličinu porcije: mala (ukoliko je veličina porcije bar upola manja od srednje porcije), srednja, te velika (ukoliko je veličina porcije 1,5 puta veća od srednje porcije). Na osnovi prethodnih istraživanja ¹¹⁸ koja upućuju na to da sami ispitanici slabo procjenjuju veličinu porcije, odlučeno je da anketari popunjavaju upitnik prilikom razgovora s ispitanicima. Anketari su bili obučeni za procjenu veličine porcije ispitanika, te su nosili 'modele' kao ilustraciju srednje porcije pojedine namirnice (npr. zdjelica od 250 cm³ kao srednja porcija za jela poput variva od graha, juhe, i dr., te pakovanja od 50 g paštete, 25 g maslaca, i sl.). Upitnik se odnosio na prethodnih mjesec dana, a kategorije učestalosti za namirnice su bile: dvaput ili više puta dnevno, jedanput dnevno, 4-6 puta tjedno, 2-3 puta tjedno, jedanput tjedno, 2-3 puta mjesečno, jedanput mjesečno, i nijednom. Ispitanicima je postavljeno i pitanje o vrsti masnoće koja se koristi prilikom kuhanja, što je poslužilo za pravilan odabir recepture jela i pržene/pečene hrane pojedinaca radi točnijeg određivanja masnokiselinskog sastava hrane. Budući da je osnovni cilj istraživanja ispitati vezu mikroelementa na čiji udio u namirnicama, a time i unos hranom, presudno utječe njegova količina u tlu, i endemske nefropatije, unos vitaminsko-mineralnih dodataka nije uziman u obzir.

3.1.1. Ispitivanje valjanosti i ponovljivosti upitnika učestalosti namirnica

U svrhu provjere kakvoće upitnika za procjenu prehrane isti je proveden tri puta. Prvi put u periodu između ožujka i svibnja 1999. godine, po dovršetku sedmodnevnog bilježenja i vaganja, te dva puta (u ožujku i svibnju) 2001. godine. Uzorak od 17 ispitanika (15 žena i 2 muškarca) je odabran iz studentske populacije, nakon iskazanog zanimanja za istraživanje, kao i vlastitu prehranu, što se može smatrati dobrom zaštitom od čestog problema navođenja manje količine od stvarno pojedene (tzv. underreporting). U popunjavanju upitnika su sudjelovali anketari.

Jedna od referentnih metoda za ispitivanje valjanosti tj. validaciju UUN-a je bila metoda sedmodnevnog bilježenja i vaganja. Provedena je u periodu između ožujka i svibnja 1999. godine, pri čemu su ispitanici vagali i bilježili sve pojedeno i popijeno tijekom sedam dana koji nisu nužno morali biti u nizu. Radi dobivanja reprezentativnije slike o prehrani pojedinca, dva dana su morali biti subota i nedjelja. Ispitanici su ovu metodu proveli samostalno, ali uz bliski kontakt s anketarima koji su pojašnjavali upute za bilježenje svih konzumiranih namirnica.

Validacija UUN-a je provedena i metodom 24-satnog prisjećanja kod koje ispitanici trebaju navesti sve što su pojeli i popili u posljednja 24 sata. Ova metoda je, isto kao i UUN, provedena tri puta (odmah nakon popunjavanja upitnika). Kod 24-hP-a je potrebno i procijeniti veličinu porcije, pri čemu su anketari koristili iste modele za srednju porciju kao kod UUN-a.

Prije provedbe obje referentne metode ispitanici su upoznati s potrebom što detaljnijeg opisa vrste jela (često uz vlastite recepte), načina pripreme, i veličine porcije. Procjena veličine porcije uz kuhinjske mjere poput čaša, kriški, i sl., preporučena je ispitanicima i pri provedbi sedmodnevnog bilježenja i vaganja ako je namirnica ili jelo konzumirano izvan kuće. Za kupovne namirnice poput margarina, vrhnja, i sl., ispitanici su zamoljeni da, kad je god to bilo moguće, navedu trgovačko ime proizvoda. Prije popunjavanja sedmodnevnog bilježenja i vaganja ispitanicima je također naglašeno da ne mijenjaju prehrane i životne navike za vrijeme trajanja ispitivanja.

Na kraju ispitivanja, ankete su obrađene uz razjašnjenje eventualno nepotpunih informacija s ispitanicima, te izračunati unosi pojedinih namirnica i jela. Namirnice i jela su zatim kodirane i unesene u kompjutorski program Nutri Pro 2001 (KPS d.o.o.) pomoću kojeg je izračunat dnevni unos osnovnih hranjivih sastojaka, te selenija. Kodiranje namirnica i jela je često podrazumijevalo unošenje novih stavki (kao i odgovarajućih receptura za jela) u program. Sve tri metode su se osnivale na istoj bazi podataka pri preračunavanju unosa namirnica u unos hranjivih tvari, eliminirajući time jedan mogući izvor greške. Isto tako, unošenje novih namirnica i receptura za jela, ukoliko su nedostajale u bazi podataka, također umanjuje greške u interpretaciji

anketa, naročito kod 24-hP-a i MBV-a koji ne daju popis namirnica i jela poput UUN-a.

3.1.1.1. Statistička obrada

Izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije hranjivih tvari za UUN (tri ponavljanja), 24-hP (tri ponavljanja), i metodu sedmodnevnog bilježenja i vaganja (7BV). Izračunate su razlike između srednjih vrijednosti UUN-a i referentnih metoda, te određene značajne razlike uz analizu varijance. Za UUN i 24-hP je određen i odnos varijanci za tri ponavljanja metode, dijeljenjem intraindividualne s interindividualnom varijancom.

Raspodjela podataka za većinu hranjivih tvari je bila neravnomjerno raspodijeljena prema višim vrijednostima, te su vrijednosti logaritmirane ($\log_e$) radi dobijanja normalne raspodjele (koja je postignuta za sve hranjive tvari osim alkohola) prije daljnje statističke obrade ¹⁴⁹.

Pearsonovi koeficijenti korelacije, te Spearmanovi za alkohol, su izračunati radi procjene podudarnosti UUN-a sa 24-hP-om i 7BV-om u rangiranju pojedinaca prema unosu hranjivih tvari. Koeficijenti korelacije između različitih metoda su računati i nakon podešavanja za ukupni energijski unos, pri čemu je energijski unos bio nezavisna varijabla u regresijskom modelu s hranjivom tvari kao zavisnom varijablom ¹⁵². Reziduali su dodani očekivanom unosu hranjive tvari za srednji energijski unos skupine, pri čemu je rezultat unos hranjive tvari nekoreliran s ukupnim unosom energije.

Deatenuirani koeficijent korelacije, koji se računa radi smanjenja utjecaja intraindividualne varijacije kod ponavljanja metoda (UUN i 24-hP), je dobiven uz intraindividualnu i interindividualnu varijancu prema sljedećoj jednadžbi ¹³⁵:

$$r_c = r_o \cdot \sqrt{1 + [(\sigma_w^2 / \sigma_B^2) / n]}$$

gdje je r_c deatenuirani koeficijent korelacije, r_o je koeficijent korelacije podešen za ukupni energijski unos između hranjivih tvari dobivenih 7BV-om, 24-hP-om, ili UUN-om, σ_w^2 je intraindividualna varijanca, σ_B^2 je interindividualna varijanca, a n je broj ponavljanja.

Dobiveni podaci za hranjive tvari uz UUN, te drugim dvjema metodama su podijeljeni u kvartile radi ispitivanja podudarnosti klasifikacije pojedinaca ovim metodama. Kvartili su posebno definirani prema raspodjeli podataka za hranjive tvari za svaku od tri metode. Određen je broj ispitanika u ekstremnim kvartilima UUN-a i dviju referentnih metoda, te ukupni udio ispitanika svrstanih u isti kvartil unosa hranjive tvari prije i nakon podešavanja za ukupan energijski unos.

Za ocjenu ponovljivosti UUN-a određen je intraclass koeficijent korelacije koji je računat

prema jednadžbi ¹⁵⁰:

$$r_A = \sigma_B^2 / (\sigma_B^2 + \sigma_W^2)$$

gdje je r_A intraclass koeficijent korelacije, σ_W^2 je intraindividualna varijanca, a σ_B^2 interindividualna varijanca.

Dugotrajna ponovljivost je određena računanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (Spearmanovog za alkohol) između srednjih vrijednosti za hranjive tvari dobivenih prvim upitnikom i srednje vrijednosti drugog i trećeg upitnika provedenih dvije godine kasnije. Kratkotrajna ponovljivost je izražena računanjem koeficijenata korelacije između srednjih vrijednosti za hranjive tvari drugog i trećeg upitnika koji su provedeni u razmaku od dva mjeseca. Koeficijenti korelacije su računati i prije i nakon podešavanja za ukupan energijski unos.

Za sva provedena statistička ispitivanja korišteni su kompjutorski programi Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp.) i Statistica 4.1 (Statsoft Inc.).

3.2. ISPITIVANA POPULACIJA I PROVEDBA UPITNIKA

Ispitivanje prehrambenih navika na području u kojem se javlja endemska nefropatija (EN) je provedeno u tri sela Brodske Posavine: Slavonskom Kobašu, Kaniži i Bebrini u kojima je i zabilježeno najviše slučajeva ove bolesti. Popis oboljelih od EN dobiven je ljubaznošću dr. sc. Stjepana Čeovića iz Zavoda za javno zdravstvo Županije Brodsko-posavske u Slavonskom Brodu. Osim pacijenata koji su sudjelovali u ispitivanju isključivo radi utvrđivanja trenutne kakvoće prehrane uslijed bolešću uzrokovanih promjena prehrambenih navika, fokusna populacija su bili zdravi članovi njihove obitelji, kao i članovi obitelji drugih pacijenata (eventualno i preminulih), da bi se utvrdile moguće prehrambene predispozicije obolijevanju. Također, u navedenim selima su metodom slučajnog uzorka anketirani i ljudi bez povijesti EN u obitelji koji su poslužili kao kontrole s obzirom na iste uvjete okoliša. Ukupno je iz navedenih sela sudjelovalo 13 pacijenata (6 muškaraca i 7 žena), 46 članova obitelji pacijenata (15 muškaraca i 31 žena), te 51 kontrola (14 muškaraca i 37 žena). U Ivanovcima, selu u sjevernom dijelu Istočne Slavonije, u kojem nikad nije bilo pojave ove bolesti, je anketirano 27 ljudi (7 muškaraca i 20 žena), i to je kontrolna populacija s obzirom na različite uvjete okoliša. Kod odabira članova obitelji i kontrola kriterij odabira je bio da se ne pridržavaju posebnih režima prehrane uvjetovanih zdravstvenim, vjerskim, ili etičkim razlozima.

Ispitivanje je provedeno u rujnu i listopadu 1999. godine. Jesenska sezona je odabrana zbog velikog izbora različitih namirnica, dajući potpuniju sliku o izvorima selenija u hrani. Zbog velikih sezonskih varijacija (uslijed oslanjanja na vlastitu proizvodnju hrane) u unosu namirnica,

odlučeno je da se upitnik odnosi samo na prethodnih mjesec dana. Procjena za cijelu godinu u ispitivanoj populaciji bi produžila, i zakomplicirala upitnik, uz vrlo vjerojatno veću grešku u procjeni učestalosti konzumacije. Provedba upitnika je trajala oko 40 minuta po ispitaniku. Usporedo s ispunjavanjem upitnika, ispitanici su dali i nekoliko sljedećih podataka: dob, težinu i visinu koji su poslužili u statističkoj obradi.

3.3. OBRADA UPITNIKA I KOMPJUTORSKI PROGRAM ZA PRERAČUNAVANJE NAMIRNICA U HRANJIVE TVARI

Unos pojedine stavke iz upitnika je izračunat za period od mjesec dana, prema navedenoj učestalosti potrošnje i uobičajenoj težini porcije. Učestalost neke stavke upitnika pojedinca je izražena kao proporcija mjesečne konzumacije (npr. jednom tjedno je računato kao jedna sedmina pomnožena sa 30). Tako izračunata učestalost je zatim pomnožena s navedenom veličinom porcije. Prilikom obrade anketa, eventualno nedostajuće informacije o učestalosti konzumacije i veličini porcije su ispravljene kontaktom s ispitanicima. U nemogućnosti kontakta, a ukoliko je bilo riječ o najviše dvije nedostajuće vrijednosti, uzimano je da nedostatak učestalosti podrazumijeva da namirnica nije konzumirana, dok je kod nenavođenja veličine porcije uzimana srednja porcija.

Kodiranje tj. pridruživanje stavki iz upitnika namirnicama i jelima iz baze podataka je obavljeno od strane jednog istraživača. Pri preračunavanju unosa namirnica u unos hranjivih tvari korišten je kompjutorski program Nutri Pro 2001 (KPS d.o.o.). Program se temelji na važećim hrvatskim tablicama sastava hrane i pića ¹¹³, koje sadrže osnovne prehrambene podatke (ali ne i udio selenija) za 580 namirnica. Pored kvalitativnog i kvantitativnog sastava hranjivih tvari za osnovne namirnice, program omogućuje i unos receptura za jela, kao i unos sastava hranjivih tvari namirnica. Unesene recepture za pojedina jela sa UUN-a (te kod MBV-a i 24-hP-a korištenih u validaciji upitnika) potječu iz hrvatskih knjiga recepata ¹⁶⁸, od proizvođačkih podataka o sastavu pojedinih namirnica, te od recepata dobivenih od ispitanika. U ovom radu je izmjerena količina Se za niz stavki UUN-a, te je u bazu podataka unijeta odgovarajuća vrijednost, uz poseban unos za endemska sela i kontrolnu lokaciju za namirnice dobivene vlastitim uzgojem. Vrijednosti Se za kupovne namirnice su korištene u računanju ukupnog unosa Se za obje lokacije. Mjesečni unos namirnice ili jela prema upitniku je unesen u kompjutorski program koji je zatim izračunavao odgovarajući unos hranjivih tvari i energije.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije unosa ispitivanih hranjivih tvari i energije svih ispitanika, te su određene srednje vrijednosti za pojedine skupine. Osim ukupnog unosa, izračunat je i unos Se po kg tjelesne mase kojim se umanjuje veza između unosa Se i ukupnog energijskog unosa. Razlike u unosu Se između pojedinih skupina ispitanika su analizom varijance. Ispitan je doprinos pojedinih skupina namirnica ukupnom unosu Se, kao i povezanost unosa Se s različitim značajkama ispitanika (BMI, dob, i dr.) korelacijskom analizom. Pri tome su korišteni logaritmirani ($\log_e$) podaci radi popravka normalne razdiobe podataka.

Za sva provedena statistička ispitivanja korišteni su kompjutorski programi Microsoft Excel 97 (Microsoft Corp.) i Statistica 4.1 (Statsoft Inc.).

3.5. KEMIJSKA ANALIZA SELENIJA U NAMIRNICAMA I TLU

3.5.1. Prikupljanje, čuvanje, usitnjavanje i homogenizacija uzoraka

Uzorci namirnica s ispitivane i kontrolne lokacije, te uzorci kupovnih namirnica, prikupljeni su u periodu između rujna i prosinca 1999. godine, te čuvani do analize. Ovisno o vrsti, uzorci su čuvani ili u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ ili duboko zamrznuti na -20°C . Usitnjavanje i homogenizacija su, također prema vrsti namirnice, provedeni uporabom različitih kuhinjskih pomagala.

Uzorci zemlje su uzeti uz pomoć sonde s dubine od otprilike 30 cm sa četiri različite lokacije poljoprivrednog zemljišta u Slavonskom Kobašu (endemsko područje), te dvije lokacije na kontrolnom području (Ivanovci i Zelčin). Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi do analize. Prije analize homogenizirani uzorci su sušeni 6-10 h na 50°C do konstantne mase.

3.5.2. Razaranje uzoraka smjesom kiselina

Vlažno razaranje uzoraka namirnica provedeno je uz smjesu perklorne (70%, Merck), sumporne (98%, Kemika) i dušične kiselina (63%, Merck) u omjeru 1:1:5¹⁶⁹. Dušična kiselina je bila suprapur, dok su perklorna i sumporna kiselina bile analitičke čistoće. Svo stakleno posuđe je prije uporabe namakano u kromsumpornoj kiselini tijekom 24 h, dobro oprano detergentom, isprano, te namakano u 20%-tnoj dušičnoj kiselini daljnjih 24 h. Odvaga uzorka je bila ovisna o očekivanoj koncentraciji selenija i sastavu uzorka (npr. manja kod uzoraka s puno masti ili ugljikohidrata zbog burne reakcije sa HClO_4 ¹⁷⁰, i iznosila je od 0,1 g za uzorke osušene zemlje,

do 4 g izvornog uzorka za neke vrste voća i povrća. Uzorcima je nakon odvage u kivete dodana smjesa kiselina, te su ostavljeni preko noći radi predigestije da bi se smanjilo pjenjenje uzoraka. Temperatura bloka za digestiju je postupno dizana dok otopine nisu postale bistre. Ukoliko je otopina počela tamniti dodavana je dušična kiselina po potrebi. Zatim je temperatura od 195-200°C održavana pola sata nakon pojave bijelih para perklorne kiseline ¹⁶¹. Nakon hlađenja na 90°C digestatima je dodan 1 cm³ koncentrirane HCl (suprapur, Merck) radi redukcije Se (VI) u Se (IV), i ta temperatura je održavana 15 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, digestati su kvantitativno preneseni u tikvice od 25 cm³, koje su dopunjene do oznake deioniziranom vodom.

3.5.3. Određivanje ukupnog selenija u uzorcima hidridnom tehnikom atomskog apsorpcijskog spektrometra

Mjerenje razine Se provedeno je hidridnom tehnikom uz MHS (Mercury/Hydride System) tip 10, povezan s Perkin Elmer 2380 atomskim apsorpcijskim spektrometrom. Sav pribor korišten u određivanju Se prethodno je opran gore opisanim postupcima. Priprema otopine uzorka je uključivala pipetiranje 1, 5, ili 10 cm³ otopine, uz nadopunu do 15 cm³ sa 1,5%-tnom HCl (svježe pripremljena iz suprapur 30% HCl, Merck). Radi sprječavanja smanjivanja signala uslijed prisustva visoke koncentracije bakra u uzorcima poput iznutrica, pri pripremi otopine tih uzoraka vodilo se računa da konačna koncentracija HCl bude 6 M ¹⁷¹. Prilikom mjerenja svake šarže, određen je i udio Se slijepih proba. Ukupni selenij u obliku selenita, preveden je u vodikov selenid (H₂Se) u MHS-u uz svježe pripremljeni 3%-tni NaBH₄ u 1%-tnom NaOH. Nastali hidrid se zatim uz propuhivanje otopine argonom, istjeruje do kvarcne ćelije zagrijane plamenom zraka i acetilena do 900°C, pri čemu Se atomizira, te se mjeri apsorpcija svjetla valne duljine 196 nm koje isijava žarulja neelektrodnog izbijanja (EDL, electrodeless discharge lamp), uz otvor blende od 2 nm. Kalibracija je provedena pripremom standardnih otopina sa 10, 20, i 50 ng Se (iz stock otopine sa 1000 mg Se/dm³ u obliku SeO₂, Sigma) čije su izmjerene apsorbancije poslužile za izradu odgovarajućeg dijagrama apsorbancija - koncentracija. Osjetljivost uređaja tj. koncentracija koja daje apsorbanciju 0,0044 (1%-tna apsorpcija) ili nagib analitičke krivulje u njenom linearnom području, je 2,2 ng Se po 1% apsorpcije. Detekcijski limit je najniža koncentracija elementa koja se može statistički razlučiti od nule tj. bazne linije i iznosi 0,02 µg Se/dm³, mjereno u 50 cm³ otopine.

3.5.4. Provjera kakvoće metoda

U svrhu provjere primijenjenih metoda kemijske analize ukupnog Se određeni su točnost i reproducibilnost.

Točnost metode je određena uz pomoć referentnih materijala s poznatom koncentracijom selenija. Korišteni su pšenični gluten (RM 8418; NIST, SAD) s certificiranom razinom Se od 2,58 µg/g, i goveđa jetra (RM 1577b; NIST, SAD) s koncentracijom Se od 0,73 µg/g.

Provedeno je i određivanje recoveryja kao druge mjere točnosti mjerenja selenija primijenjenom metodom. Postupak je uključivao dodatak poznate količine anorganskog (SeO₂, Sigma) i organskog (seleno-L-metionin, Sigma) oblika Se. Recovery je određen u uzorcima pšeničnog brašna, češnjaka, i svinjetine, a računa se po jednadžbi:

$$\%R = [(C_F - C_U) / C_A] \cdot 100$$

gdje je C_F koncentracija Se u fortificiranom uzorku, C_U koncentracija u originalnom uzorku, a C_A koncentracija dodanog Se.

Reproducibilnost ili ponovljivost metode je provjerena provedbom postupaka razaranja i spektrometrijskog određivanja uzorka uz 10 paralela. Mjera ponovljivosti je koeficijent varijacije (relativna standardna devijacija):

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (\%)$$

3.5.5. Statistička obrada

Izračunate su srednje vrijednosti i standardna devijacija izmjera koncentracije Se u namirnicama i uzorcima tla, te ispitana razlika u srednjim vrijednostima koncentracije Se u tlu endemske i kontrolne lokacije analizom varijance.

Za navedena statistička istraživanja je korišten kompjutorski program Statistica 4.1 (Statsoft Inc.).

4. REZULTATI

Tablica 1 Dnevni unos hranjivih tvari i energije određen metodom sedmodnevnog bilježenja i vaganja (7BV), upitnikom učestalosti namirnica (UUN), i metodom 24-satnog prisjećanja (24-hP), razlika između UUN-a i referentnih metoda, te odnos varijanci UUN-a i 24-hP-a*

	7BV	UUN¹	24-hP¹	Razlika (UUN–7BV)	Razlika (UUN–24-hP)	Odnos varijanci²	
						UUN	24-hP
Energija (MJ)	7,5 ± 1,9	8,2 ± 1,8	8,0 ± 2,0	0,7	0,2	0,24	0,38
Bjelančevine (g)	62,6 ± 16,1	69,3 ± 15,4	70,8 ± 17,8	6,7	-1,5	0,18	0,57
Masti (g)	78,4 ± 26,6	84,4 ± 20,4	86,6 ± 23,5	6,0	-2,2	0,34	0,58
Zasićene masne kis. (g)	26,3 ± 7,9	28,1 ± 8,0	26,9 ± 8,6	1,8	1,2	0,28	0,56
Mononezasićene m. k. (g)	27,7 ± 14,1	29,8 ± 8,4	29,1 ± 9,4	2,1	0,7	0,40	0,69
Polinezasićene m. k. (g)	21,3 ± 8,7	24,4 ± 5,7	28,0 ± 9,2	3,1	-3,6	0,31	0,78
Linolna kiselina (g)	19,0 ± 8,0	21,8 ± 5,2	25,1 ± 8,6	2,8	-3,3	0,32	0,77
Ugljikohidrati (g)	211,9 ± 50,1	232,4 ± 50,4	217,6 ± 61,0	20,5	14,8	0,42	0,65
Prehrambena vlakna (g)	17,1 ± 6,1	21,2 ± 4,6	19,1 ± 5,4	4,1 ^a	2,1	0,47	0,79
Alkohol (g)	2,1 ± 6,0	2,0 ± 4,4	1,7 ± 6,2	0,1	0,3	0,74	0,09
Selenij (µg)	40,6 ± 9,2	50,3 ± 11,8	51,5 ± 22,3	9,7 ^a	-1,2	0,26	0,88

*-srednje vrijednosti po metodama dane kao aritmetička sredina 17 ispitanika ± SD (srednja dob ispitanika na početku ispitivanja je bila 22,8 ± 1,8 godina; BMI=21,6 ± 3,2 uz minimalne promjene nakon dvije godine, BMI=21,6 ± 2,3)

^a –statistički značajna razlika (ANOVA, p<0,05)

¹ –vrijednosti za UUN i 24-hP su aritmetičke sredine tri ponavljanja

² –odnos intraindividualne i interindividualne varijance

Tablica 2 Koeficijenti korelacije između srednjih vrijednosti unosa hranjivih tvari dobivenih upitnikom učestalosti namirnica (UUN) s metodom 24-satnog prisjećanja (24-hP), te sedmodnevnom metodom bilježenja i vaganja (7BV)*

	7BV vs. UUN			24-hP vs. UUN		
	sirovi	podešeni	deatenuirani	sirovi	podešeni	deatenuirani
Energija	0,67	-	-	0,81	-	-
Bjelančevine	0,53	0,61	0,63	0,67	0,74	0,81
Masti	0,37	0,78	0,82	0,58	0,70	0,76
Zasićene masne kis.	0,34	0,56	0,59	0,69	0,70	0,76
Mononezasićene m. k.	0,34	0,40	0,43	0,58	0,56	0,62
Polinezasićene m. k.	0,42	0,25	0,26	0,30	0,18	0,20
Linolna kiselina	0,47	0,31	0,33	0,25	0,10	0,11
Ugljikohidrati	0,77	0,39	0,42	0,76	0,60	0,66
Prehrambena vlakna	0,57	0,08	0,09	0,65	0,50	0,56
Alkohol	0,75	0,60	0,67	0,49	0,08	0,08
Selenij	0,55	0,49	0,51	0,72	0,27	0,31

* -svi koeficijenti korelacije su Pearsonovi osim za alkohol za koji su računati Spearmanovi koeficijenti korelacije; sve vrijednosti su prethodno logaritmirane da se popravi normalna razdioba podataka; podešeni koeficijenti korelacije su dobiveni korekcijom za ukupni unos energije regresijskom analizom (VIDI *Ekperimentalni dio*); deatenuacija koeficijenata korelacije podešenih za energijski unos je provedena po jednadžbi danoj u poglavlju *Ekperimentalni dio*; kod usporedbe UUN-a i 24-hP-a deatenuacija je izvršena za 24-hP kao referentnu metodu

Tablica 3 Krosklasifikacija kvartila raspodjele vrijednosti hranjivih tvari dobivenih sedmodnevnom metodom bilježenja i vaganja (7BV), metodom 24-satnog prisjećanja (24-hP), te upitnikom učestalosti namirnica (UUN)*

	7BV vs. UUN		24-hP vs. UUN	
	Ekstremni kvartil	Isti kvartil	Ekstremni kvartil	Isti kvartil
Energija	0/17	9/17 (53%)	0/17	8/17 (47%)
Bjelančevine	1/17 (6%)	8/17 (47%)	1/17 (6%)	8/17 (47%)
Masti	0/17	8/17 (47%)	0/17	9/17 (53%)
Zasićene masne kis.	1/17 (6%)	6/17 (35%)	0/17	8/17 (47%)
Mononezasićene m. k.	0/17	6/17 (35%)	0/17	6/17 (35%)
Polinezasićene m. k.	2/17 (12%)	5/17 (29%)	1/17 (6%)	5/17 (29%)
Linolna kiselina	2/17 (12%)	4/17 (24%)	1/17 (6%)	6/17 (35%)
Ugljikohidrati	1/17 (6%)	4/17 (24%)	0/17	6/17 (35%)
Prehrambena vlakna	2/17 (12%)	5/17 (29%)	0/17	7/17 (41%)
Alkohol	1/17 (6%)	7/17 (41%)	3/17 (18%)	5/17 (29%)
Selenij	0/17	8/17 (47%)	0/17	7/17 (41%)

* -kvartili raspodjele su računati iz unosa hranjivih tvari podešenih za ukupni energijski unos, osim za unos energije; vrijednosti za UUN i 24-hP su srednje vrijednosti tri ponavljanja

Tablica 4 Pokazatelji ponovljivosti upitnika učestalosti namirnica

	Intraclass koeficijent korelacije ^a	Kratkotrajna ponovljivost ^b		Dugotrajna ponovljivost ^b	
		sirovi	podešeni	sirovi	podešeni
Energija	0,81	0,78	-	0,86	-
Bjelančevine	0,85	0,79	0,67	0,91	0,64
Masti	0,75	0,76	0,51	0,70	0,58
Zasićene masne kis.	0,78	0,81	0,54	0,69	0,35
Mononezasićene m. k.	0,71	0,73	0,28	0,67	0,12
Polinezasićene m. k.	0,76	0,79	0,79	0,74	0,47
Linolna kiselina	0,76	0,78	0,78	0,71	0,44
Ugljikohidrati	0,70	0,59	0,81	0,73	0,76
Prehrambena vlakna	0,68	0,66	0,70	0,73	0,18
Alkohol	0,57	0,59	0,52	0,34	0,24
Selenij	0,80	0,76	0,53	0,83	0,53

^a –računat na osnovi tri ponavljanja upitnika; jednadžba za računanje intraclass koeficijenta korelacije te pojedinosti oko ispitivanja kratkotrajne i dugotrajne ponovljivosti upitnika dane u *Eksperimentalnom dijelu*

^b –za sve hranjive tvari navedeni su Pearsonovi koeficijenti korelacije osim za alkohol za koji je računat Spearmanov koeficijent korelacije; podešeni koeficijenti korelacije su dobiveni korekcijom za ukupni unos energije regresijskom analizom (VIDI *Eksperimentalni dio*)

Tablica 5 Ponovljivost i točnost metode za određivanje ukupnog selenija

PONOVLJIVOST		CV=3,7% (n=10) ^a	
TOČNOST*	Referentni materijal	Certificirana vrijednost (ppm)	Određena vrijednost (ppm)
	Pšenični gluten (RM 8418; NIST, SAD)	2,58 ± 0,19	2,55 ± 0,09 (n=6)
	Goveđa jetra (RM 1577b; NIST, SAD)	0,73 ± 0,06	0,74 ± 0,03 (n= 5)
	Uzorak	<i>Dodano</i>	<i>Recovery (%)</i>
	Pšenično brašno	60 ng AS ^b (n=4)	93,7
		120 ng AS (n=4)	98,5
		60 ng OS ^c (n=4)	98,7
		120 ng OS (n=4)	96,5
	Svinjetina	60 ng AS (n=2)	94,9
		120 ng AS (n=2)	94,4
		60 ng OS (n=2)	99,4
		120 ng OS (n=2)	100,8
	Češnjak	60 ng AS (n=2)	97,1
		120 ng AS (n=2)	100,0
		60 ng OS (n=2)	99,7
		120 ng OS (n=2)	98,5

* -točnost je određena mjerenjem koncentracije Se u referentnim materijalima, te mjerenjem recoveryja organskog i anorganskog oblika Se u različitim matriksima

^a –koeficijent varijacije je dobiven uz mjerenje Se u uzorku pšeničnog brašna; ^b -AS -anorganski Se tj. SeO₂; ^c -OS -organski Se tj. seleno-L-metionin

Tablica 6 Koncentracija ukupnog selenija u namirnicama s ispitivanog područja (Slavonski Kobaš), kontrolne lokacije (Ivanovci), te u kupovnim namirnicama (Osijek)

Namirnica	Prosječan udio Se (ng/g originalne namirnice) $\pm$ SD		
	Slavonski Kobaš	Ivanovci	Osijek
VOĆE			
Jabuka	8,79 $\pm$ 1,57 (n=2)	7,83 $\pm$ 0,19 (n=2)	
Šljive	8,70 $\pm$ 0,91 (n=2)	8,97 $\pm$ 2,03 (n=2)	
Grožđe	12,86 $\pm$ 3,55 (n=2)	8,87 $\pm$ 0,01 (n=2)	
Breskva	11,04 $\pm$ 3,50 (n=2)		
Mandarina			9,62 $\pm$ 0,13 (n=2)
Naranča			7,59 $\pm$ 1,47 (n=2)
Banana			20,31 $\pm$ 0,64 (n=2)
Kiwi			11,43 $\pm$ 0,07 (n=2)
Orah	46,06 $\pm$ 15,49 (n=2)		
Kikiriki			610,74 $\pm$ 118,48 (n=2)
POVRĆE			
Grah	48,49 $\pm$ 14,89 (n=4)	33,69 $\pm$ 1,91 (n=2)	
Grašak	13,36 $\pm$ 2,18 (n=2)	10,08 $\pm$ 0,60 (n=2)	
Mahune	9,61 $\pm$ 0,34 (n=2)	7,10 $\pm$ 0,02 (n=2)	
Cvjetača	24,37 $\pm$ 5,64 (n=2)	24,89 $\pm$ 7,19 (n=2)	
Kupus, svježi	66,09 $\pm$ 5,56 (n=2)	8,25 $\pm$ 0,45 (n=2)	
Kupus, kiseli	29,61 $\pm$ 6,25 (n=2)	10,16 $\pm$ 0,49 (n=2)	
Paprika, svježa	9,12 $\pm$ 1,31 (n=2)	11,42 $\pm$ 2,11 (n=2)	
Paprika, kisela	8,54 $\pm$ 1,66 (n=2)	6,51 $\pm$ 0,92 (n=2)	
Krastavac, svježi	11,54 $\pm$ 2,66 (n=2)	6,28 $\pm$ 1,26 (n=2)	
Krastavac, kiseli	9,40 $\pm$ 0,72 (n=2)	6,32 $\pm$ 0,99 (n=2)	
Mrkva	19,56 $\pm$ 0,24 (n=2)	8,12 $\pm$ 1,21 (n=2)	
Crveni luk	15,29 $\pm$ 1,75 (n=2)	12,39 $\pm$ 0,66 (n=2)	
Češnjak	34,22 $\pm$ 5,08 (n=2)	57,57 (n=1)	
Peršin	17,62 $\pm$ 1,21 (n=2)	9,01 $\pm$ 0,44 (n=2)	
Krumpir	9,48 $\pm$ 1,29 (n=3)	7,21 $\pm$ 0,76 (n=2)	
Rajčica	7,91 $\pm$ 3,23 (n=2)	10,18 $\pm$ 0,13 (n=2)	
Cikla	11,14 $\pm$ 1,15 (n=2)	8,58 $\pm$ 1,65 (n=2)	
Celer	14,73 $\pm$ 0,65 (n=2)		
Šampinjoni			151,56 $\pm$ 6,77 (n=2)
Zelena salata			14,53 $\pm$ 1,24 (n=2)
Kelj			25,59 $\pm$ 0,59 (n=2)
KRUH, TIJESTO I ŽITARICE			
Pšenično brašno	58,82 $\pm$ 5,05 (n=4)	56,27 $\pm$ 4,42 (n=3)	
Kruh, bijeli	47,72 $\pm$ 3,71 (n=3)	45,65 $\pm$ 5,28 (n=2)	
Tjestenina			43,76 $\pm$ 11,08 (n=4)
Grickalice			34,22 $\pm$ 14,65 (n=2)
Kukuruzni griz	114,23 $\pm$ 79,98 (n=4)	38,13 $\pm$ 0,99 (n=2)	
Riža			40,50 $\pm$ 9,60 (n=2)

Tablica 6 -Nastavak

Namirnica	Prosječan udio Se (ng/g originalne namirnice) ± SD		
	Slavonski Kobaš	Ivanovci	Osijek
JAJA, MLIJEKO I PROIZVODI			
Mlijeko, punomasno	40,90 ± 22,93 (n=3)	18,86 ± 6,29 (n=2)	
Mlijeko, 1,0% m.m.			16,93 ± 1,07 (n=2)
Mlijeko, 2,8% m.m.			28,67 ± 0,98 (n=2)
Mlijeko, 3,6% m.m.			28,20 ± 2,31 (n=2)
Sir, kravliji svježi	53,41 ± 2,53 (n=3)	39,92 ± 3,79 (n=2)	
Sir, trapist			72,61 ± 7,82 (n=2)
Sir, krem, namaz			35,73 ± 6,70 (n=2)
Vrhnje ^a	44,06 ± 22,88 (n=3)		48,47 ± 13,61 (n=2)
Jogurt, 3,2% m.m.			29,85 ± 10,39 (n=2)
Jaje, kokoške cijelo	177,27 ± 101,26 (n=3)	52,54 ± 9,72 (n=2)	
MESO I PROIZVODI			
Kobasica	198,73 ± 41,88 (n=5)	116,13 ± 17,68 (n=2)	
Krvavica	154,36 ± 0,23 (n=2)	158,27 (n=1)	
Šunka	183,49 ± 35,87 (n=2)	105,38 ± 11,29 (n=2)	
Slanina	89,53 ± 45,96 (n=2)	52,90 ± 1,23 (n=2)	
Čvarci	121,34 ± 64,31 (n=2)	129,55 ± 4,59 (n=2)	
Junetina	131,05 ± 14,42 (n=2)	75,88 ± 6,12 (n=2)	
Piletina	162,81 ± 20,34 (n=2)	115,34 ± 13,94 (n=2)	
Puretina	218,10 ± 10,79 (n=2)	150,73 ± 18,83 (n=2)	
Svinjetina	158,12 ± 15,34 (n=2)	129,93 ± 2,59 (n=2)	
Pileće srce	254,89 ± 71,60 (n=2)	164,83 ± 6,51 (n=2)	
Pileća jetra	298,11 ± 29,84 (n=2)	197,34 ± 5,93 (n=2)	
Pileći želudac	221,18 ± 19,24 (n=2)	177,27 ± 18,23 (n=2)	
Svinjska jetra	284,90 ± 1,91 (n=2)	234,95 ± 22,63 (n=2)	
Svinjsko srce		202,09 (n=1)	
Šunka, prešana			106,51 ± 0,09 (n=2)
Salama			118,41 ± 8,80 (n=2)
Pašteta			94,43 ± 16,90 (n=3)
Narezak			85,53 ± 23,76 (n=2)
Hrenovke			68,65 ± 16,99 (n=2)
Sardine, konzervirane			570,95 ± 22,03 (n=2)
Tuna, konzervirana			859,23 ± 101,59 (n=2)
Šaran	169,76 ± 13,39 (n=2)	166,12 ± 14,89 (n=2)	
Babuška	183,96 ± 12,52 (n=2)	225,66 ± 18,53 (n=2)	
SLATKIŠI			
Čokolada, mliječna			45,05 ± 7,49 (n=2)
JUHE IZ VREĆICE			
Podravska juha			49,21 (n=1)
Goveđa juha			126,28 (n=1)
Krem juha od šparoga			27,68 (n=1)

^a -uzorci domaćeg vrhnja su imali opseg udjela masti od 26 do 40%, dok su kupovni uzorci imali 20% m.m.

Tablica 7 Koncentracija selenija u tlu s ispitivanog i kontrolnog područja*

	Količina Se (ng/g suhog uzorka) $\pm$ SD
Endemsko područje (n=3)	578,60 $\pm$ 53,62 ^a
Kontrolno područje (n=2)	440,68 $\pm$ 27,29

* Endemsko područje: Slavonski Kobaš; Kontrolno područje: Ivanovci i Zelčin

^a Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolno područje (p<0,01)

Tablica 8 Osnovne značajke ispitanica i ispitanika

Skupina	Dob (godine)		BMI (kg/m ²)*	
	Opseg	$\bar{X} \pm SD$	Opseg	$\bar{X} \pm SD$
IC ž (n=20)	20 - 60	40 $\pm$ 13	18 - 35	25 $\pm$ 4
IC m (n=7)	19 - 62	44 $\pm$ 17	21 - 28	25 $\pm$ 3
IC u (n=27)	19 - 62	41 $\pm$ 14	18 - 35	25 $\pm$ 4
SKEN ž (n=7)	40 - 75	63 $\pm$ 11	19 - 35	26 $\pm$ 5
SKEN m (n=6)	57 - 70	64 $\pm$ 6	23 - 28	25 $\pm$ 2
SKEN u (n=13)	40 - 75	64 $\pm$ 9	19 - 35	26 $\pm$ 4
SKOB ž (n=31)	22 - 70	43 $\pm$ 13	19 - 43	25 $\pm$ 5
SKOB m (n=15)	18 - 69	44 $\pm$ 15	23 - 31	26 $\pm$ 3
SKOB u (n=46)	18 - 70	43 $\pm$ 14	19 - 43	26 $\pm$ 5
SKKO ž (n=37)	17 - 74	41 $\pm$ 14	19 - 35	25 $\pm$ 4
SKKO m (n=14)	18 - 73	41 $\pm$ 17	21 - 29	24 $\pm$ 3
SKKO u (n=51)	17 - 74	41 $\pm$ 15	19 - 35	25 $\pm$ 4

* -BMI = masa (kg) / visina² (m²); ž –žene; m –muškarci; u –ukupno; SK –endemska sela Slavonski Kobaš, Bebrina i Kaniža; IC –kontrolna sela Ivanovci i Zelčin; EN –pacijent s dijagnosticiranom endemskom nefropatijom; OB –član obitelji pacijenta; KO –kontrola iz endemskih sela

Tablica 9 Pojedinačni dnevni unos energije, osnovnih hranjivih tvari, te selenija ispitanica i ispitanika

Ispitanik / -ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (μg)
IC01ž	9,2	75,0	97,2	34,7	37,6	22,2	15,1	290,1	26,6	0	39,5
IC02ž	10,1	78,1	77,9	26,4	26,8	22,4	19,5	361,1	33,7	0	44,4
IC03ž	17,9	141,1	199,6	70,1	66,9	60,5	48,5	513,3	60,2	0	89,8
IC04ž	11,0	73,8	100,4	31,0	33,9	32,2	30,8	363,5	33,2	0	45,7
IC05ž	8,7	71,6	102,8	35,5	37,1	22,9	19,3	230,4	26,0	0	45,5
IC06ž	14,3	108,0	136,4	46,7	57,0	39,7	36,9	479,8	43,3	0	66,3
IC07ž	11,7	97,2	137,8	47,4	51,5	31,5	29,1	321,1	31,1	0	64,4
IC08ž	10,6	76,9	117,9	43,1	40,0	35,7	33,5	297,9	26,8	0,7	47,9
IC09ž	11,0	89,1	139,1	52,2	47,4	34,9	32,3	271,6	26,1	0	56,2
IC10ž	12,0	86,6	141,0	38,5	41,5	59,6	51,0	319,7	53,6	0	48,5
IC11ž	12,7	110,7	134,0	55,6	49,0	22,8	18,2	401,4	40,7	0	78,6
IC12ž	7,0	48,4	68,4	25,7	24,2	15,4	12,7	228,8	26,9	0	33,7
IC13ž	11,9	91,2	130,1	50,5	65,0	19,1	13,8	341,1	47,9	0,1	49,2
IC14ž	9,0	60,6	102,0	33,7	41,3	30,4	26,6	253,4	30,1	0	35,8
IC15ž	7,8	60,7	75,8	29,7	27,9	14,6	12,5	242,9	27,1	0,2	34,6
IC16ž	12,4	105,4	150,3	62,2	59,5	18,6	12,7	366,2	32,6	0	61,2
IC17ž	8,3	71,6	79,7	34,4	32,6	11,6	9,1	251,4	20,2	0	42,7
IC18ž	11,6	100,8	113,7	47,5	45,1	19,6	14,8	347,7	31,4	0	57,4
IC19ž	9,0	79,6	110,2	46,3	50,6	11,9	8,4	222,1	19,6	0	43,2
IC20ž	6,0	45,8	63,8	13,5	19,7	28,9	27,7	176,2	21,4	0	27,9
IC01m	16,7	139,1	196,0	59,5	71,7	63,0	53,7	441,3	50,4	2,9	107,6
IC02m	11,1	94,0	97,9	36,7	36,1	21,6	17,1	351,2	30,8	2,9	53,3
IC03m	19,5	141,7	101,7	29,5	27,6	42,2	39,7	802,4	59,8	2,9	80,7
IC04m	9,7	66,9	70,6	27,2	25,6	14,9	13,3	349,6	36,6	10,7	41,6
IC05m	14,0	100,2	109,5	46,6	47,5	15,2	11,2	504,4	34,6	0	62,0
IC06m	12,0	109,6	145,5	58,0	54,1	14,8	10,5	310,1	24,3	0,7	63,1
IC07m	20,1	172,0	224,5	97,4	112,8	29,2	22,8	563,8	63,0	0	102,3

Tablica 9 -Nastavak

Ispitanik /-ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (µg)
SKen01ž	9,6	66,1	100,4	35,1	35,4	27,7	22,5	296,7	29,4	0	44,5
SKen02ž	4,9	31,6	34,0	12,6	8,7	7,1	6,2	185,3	9,6	0	21,6
SKen01ž	9,6	66,1	100,4	35,1	35,4	27,7	22,5	296,7	29,4	0	44,5
SKen02ž	4,9	31,6	34,0	12,6	8,7	7,1	6,2	185,3	9,6	0	21,6
SKen03ž	9,8	58,4	73,8	21,6	23,4	27,5	24,8	371,4	31,7	0	52,1
SKen04ž	4,9	40,2	59,6	25,4	23,4	9,7	7,2	125,3	9,7	0	29,5
SKen05ž	7,7	53,6	70,6	29,1	29,7	8,4	5,8	256,5	30,3	0,3	44,1
SKen06ž	5,7	38,8	59,1	24,9	24,4	9,6	6,9	174,4	17,5	0	36,0
SKen07ž	5,1	35,7	55,8	18,4	17,2	20,2	18,6	148,8	13,3	0	43,6
SKen01m	15,3	125,4	159,5	59,8	57,3	31,7	24,5	429,2	40,8	16,2	92,8
SKen02m	14,9	75,4	256,4	99,7	106,2	39,3	36,6	244,3	16,2	0	81,8
SKen03m	7,7	57,0	68,1	22,0	23,5	21,4	18,5	250,5	28,5	5,7	52,2
SKen04m	6,2	48,8	49,6	20,8	19,8	7,8	6,0	214,6	27,9	1,1	33,9
SKen05m	10,6	83,4	104,9	44,3	46,8	14,3	10,8	307,4	27,5	6,2	64,5
SKen06m	11,4	87,9	107,9	32,0	36,7	36,8	30,3	341,8	39,3	7,8	64,0
SKob01ž	13,4	91,6	177,9	60,0	61,4	53,3	48,6	352,5	32,5	6,4	68,8
SKob02ž	4,5	37,9	42,7	12,6	13,9	15,0	13,3	135,7	22,1	0	32,7
SKob03ž	11,9	94,0	135,8	46,8	53,1	31,0	26,8	322,1	40,1	0	67,9
SKob04ž	12,7	82,1	169,0	58,5	60,0	53,8	49,3	310,0	27,3	0	65,3
SKob05ž	14,7	105,8	164,6	59,7	60,9	34,0	26,5	454,5	36,7	0	83,4
SKob06ž	16,4	107,8	196,5	69,9	78,7	42,9	35,9	441,3	26,5	0	101,1
SKob07ž	10,7	85,4	108,1	39,0	40,1	23,2	17,5	330,5	32,8	0	76,5
SKob08ž	13,0	99,1	132,1	45,6	53,4	32,6	30,3	337,1	51,7	0	84,9
SKob09ž	16,5	135,6	151,0	52,0	54,2	42,9	37,9	503,6	46,0	11,9	107,4
SKob10ž	8,2	70,5	88,2	31,9	30,9	24,5	20,8	234,7	26,9	0	60,3
SKob11ž	13,7	92,0	152,9	60,6	56,4	28,1	21,7	393,4	38,3	0	83,4
SKob12ž	12,8	86,0	164,8	51,2	51,6	65,9	60,0	321,7	34,1	10,7	73,3

Tablica 9 -Nastavak

Ispitanik / -ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (μg)
SKob13ž	15,5	112,2	171,0	59,8	62,2	35,7	27,7	450,4	39,0	0	84,5
SKob14ž	11,1	84,9	132,4	44,6	49,9	30,6	25,5	285,6	24,5	0	64,8
SKob15ž	10,3	67,6	105,8	32,7	40,4	21,4	18,2	321,6	36,5	0,5	60,1
SKob16ž	9,1	71,8	83,4	36,6	33,5	10,8	7,5	303,3	20,0	3,6	55,5
SKob17ž	10,8	74,3	135,3	53,8	61,2	19,1	15,2	278,5	40,7	0	74,6
SKob18ž	15,6	97,0	169,5	33,9	40,4	92,3	83,1	470,2	56,9	0	96,9
SKob19ž	13,3	101,4	143,5	63,7	58,5	15,9	11,1	379,0	37,8	8,6	85,0
SKob20ž	8,1	66,4	99,6	38,9	41,0	19,4	15,7	195,2	21,3	1,3	64,0
SKob21ž	8,2	60,5	80,3	33,1	32,3	11,3	7,8	252,7	26,0	1,9	46,8
SKob22ž	9,6	68,0	87,8	33,3	35,9	17,4	14,0	318,3	33,0	0	57,9
SKob23ž	13,8	75,2	160,4	68,0	66,1	23,6	19,7	401,8	36,0	0	67,9
SKob24ž	13,6	115,7	131,0	50,0	53,1	25,2	18,7	409,8	49,1	0	98,1
SKob25ž	10,3	60,2	128,2	52,1	54,0	22,3	18,8	275,7	28,3	0	52,8
SKob26ž	12,8	94,0	166,5	69,8	71,5	25,0	19,3	304,8	29,7	0	97,7
SKob27ž	9,8	63,6	96,9	27,7	30,5	39,1	33,9	310,8	22,9	0	44,1
SKob28ž	12,7	97,0	193,1	76,7	84,4	27,9	22,0	238,1	27,0	0	77,2
SKob29ž	11,7	84,6	131,4	50,5	54,1	20,0	16,4	330,1	31,2	0	79,3
SKob30ž	17,0	134,7	234,8	92,2	105,3	38,6	32,0	361,4	34,6	0	112,9
SKob31ž	6,2	47,1	64,8	21,4	24,0	18,6	16,5	183,7	18,6	0	42,8
SKob01m	17,1	136,4	252,7	91,1	104,0	46,2	40,4	327,9	27,5	0	113,1
SKob02m	12,2	92,8	136,9	48,0	51,5	31,2	26,0	339,0	32,7	2,9	88,9
SKob03m	16,2	109,3	180,3	67,6	69,2	35,5	26,6	456,4	46,5	7,9	86,4
SKob04m	14,8	129,3	155,2	60,1	54,6	32,2	22,7	361,9	24,4	30,0	95,4
SKob05m	18,4	119,1	204,3	65,5	70,3	71,8	61,9	457,0	48,7	48,1	89,9
SKob06m	19,8	158,0	180,3	70,2	81,8	30,8	24,4	602,2	57,0	15,2	122,1
SKob07m	22,4	160,3	266,7	102,3	122,7	39,3	29,5	606,4	61,7	0	128,1
SKob08m	6,2	46,5	68,6	29,0	29,4	9,7	7,5	143,6	15,7	17,9	44,7

Tablica 9 -Nastavak

Ispitanik /-ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (µg)
SKob09m	15,5	114,2	162,1	61,2	76,7	27,7	21,4	456,7	40,1	10,2	88,6
SKob10m	9,8	66,8	107,7	43,5	47,3	14,8	12,2	252,7	24,7	19,1	59,6
SKob11m	9,4	73,0	112,0	46,3	50,2	12,6	8,6	245,5	20,3	0	54,7
SKob12m	15,5	114,6	178,7	46,1	63,9	68,3	63,8	404,4	53,0	10,7	118,9
SKob13m	20,8	113,1	208,5	87,2	86,5	32,2	27,0	629,3	54,0	28,6	90,4
SKob14m	13,7	111,5	145,9	57,1	53,5	33,4	29,5	388,1	35,2	0	115,4
SKob15m	9,4	61,0	112,5	42,0	49,3	15,9	13,4	248,2	32,2	3,6	56,8
SKko01ž	9,7	65,3	98,7	32,1	37,1	26,2	21,3	303,8	30,3	0	55,3
SKko02ž	14,1	116,5	170,4	48,7	50,7	86,4	76,6	362,9	40,1	0	85,5
SKko03ž	10,9	81,2	121,7	40,6	44,7	32,9	29,1	301,5	28,6	3,6	70,3
SKko04ž	10,0	66,4	65,2	23,5	21,7	19,8	17,1	400,3	47,1	0,8	53,8
SKko05ž	17,5	136,0	185,7	72,4	70,6	39,5	33,5	512,0	55,1	0	112,2
SKko06ž	11,0	86,5	121,4	44,8	47,4	26,8	24,2	315,3	36,3	0	88,0
SKko07ž	10,4	72,5	116,0	42,9	41,9	28,2	25,3	298,8	32,2	1,3	66,4
SKko08ž	7,3	53,8	87,5	31,3	34,1	20,0	16,4	190,5	19,4	0	46,5
SKko09ž	10,7	69,7	64,7	21,8	22,0	17,3	15,5	428,8	35,9	0	54,9
SKko10ž	8,6	63,1	86,0	30,6	28,1	28,9	24,6	262,0	25,5	0	59,2
SKko11ž	10,1	86,9	98,1	35,6	37,0	23,0	18,8	308,1	32,0	0	68,7
SKko12ž	12,1	87,5	141,3	40,5	51,5	40,8	37,5	365,0	38,9	1,3	76,3
SKko13ž	11,6	80,7	124,7	43,4	43,8	38,1	35,3	366,3	46,6	0	79,5
SKko14ž	14,3	99,3	153,0	55,7	66,8	32,0	27,3	446,1	50,1	0	76,1
SKko15ž	16,1	128,8	159,5	65,6	63,9	26,0	18,0	511,5	52,8	0	109,0
SKko16ž	8,6	66,6	89,1	37,3	33,9	15,0	12,0	253,3	24,9	1,2	60,2
SKko17ž	6,9	57,4	78,8	32,2	36,9	12,3	9,5	183,7	19,0	0	47,1
SKko18ž	11,3	89,6	126,6	50,9	50,3	23,1	17,7	324,8	38,3	1,5	75,9
SKko19ž	11,1	75,5	139,5	53,7	58,6	27,3	21,8	287,6	32,9	0	60,1
SKko20ž	10,8	85,2	112,1	47,0	52,7	11,8	8,0	322,0	25,2	0,3	54,1

Tablica 9 -Nastavak

Ispitanik /-ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (µg)
SKko21ž	8,9	81,9	85,2	36,4	36,7	13,5	10,5	263,5	25,0	0	62,5
SKko22ž	8,1	53,6	81,2	28,9	34,4	15,1	11,7	259,5	25,8	0	35,7
SKko23ž	10,0	86,6	114,1	48,6	48,6	16,7	13,3	265,0	33,3	0	73,7
SKko24ž	9,7	84,6	92,9	35,5	37,5	18,1	15,1	280,5	29,5	7,3	95,8
SKko25ž	8,8	66,5	115,3	42,4	46,7	23,1	20,0	248,6	25,9	0	58,5
SKko26ž	4,4	25,2	64,4	23,9	29,7	9,3	7,6	99,1	13,5	0,3	22,3
SKko27ž	4,4	33,5	37,0	16,2	14,0	4,5	3,3	151,4	16,4	0	28,6
SKko28ž	10,5	65,0	88,9	32,3	35,3	20,7	15,3	377,2	60,5	0	60,1
SKko29ž	16,4	123,1	137,2	57,9	54,1	23,5	18,4	568,4	82,1	0	107,8
SKko30ž	13,2	99,0	193,0	77,4	88,1	24,4	17,5	302,9	31,0	1,4	86,4
SKko31ž	11,3	90,6	117,5	43,8	46,5	27,6	22,3	329,7	36,4	0	64,3
SKko32ž	10,6	85,2	112,2	40,2	38,8	28,6	25,5	324,8	31,2	0	68,4
SKko33ž	14,1	85,1	125,5	46,2	39,0	41,8	39,4	488,8	66,6	0	84,2
SKko34ž	6,7	58,1	55,3	21,2	17,9	17,4	15,6	219,8	27,0	0	53,1
SKko35ž	11,7	107,4	137,5	40,6	48,8	45,4	39,1	293,1	48,1	0	119,1
SKko36ž	9,2	70,0	76,6	21,1	23,1	29,5	26,2	318,9	50,4	0	67,2
SKko37ž	10,4	76,6	123,8	40,7	42,5	37,0	34,1	308,0	30,0	3,8	73,1
SKko01m	14,5	131,1	177,5	62,3	68,9	33,2	30,7	346,7	26,2	0,8	97,9
SKko02m	18,3	121,2	133,9	47,5	40,9	23,9	20,2	697,3	92,9	1,8	121,5
SKko03m	24,2	188,3	269,4	95,8	102,6	55,2	43,0	726,1	66,0	5,4	147,3
SKko04m	18,4	159,6	172,3	47,2	59,3	63,6	59,6	537,9	71,7	16,3	132,8
SKko05m	15,6	100,7	159,1	49,7	58,9	33,4	27,7	405,1	45,0	45,4	74,9
SKko06m	12,1	88,4	137,8	43,3	48,3	43,6	38,4	324,4	31,7	4,5	68,8
SKko07m	15,4	125,6	186,2	60,5	75,1	54,1	46,4	385,3	32,5	12,5	112,6
SKko08m	13,9	111,8	164,0	64,6	62,1	24,3	19,9	297,6	22,7	40,0	121,1
SKko09m	20,5	167,0	222,0	86,7	91,9	37,3	29,1	567,7	56,4	11,9	164,1
SKko10m	12,9	85,2	116,0	38,2	36,5	42,2	39,8	441,6	65,0	0	86,9

Tablica 9 -Nastavak

Ispitanik /-ica	Energija (MJ)	Proteini (g)	Masti (g)	ZMK (g)	JMK (g)	VMK (g)	LOK (g)	Ugljikoh. (g)	Vlakna (g)	Alkohol (g)	Se (μg)
SKko11m	10,5	81,8	131,4	47,1	56,5	24,3	21,1	250,7	25,9	2,9	86,0
SKko12m	12,0	98,4	93,9	31,1	36,6	23,4	20,1	415,0	49,6	0	121,9
SKko13m	16,7	112,0	191,6	51,8	61,1	42,9	37,4	447,3	46,5	12,5	107,2
SKko14m	11,8	98,0	93,4	38,1	39,1	19,5	16,1	384,8	39,2	15,5	73,5

SK –endemska sela Slavonski Kobaš, Bebrina i Kaniža; IC –kontrolna sela Ivanovci i Zelčin; EN –pacijent s dijagnosticiranom endemskom nefropatijom; OB –član obitelji pacijenta; KO –kontrola iz endemskih sela; ZMK –zasićene masne kiseline; JMK –jednostruko nezasićene masne kiseline; VMK –višestruko nezasićene masne kiseline; LOK –linolna kiselina

Tablica 10 Srednji dnevni unos energije i osnovnih hranjivih tvari pojedinih skupina ispitanika

Skupina	Energija (MJ)	Bjelanč.		Masti		ZMK		JMK		VMK		LOK		Ugljikoh.		Vlakn. (g)	Alko. (g)
		(g)	% E	(g)	% E	(g)	% E	(g)	% E	(g)	% E	(g)	% E	(g)	% E		
IC ž (n=20)	10,6	83,6	13	114,0	41	41,2	15	42,7	15	27,7	10	23,6	8	314,0	50	32,9	0,05
IC m (n=7)	14,7	117,6	13	135,1	35	50,7	13	53,6	14	28,7	7	24,0	6	474,7	54	42,8	2,9
IC u (n=27)	11,7	92,4	13	119,4	38	43,7	14	45,6	15	28,0	9	23,7	8	355,6	51	35,5	0,8
SKEN ž (n=7)	6,8	46,3	11	64,8	36	23,9	13	23,2	13	15,7	9	13,1	7	222,6	55	20,2	0,04
SKEN m (n=6)	11,0	79,7	12	124,4	43	46,4	16	48,4	17	25,2	9	21,1	7	298,0	45	30,0	6,2
SKEN u (n=13)	8,8	61,7	12	92,3	40	34,3	15	34,8	15	20,1	9	16,8	7	257,4	49	24,7	2,9
SKOB ž (n=31)	11,9	85,9	12	135,5	43	49,2	16	52,0	16	31,0	10	26,2	8	329,3	46	33,2	1,4
SKOB m (n=15)	14,7	107,1	12	164,8	42	61,1	16	67,4	17	33,4	9	27,7	7	394,6	45	38,2	12,9
SKOB u (n=46)	12,8	92,8	12	145,0	43	53,1	16	57,0	17	31,8	9	26,7	8	350,6	46	34,8	5,2
SKKO ž (n=37)	10,6	80,0	13	110,7	39	40,6	14	42,6	15	26,3	9	22,3	8	320,1	51	36,3	0,6
SKKO m (n=14)	15,5	119,2	13	160,6	39	54,6	13	59,8	15	37,2	9	32,1	8	444,8	48	48,0	12,1
SKKO u (n=51)	11,9	90,8	13	124,4	39	44,5	14	47,3	15	29,3	9	25,0	8	354,3	50	39,5	3,8

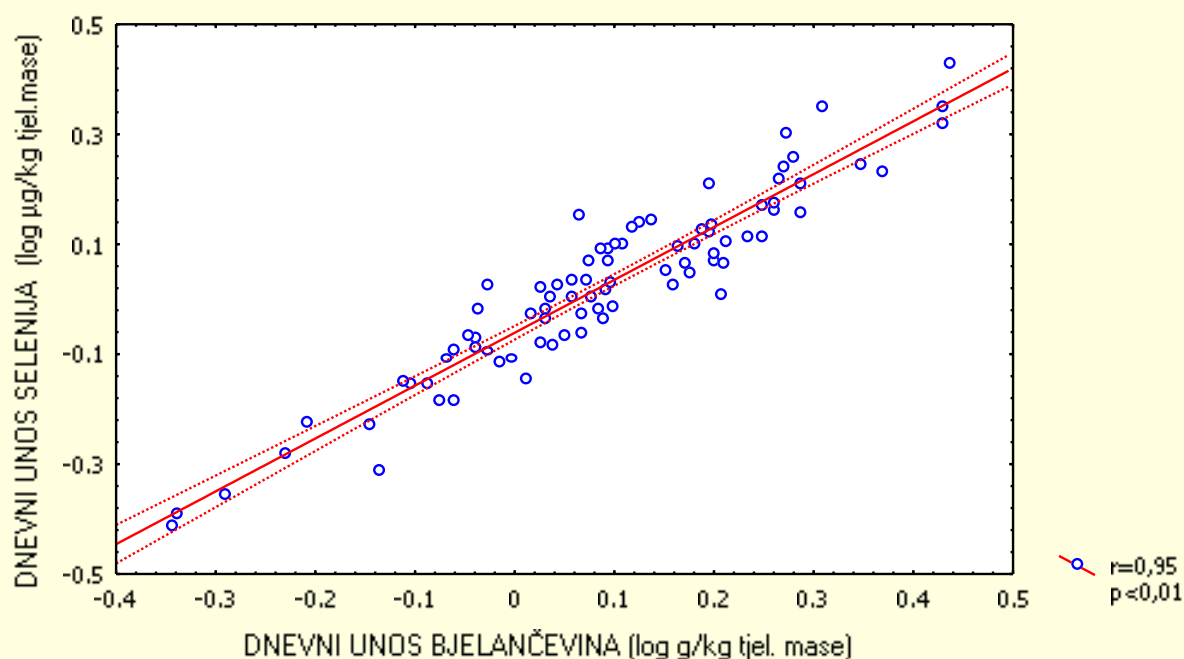
ž –žene; m –muškarci; u –ukupno; SK –endemska sela Slavonski Kobaš, Bebrina i Kaniža; IC –kontrolna sela Ivanovci i Zelčin; EN –pacijent s dijagnosticiranom endemskom nefropatijom; OB –član obitelji pacijenta; KO –kontrola iz endemskih sela; ZMK –zasićene masne kiseline; JMK –jednostruko nezasićene masne kiseline; VMK –višestruko nezasićene masne kiseline; LOK –linolna kiselina; % E –postotak dnevnog energijskog unosa

Tablica 11 Prosječni dnevni unos selenija pojedinih skupina ispitanika

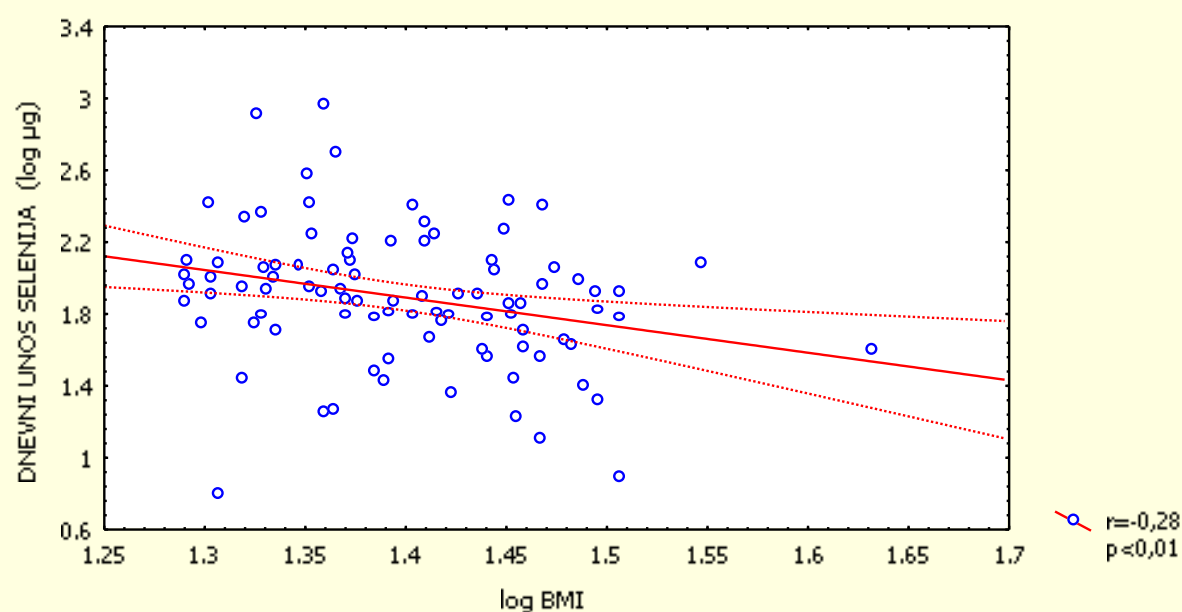
Skupina	Dnevni unos Se (μg)		% Preporuka*	$\mu\text{g} / \text{kg} / \text{dan} \pm \text{SD}$
	Opseg	$\bar{X} \pm \text{SD}$		
IC ž (n=20)	27,9 – 89,8	50,6 $\pm$ 15,5	92	0,78 $\pm$ 0,31
IC m (n=7)	41,6 – 107,6	72,9 $\pm$ 24,9	133	0,94 $\pm$ 0,38
IC u (n=27)	27,9 – 107,6	56,4 $\pm$ 20,4	103	0,82 $\pm$ 0,33
SKEN ž (n=7)	21,6 – 52,1	38,8 $\pm$ 10,4	71	0,55 $\pm$ 0,13
SKEN m (n=6)	33,9 – 92,8	64,9 $\pm$ 20,9	118	0,87 $\pm$ 0,32
SKEN u (n=13)	21,6 – 92,8	50,8 $\pm$ 20,5	92	0,70 $\pm$ 0,28
SKOB ž (n=31)	32,7 – 112,9	73,2 $\pm$ 19,7	133	1,13 $\pm$ 0,41
SKOB m (n=15)	44,7 – 128,1	90,2 $\pm$ 26,5	164	1,10 $\pm$ 0,31
SKOB u (n=46)	32,7 – 128,1	78,7 $\pm$ 23,3	143	1,12 $\pm$ 0,38
SKKO ž (n=37)	22,3 – 119,1	69,2 $\pm$ 21,8	126	1,07 $\pm$ 0,36
SKKO m (n=14)	68,8 – 164,1	108,3 $\pm$ 28,7	197	1,51 $\pm$ 0,52
SKKO u (n=51)	22,3 – 164,1	79,9 $\pm$ 29,5	145	1,19 $\pm$ 0,45

ž –žene; m –muškarci; u –ukupno; SK –endemska sela Slavonski Kobaš, Bebrina i Kaniža; IC –kontrolna sela Ivanovci i Zelčin; EN –pacijent s dijagnosticiranom endemskom nefropatijom; OB –član obitelji pacijenta; KO –kontrola iz endemskih sela

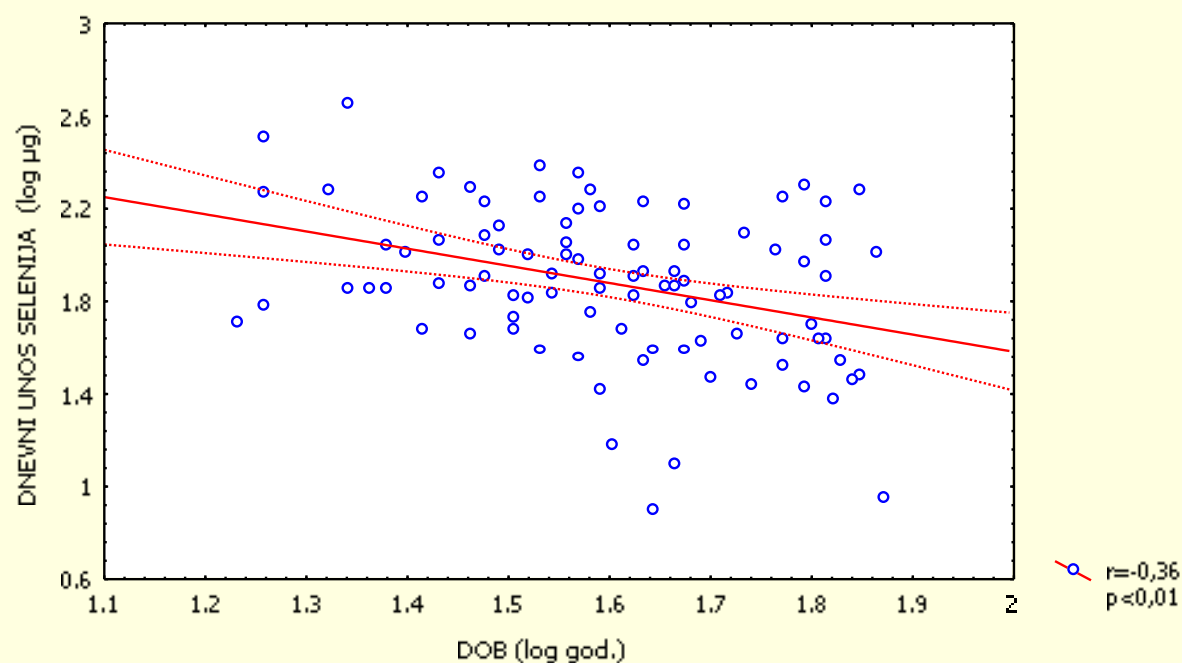
* -Preporučene vrijednosti dnevnog unosa za EU i SAD tj. 55 μg na dan za odrasle žene i muškarce ^{88, 89}



Slika 1 Odnos unosa Se s unosom bjelančevina kontrolne populacije



Slika 2 Odnos dnevnog unosa Se sa BMI-jem u endemskoj populaciji

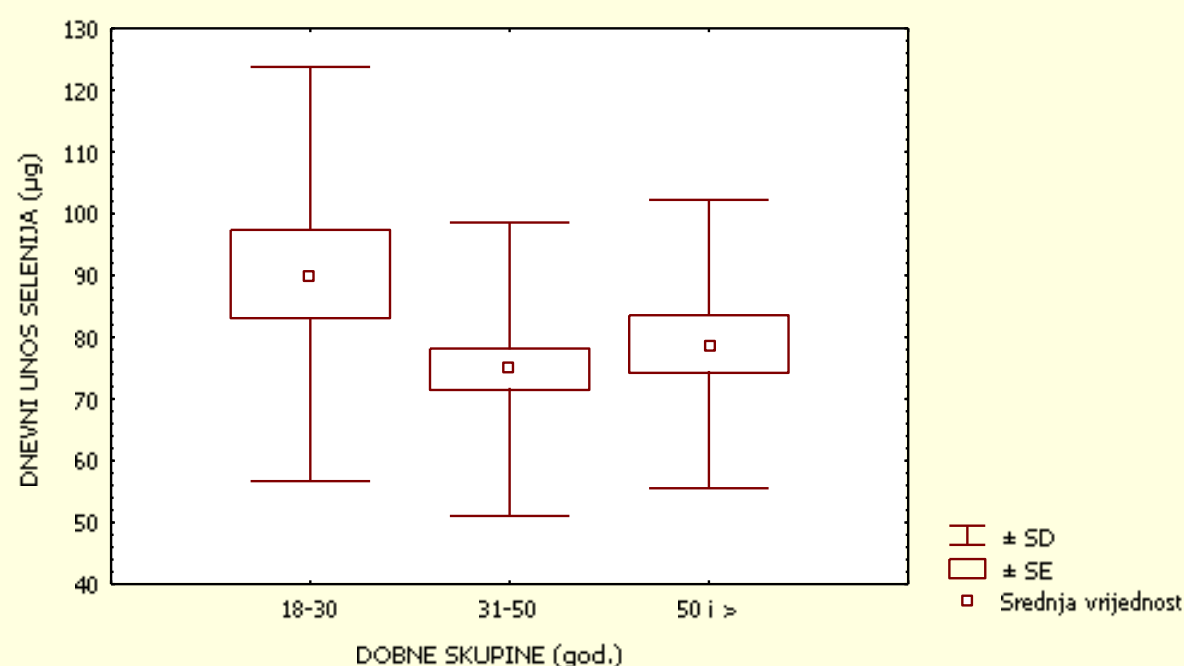


Slika 3 Odnos dnevnog unosa Se s dobi u endemskoj populaciji

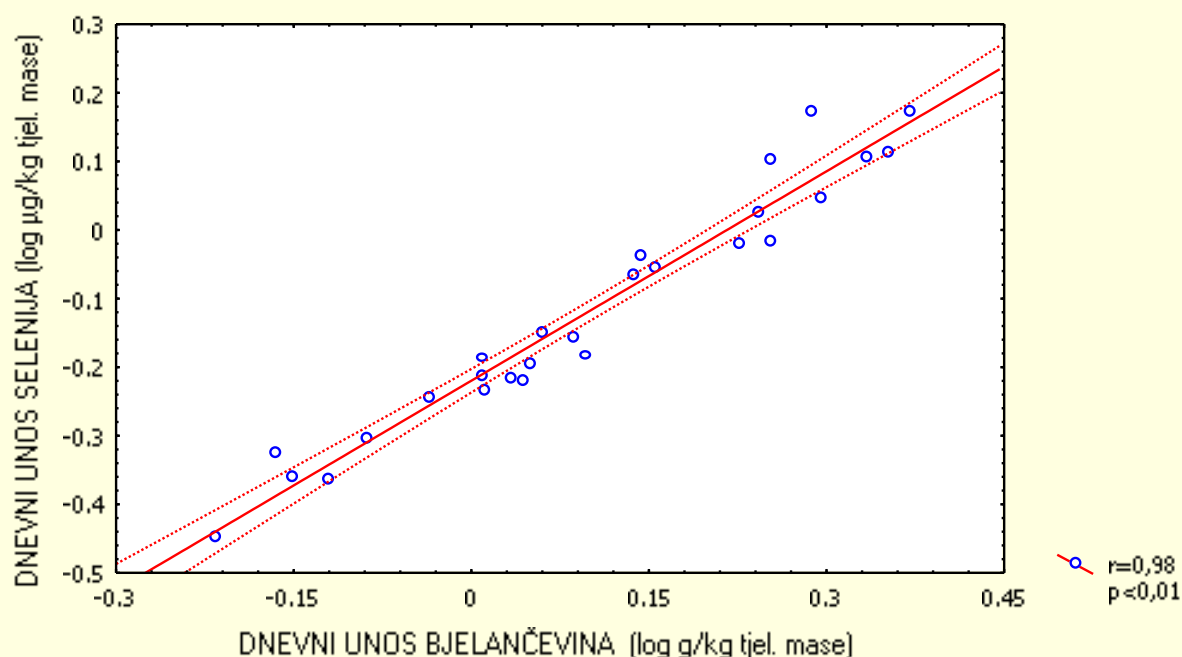
Tablica 12 Doprinos skupina namirnica ukupnom unosu selenija u skupinama ispitanika*

Skupina	Jaja		Meso		Žitarice		Mlijeko i proizv.		Riba		Povrće		Voće	
	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$	Opseg	$\bar{X}$
IC ž (n=20)	0,3 – 15,1	6,6	17,0 – 36,1	27,6	12,9 – 40,5	23,3	1,0 – 36,1	17,5	0 – 4,8	2,3	8,3 – 30,2	16,3	1,3 – 16,1	6,1
IC m (n=7)	2,9 – 22,0	11,4	10,5 – 26,4	19,5	14,2 – 66,9	27,8	6,5 – 32,9	16,8	0 – 4,0	2,2	4,8 – 22,2	11,4	2,5 – 35,4	10,7
IC u (n=27)	0,3 – 22,0	7,8	10,5 – 36,1	25,5	12,9 – 66,9	24,5	1,0 – 36,1	17,3	0 – 4,8	2,3	4,8 – 22,2	15,0	1,3 – 35,4	7,3
SKEN ž (n=7)	0,9 – 15,4	5,9	13,6 – 29,2	20,1	11,0 – 32,0	21,8	6,7 – 35,2	25,3	0 – 29,3	5,8	5,4 – 26,5	15,0	1,4 – 11,2	5,8
SKEN m (n=6)	4,5 – 20,2	10,1	20,8 – 31,3	25,3	15,5 – 35,5	24,9	1,3 – 46,7	19,1	0 – 1,5	0,8	4,0 – 22,6	14,2	0,1 – 10,8	5,5
SKEN u (n=13)	0,9 – 20,2	7,8	13,6 – 31,3	22,5	11,0 – 35,5	23,2	1,3 – 46,7	21,0	0 – 29,3	3,5	4,0 – 26,5	14,6	0,1 – 11,2	5,6
SKOB ž (n=31)	1,6 – 29,3	10,4	8,6 – 42,9	24,3	11,1 – 40,8	20,7	5,3 – 39,7	20,3	0 – 15,1	2,9	7,5 – 31,1	14,6	0,5 – 23,9	6,2
SKOB m (n=15)	0,7 – 25,3	9,6	10,4 – 46,3	28,0	13,6 – 43,3	23,3	1,3 – 36,8	14,5	0 – 13,1	4,0	4,3 – 26,9	14,5	0,6 – 19,9	5,7
SKOB u (n=46)	0,7 – 29,3	10,1	8,6 – 46,3	25,5	11,1 – 43,3	21,6	1,3 – 39,7	18,4	0 – 15,1	3,3	4,3 – 31,1	14,6	0,5 – 23,9	6,0
SKKO ž (n=37)	0,8 – 22,3	6,6	4,7 – 40,9	23,5	13,3 – 47,7	22,1	0,9 – 51,9	17,7	0 – 40,0	4,4	2,8 – 57,5	18,4	0,2 – 15,9	6,7
SKKO m (n=14)	0,5 – 21,3	7,9	12,6 – 45,7	24,9	8,5 – 36,6	20,3	0,2 – 39,7	16,0	0 – 53,3	7,7	4,5 – 26,6	13,7	0,6 – 25,0	9,4
SKKO u (n=51)	0,5 – 22,3	7,0	4,7 – 45,7	23,9	8,5 – 47,7	21,6	0,2 – 51,9	17,2	0 – 53,3	5,3	2,8 – 57,5	17,1	0,2 – 25,0	7,4

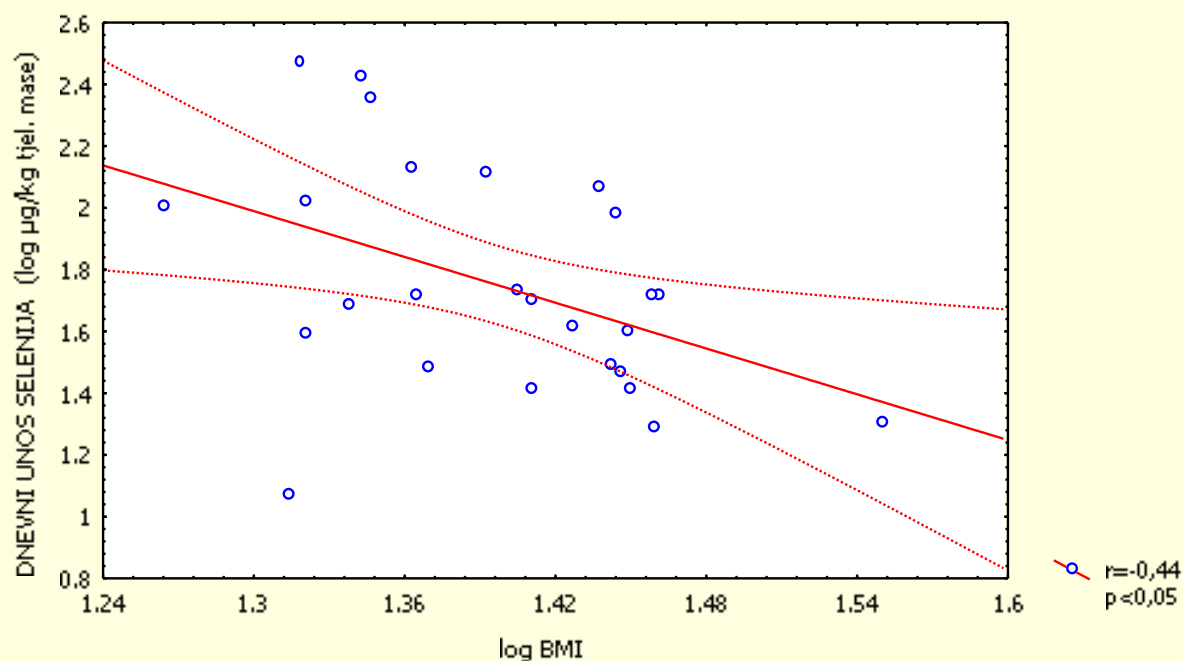
* -sve vrijednosti su dane u postotku ukupnog unosa Se; ž –žene; m –muškarci; u –ukupno; SK –endemska sela Slavonski Kobaš, Bebrina i Kaniža; IC –kontrolna sela Ivanovci i Zelčin; EN –pacijent s dijagnosticiranom endemskom nefropatijom; OB –član obitelji pacijenta; KO –kontrola iz endemskih sela



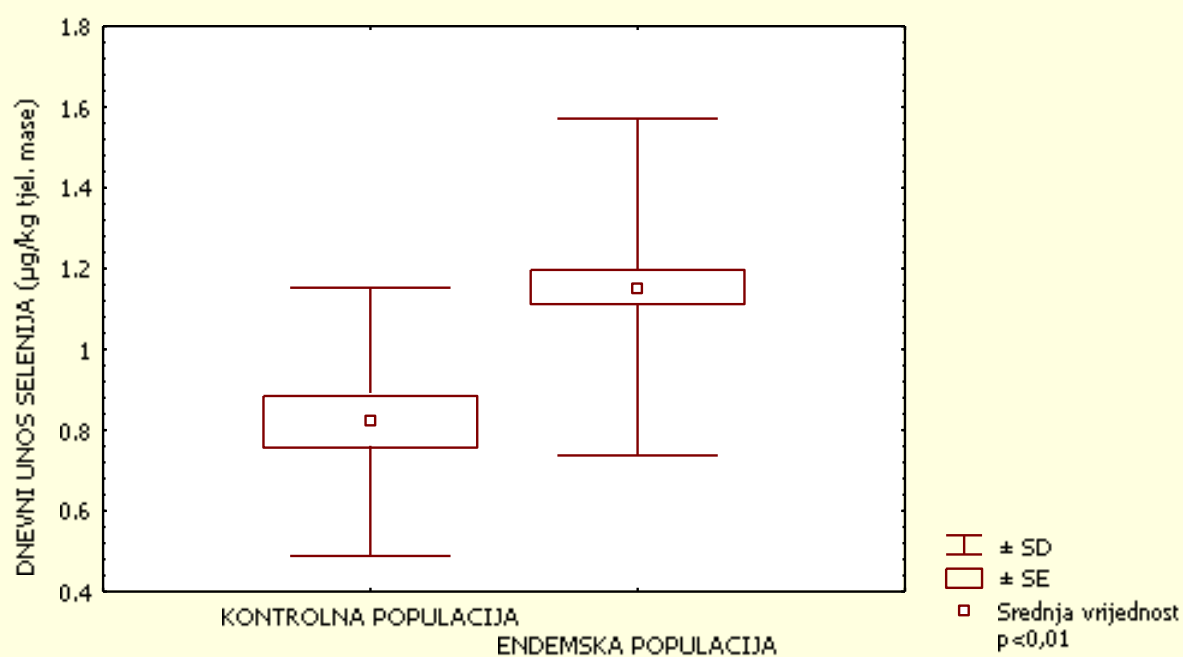
Slika 4 Dnevni unos Se u tri dobne skupine endemske populacije



Slika 5 Odnos unosa Se s unosom bjelančevina kontrolne populacije



Slika 6 Odnos dnevnog unosa Se sa BMI-jem u kontrolnoj populaciji



Slika 7 Dnevni unos selenija kontrolne i endemske populacije

5. RASPRAVA

U svrhu potvrde primijenjivosti ovdje uporabljenog upitnika učestalosti namirnica (UUN) u procjeni unosa selenija i osnovnih hranjivih sastojaka, istom je ispitana valjanost i ponovljivost uobičajenim metodama. Usporedba srednjih vrijednosti unosa ispitivane skupine dobrovoljaca za energiju, osnovne hranjive tvari, te selenij, prikazana je u **Tablici 1**. Upitnikom su za energiju i hranjive tvari dobivene 6% (zasićene masne kiseline) do 19% (prehrambena vlakna i selenij) više vrijednosti u odnosu na sedmodnevnu metodu bilježenja i vaganja (7BV). Jedino je srednja vrijednost za alkohol bila viša (5%) UUN-om. Statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti postoji samo za prehrambena vlakna i selenij. Više vrijednosti UUN-om se često dobiju usporedbom ove metode sa MBV-om (VIDI *Teorijski dio*), mada su vrijednosti dobivene ovim upitnikom veće u prosjeku samo 11%, što je na razini prihvatljivih odstupanja utvrđenih u većini drugih radova. Razlozi konzistentno viših vrijednosti upitnikom najvjerojatnije leže u greškama svojstvenim metodama bilježenja i vaganja. Iako je moguć i utjecaj underreportinga, može se pretpostaviti da bi navođenje manje količine bilo očito kako kod upitnika, tako i kod 24-hP-a kao druge referentne metode. Potankim pregledom dnevnih zapisa 7BV-a ispitanika uočava se postepeno smanjenje energijskog unosa, broja obroka, te konzumiranih jela i namirnica tijekom sedmodnevnog perioda (npr. srednji energijski unos prva dva dana bilježenja je $8,0 \pm 2,6$ MJ, a posljednja dva dana $6,9 \pm 1,7$ MJ; srednji broj namirnica u prva dva bilježenja je 20,5 odnosno 18,5 u posljednja dva dana bilježenja; odgovarajuće vrijednosti za srednji broj obroka su 8,9 odnosno 7,9). Riječ je o tzv. zamoru ispitanika¹¹¹ tijekom sedam dana bilježenja i vaganja svega pojedenog, pa dolazi do svjesne (i/ili nesvjesne?) promjene prehrane koja pojednostavljuje provedbu metode. Time zapravo ispitanici bilježe trenutni pravi unos, koji nije i uobičajeni unos hrane. Niži ukupni unos hrane se najjače odražava na unos hranjivih tvari koje se u hrani nalaze u malim količinama pa to objašnjava uočene statistički značajne razlike za prehrambena vlakna i selenij. Potvrda pretpostavci da je veća vjerojatnost odstupanja 7BV-a, a ne UUN-a od stvarnih vrijednosti, je činjenica da je prosječan unos energije, te broj namirnica po danu 7BV-a manji i od prosjeka za tri 24-hP-a (srednji broj namirnica po danu je 10,3 uz srednji broj obroka 3,8). Vodeći se sve češćim literaturnim kritikama MBV-a kao 'zlatnog standarda' upravo zbog sličnih nedostataka ove metode koji se ne mogu ukloniti ni uz motivirane ispitanike^{115, 139, 140}, u validaciji upitnika je korišten i višestruko ponavljan 24-hP kao druga referentna metoda. Kod usporedbe 24-hP-a i UUN-a nije bilo konzistentno viših vrijednosti jednom od metoda, uz opseg razlika od 2% (energija, bjelančevine, masti, jednostruko nezasićene masne kiseline i selenij) do 15% za alkohol. Ove razlike nisu dosegle statističku značajnost, i slične su rezultatima drugih autora^{125, 142, 154}. Iako osnovna svrha upitnika i nije određivanje točnih srednjih vrijednosti nego kategorizacija ispitanika po unosu hranjivih tvari, ipak se može reći da su srednje vrijednosti dobivene UUN-om usporedive s onima dobivenim referentnim metodama. U **Tablici 1** je dan i odnos

intraindividualne i interindividualne varijance za tri ponavljanja UUN-a i 24-hP-a. Mogu se uočiti znatno manje vrijednosti za UUN u odnosu na 24-hP, što znači da su kod upitnika razlike između tri ponavljanja u vrijednostima za hranjive tvari za pojedinog ispitanika znatno manje od razlika između ispitanika. Razlike u vrijednostima između tri dana metode prisjećanja za jednog ispitanika su razumljivo veće zbog utjecaja dnevnih varijacija, te je vrijednost intraindividualne varijance bliža vrijednosti interindividualne varijance. Stoga se kod metode 24-satnog prisjećanja može očekivati veći utjecaj deatenuacije na popravljivanje korelacije s upitnikom.

Koeficijenti korelacije UUN-a s dvjema referentnim metodama su dani u **Tablici 2**. Vrijednosti koeficijenata korelacije nepodešenih za ukupni energijski unos između 7BV-a i UUN-a se kreću od 0,34 (zasićene i jednostruko nezasićene masne kiseline) do 0,77 (ugljikohidrati). Nakon podešavanja za energijski unos, povezanost između metoda raste za neke hranjive tvari poput masti (sa 0,37 na 0,78), dok za druge opada (prehrambena vlakna: sa 0,57 na 0,08). Slično se može uočiti prilikom usporedbe UUN-a sa 24-hP-om, iako su koeficijenti korelacije, kako sirovi, tako i podešeni, za većinu hranjivih tvari bolji za UUN i 24-hP, nego za UUN i 7BV. Postupak podešavanja za energijski unos bi trebao smanjiti povezanost između metoda zbog smanjenja interindividualne varijance, ali bi ju istovremeno trebao i povećati dok se ne uklone korelirane greške između unosa hranjivih tvari i energije¹⁴⁹. Time je konačni učinak podešavanja za energijski unos teško predvidiv. Općenito, ovdje dobiveni koeficijenti korelacije su usporedivi s vrijednostima dobivenim u drugim radovima^{125, 137, 142, 147, 149, 151, 154, 157}, što upućuje na sposobnost UUN-a da rasporedi ispitanike po unosu hranjive tvari slično referentnim metodama¹⁴⁷. Podešavanjem za energijski unos su ipak dobiveni niski koeficijenti korelacije između UUN-a i 7BV-a za prehrambena vlakna, te za višestruko nezasićene masne kiseline, linolnu kiselinu i alkohol, kod usporedbe UUN-a sa 24-hP-om (**Tablica 2**). Slaba korelacija između podešenih vrijednosti za prehrambena vlakna između 7BV-a i srednje vrijednosti tri upitnika se može djelomice objasniti utjecajem sezonskih varijacija. Naime, 7BV je proveden, ovisno o ispitaniku, u periodu između ožujka i svibnja za koji je karakterističan prelazak sa 'zimске' prehrane s relativno malo voća i povrća na 'proljećnu' prehranu s dosta ovih namirnica, glavnih izvora prehrambenih vlakana. Razumljivo je stoga da je, kod nekih ispitanika, prvi upitnik (proveden odmah po dovršetku 7BV-a), koji se odnosio na proteklih mjesec dana, dao drukčiji unos vlakana od metode koja se odnosi na samo sedam dana unutar tog perioda. Uz intraindividualne promjene unosa vlakana (naročito između prvog upitnika i srednje vrijednosti druga dva provedenih dvije godine kasnije) slaba korelacija ne iznenađuje. Ona ipak nije pokazatelj nesposobnosti upitnika u rangiranju ispitanika po unosu vlakana, već kod usporedbe metoda upućuje na potrebu sprječavanja utjecaja sezonskih varijacija na hranjive tvari poput prehrambenih vlakana koje su na njih posebno osjetljive. Bolja korelacija vrijednosti unosa vlakana UUN-om i 24-hP-om je

posljedica činjenice da su sva tri ponavljanja ovih metoda provedena istovremeno, pa je utjecaj sezonskih varijacija manji. Smanjenju koeficijenata korelacije nakon podešavanja za energijski unos doprinose i sami statistički postupci. Naime, koeficijenti korelacije su funkcija točnosti upitnika, kao i interindividualne varijacije unosa hranjive tvari ¹⁴⁷. Točnost upitnika tj. podudarnost vrijednosti za unos prehrambenih vlakana dobijenih UUN-om i referentnim 7BV-om (izražena intraindividualnom varijancom) je znatno opala nakon podešavanja za ukupni energijski unos, dok ne dolazi do promjena interindividualne varijance, što rezultira smanjenjem korelacije. Budući da je ova skupina ispitanika vrlo homogena obzirom na dob, spol, i BMI (VIDI *Eksperimentalni dio*, te objašnjenje **Tablice 1**), ne iznenađuju relativno male interindividualne razlike u ukupnom energijskom unosu (1 SD = 1,8; 1,9 i 2 MJ/dan, za UUN, 7BV i 24-hP) (**Tablica 1**). Uslijed toga podešavanje za energijski unos neće značajnije utjecati na interindividualnu varijancu nutrijenata (učinak je najjači za nutrijente koji su snažno korelirani s unosom energije), te se učinak podešavanja svodi na slaganje vrijednosti dobivenih dvjema metodama. U heterogenijem uzorku se mogu očekivati manje promjene korelacije podešavanjem za energijski unos zbog manjeg utjecaja ovog postupka na unos vlakana. Naime, postojala bi veća razlika u unosu prehrambenih vlakana među ispitanicima, a prehrambena vlakna su i slabije korelirana s ukupnim energijskim unosom. Niski podešeni koeficijenti korelacije za neke masne kiseline i alkohol pokazuju očitu neadekvatnost tri ponavljanja metode 24-satnog prisjećanja (tj. tri dana) u skupini od 17 ispitanika, za ocjenu uobičajene potrošnje ovih hranjivih tvari sa znatnim dnevnim varijacijama. Problem je rješiv povećanjem broja podataka, što se postiže povećanjem broja ispitanika, ili broja ponavljanja metode 24-hP. Znatno bolji koeficijenti korelacije za ove nutrijente usporedbom UUN-a sa 7BV-om (**Tablica 2**), a koji su na razini rezultata drugih radova ^{137, 149} potvrđuju valjanost upitnika i za ove hranjive tvari.

Deatenuacija, kojom je smanjen utjecaj intraindividualnih razlika između tri ponavljanja UUN-a i 24-hP-a u unosu hranjive tvari, je povećala koeficijente korelacije za sve ispitivane nutrijente (**Tablica 2**). Kako je i očekivano, učinak deatenuacije je najveći kod hranjivih tvari s najvišim podešenim koeficijentima korelacije (npr. masti), te kod onih s višim odnosom varijanci (npr. alkohol prema UUN-u) (**Tablice 1 i 2**).

Klasifikacija podataka za unos hranjivih tvari u percentile je prikazana u **Tablici 3**. Zbog malog broja ispitanika podaci su podijeljeni u kvartile distribucije, te je prikazan postotak ispitanika u istom i ekstremnim kvartilima. Usporedbom UUN-a sa 7BV-om, ispravno je raspoređeno od 24% (linolna kiselina, ugljikohidrati) do 53% (energija) ispitanika. Teška misklasifikacija podrazumijeva raspoređivanje jednog ispitanika u najviši kvartil jednom, a najniži kvartil drugom metodom. Takvih ispitanika je najviše bilo kod procjene unosa višestruko nezasićenih masnih kiselina, linolne kiseline i prehrambenih vlakana, tj. 12%. Krosklasifikacijom

podataka dobivenih UUN-om s onima dobivenim 24-hP-om može se ustanoviti bolja kategorizacija podataka nego kod usporedbe sa 7BV-om. Također, teška misklasifikacija je rjeđa, osim za alkohol gdje je 3 od 17 ispitanika smješteno u ekstremne kvartile. To ponovno upućuje na neadekvatnost tri dana za procjenu uobičajene potrošnje alkohola. Udjeli podataka u istom i ekstremnim kvartilima distribucije su slični postocima utvrđenim u radovima drugih autora^{135, 137, 142, 149}, koji se smatraju zadovoljavajućim.

Ponovljivost UUN-a je ispitana računanjem intraclass koeficijenta korelacije koji su dani u **Tablici 4**. Dobiveni opseg koeficijenata korelacije od 0,57 za alkohol do 0,85 za bjelančevine, pokazatelj je vrlo dobre ponovljivosti upitnika^{135, 149, 151, 157}. U **Tablici 4** su navedeni i koeficijenti korelacije računati za ispitivanje dugotrajne i kratkotrajne ponovljivosti upitnika. Nakon podešavanja za energijski unos dobivene su vrijednosti od 0,28 za jednostruko nezasićene masne kiseline do 0,81 za ugljikohidrate. Ove vrijednosti su slične onima dobivenim u radu Ribolija i sur.¹³³ koji su ispitivali kratkotrajnu ponovljivost upitnika u razmaku od dva do tri mjeseca. Dugotrajna ponovljivost ovog UUN-a je ispitana nakon dvije godine i dobiveni su koeficijenti korelacije podešeni za energiju od 0,12 za jednostruko nezasićene masne kiseline do 0,76 za ugljikohidrate (**Tablica 4**). Riboli i sur.¹³³ su dugotrajnu ponovljivost testirali u razmaku od dvije do pet godina i dobivena je prosječna korelacija podešena za energijski unos za ispitivane hranjive tvari od 0,37. Srednji koeficijent korelacije dugotrajne ponovljivosti ovog upitnika je 0,43. Općenito, kratkotrajna ponovljivost je znatno bolja od dugotrajne ponovljivosti upitnika, što je u skladu i s rezultatima navedene studije¹³³. Znatne promjene prehrambenih navika tijekom vremena, a koje su bile i očekivane u skupini prosječne dobi $22,8 \pm 1,8$ godina, najvažniji su uzrok slabijoj povezanosti vrijednosti dobivenih UUN-om u razmaku od dvije godine.

Može se zaključiti da je upitnik učestalosti namirnica razvijen za potrebe ispitivanja prehrambenih navika fokusne populacije zadovoljavajuće ponovljiv, te da ima vrlo dobru valjanost za kategorizaciju ispitanika po unosu energije i hranjivih tvari. Ujedno, usporedbom s dvije referentne metode, ovaj UUN daje i srednje vrijednosti koje se ne razlikuju značajno od referentnih vrijednosti.

Rezultati provjere kakvoće metoda korištenih za određivanje ukupnog udjela Se u uzorcima namirnica i tla su dani u **Tablici 5**. Dobivene su zadovoljavajuće vrijednosti pokazatelja točnosti i ponovljivosti metode, uz opseg recoveryja dodanog anorganskog i organskog oblika Se iz tri različita matriksa od 93,7-100,8%.

Koncentracija Se na originalnu masu različitih namirnica je dana u **Tablici 6**. Analizirane namirnice su prema podrijetlu podijeljene u tri kolone. Vrijednosti za voće, povrće, proizvode od žitarica, kao i jaja, mlijeko i mliječne proizvode, te ribu, meso i proizvode, tj. sve namirnice koje su uzgojene ili proizvedene na ispitivanom odnosno kontrolnom području, su navedene u

odgovarajuće kolone. Utvrđene vrijednosti za kupovne namirnice su navedene u posebnoj koloni. Udio Se u većini ispitanih vrsta voća je očekivano mali, obzirom na visoki udio vode i malu koncentraciju bjelančevina (**Tablica 6**). Naime Se se u hrani uglavnom nalazi u obliku selenoaminokiselina ⁸⁷. Viša razina Se je utvrđena u orahu upravo zbog udjela bjelančevina. Razina Se u analiziranim kupovnim uzorcima kikirikija se nalazi na gornjem kraju opsega koncentracija koje se mogu naći u literaturi ¹⁷²⁻¹⁷⁴, ali to samo upućuje na različito podrijetlo ove namirnice koja može nakupiti visoke koncentracije Se raspoloživog u tlu. Općenito su rezultati vrlo slični onima dobivenim analizom voća uzgojenog ili kupljenog u Grčkoj ¹⁷⁵, te znatno viši od vrijednosti dobivenih u Slovačkoj ¹⁶⁹. Kao i kod većine vrsta voća, koncentracija Se u povrću je u najvećem broju slučajeva vrlo niska (**Tablica 6**). Vrijednosti su u opsegu vrijednosti utvrđenih u SAD-u (Ohio) ¹⁷⁴, Australiji ¹⁷² i Grčkoj ¹⁷⁵, osim 3-4 puta viših vrijednosti Se u grahu u Grčkoj. Ovdje dobivene vrijednosti za grah za obje lokacije su pak jednake vrijednostima utvrđenim u Slovačkoj ¹⁶⁹. Više koncentracije Se su, slično kao kod voća, utvrđene u povrću s višim udjelom bjelančevina (npr. grah, češnjak), ali i u krucifernom povrću (kupus, cvjetača, kelj), češnjaku i crvenom luku, koji imaju viši udio aminokiselina sa sumporom, njihovih derivata, a sadrže i druge spojeve sa sumporom poput glukozinolata ili sulfoksida. Zamjenom sumpora selenijem mogu nastati odgovarajući analozi ovih spojeva, pa se mogu očekivati više razine Se u ovim vrstama povrća ⁶⁵. Usporedbom udjela Se u različitim vrstama povrća uočljiva je tendencija viših razina u povrću uzgojenom na endemskom području. Naročito je uočljiva razlika koncentracija za svježi, te nešto manja, za kiseli kupus (**Tablica 6**). Osim očitog objašnjenja veće razine i iskoristivosti Se u tlu endemske lokacije, moguće je da su razlike posljedica i različitih sorti ove biljke koje se razlikuju po udjelu bjelančevina i spojeva sa sumporom ¹¹³. Razina Se u kupovnim šampinjonima je visoko iznad prosjeka za sve ostale vrste povrća. Slično je utvrđeno i u drugim radovima ^{169, 174, 175}. Koncentracija Se u pšeničnom brašnu i kruhu je jednaka u uzorcima iz Slavenskog Kobaša i onima iz Ivanovaca. Za razliku od endemske lokacije, kod uzoraka brašna s kontrolne lokacije je riječ o kupovnom pšeničnom brašnu (Tip 500) koje se koristi u proizvodnji domaćeg bijelog kruha. Utvrđene vrijednosti su dvostruko više od koncentracije Se u ovim proizvodima u Slovačkoj ¹⁶⁹, slične vrijednostima za meku pšenicu u Grčkoj ¹⁷⁵, ali znatno niže od koncentracija u SAD-u ^{174, 176}. U pšenici je Se najvećim dijelom u obliku selenometionina ugrađenog u bjelančevine ¹⁷⁷, te će, uz pretpostavku iste koncentracije i raspoloživosti Se u tlu, razina ovog elementa biti uvijek viša u tvrdim sortama pšenice koje imaju veći udio bjelančevina. Koncentracija Se u kupovnom pšeničnom brašnu u Hrvatskoj ipak nije odraz njegove količine i raspoloživosti u tlu zbog toga što se domaće brašno miješa s uvoznim. U Hrvatskoj je prethodno provedena analiza čitavog zrna pšenice uzgojene u Požeškoj kotlini, u kojoj je bilo pojave nekih bolesti domaćih životinja uzrokovanih deficitom selenija ¹⁷⁸. Koncentracija Se u svim sortama

pšenice nije bila veća od 18 ng/g ¹⁴. Analizirana su četiri uzorka tjestenine s jajima i opseg vrijednosti je sličan vrijednostima u Slovačkoj ¹⁶⁹, te bar peterostruko niži od koncentracija u Grčkoj i SAD-u ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Dva uvozna uzorka (Italija i Slovenija) imaju 20-35% viši udio Se u odnosu na lokalne proizvode. Za razliku od domaćih proizvoda, na uveznoj tjestenini je bilo jasno naznačeno da je proizvedena isključivo od tvrde pšenice. Uzorci kukuruznog griza potječu od privatnih proizvođača s obje lokacije. Srednja koncentracija Se u uzorcima s endemskog područja je tri puta viša od koncentracije Se u kukuruznom grizu kontrolne lokacije (**Tablica 6**). Naime, od četiri uzorka iz Slavanskog Kobaša, dva sadrže po 183 ng/g Se, dok druga dva uzorka imaju 39, odnosno 50 ng/g. Najviša vrijednost je jednaka koncentraciji Se u kukuruzu u Grčkoj ¹⁷⁵, dok su niže vrijednosti utvrđene za endemsku lokaciju, te vrijednosti za uzorke s kontrolne lokacije slične literaturnim vrijednostima za Slovačku i SAD ^{169, 174, 176}. Niže vrijednosti su ujedno jednake rezultatima prethodnih analiza kukuruza u Hrvatskoj kad je opseg koncentracija bio od 8-50 ng/g ¹⁷⁹. Kukuruz uzgojen u Požeškoj kotlini je imao koncentraciju Se manju od 10 ng/g ¹⁴. Već je prije sugerirano da je kukuruz podložniji varijacijama u udjelu Se u odnosu na druge kulture ¹⁸⁰, a razlozi velikog opsega koncentracija Se u uzorcima s endemske lokacije su možda objašnjivi i svojstvima tla. Utvrđena razina Se u riži je unutar opsega vrijednosti utvrđenih u Australiji, Slovačkoj i Grčkoj ^{169, 172, 175}, te na donjem kraju opsega vrijednosti utvrđenih u SAD-u (41-304 ng/g) ¹⁷⁴. Srednja koncentracija Se u uzorcima mlijeka proizvedenog privatno na endemskoj lokaciji, je gotovo dvostruko viša od razine u uzorcima s kontrolne lokacije (**Tablica 6**). U oba slučaja postoji znatna varijacija koncentracija među uzorcima iste lokacije. Količina Se u dva uzorka s endemske lokacije od 20 i 38 ng/g, te srednja koncentracija u uzorcima s kontrolne lokacije od 19 ng/g su među najvišima utvrđenim u Europi ^{169, 173, 175, 181}, te slična vrijednostima utvrđenim u Rusiji, Australiji, Japanu i SAD-u (Ohio) ^{172, 174, 181, 182}. Koncentracija od 65 ng/g u jednom od uzoraka s endemske lokacije usporediva je jedino s koncentracijama u mlijeku iz selenifernog područja SAD-a (Južna Dakota) ¹⁸¹. Budući da se prehrana krava muzara temelji uglavnom na ispaši i silaži, a i apsorpcija anorganskog Se iz komercijalnih krmiva je slaba ¹⁸³, objašnjenje ovakvih koncentracija u mlijeku je u količini raspoloživog Se u tlu. Koncentracija Se u kupovnom obranom mlijeku je jednaka vrijednostima utvrđenim u Grčkoj i Australiji ^{172, 175}. Razine Se u mliječnim proizvodima su analogne količini Se u mlijeku iz kojeg su proizvedene, te povišenju udjela bjelančevina (**Tablica 6**), u skladu s literaturnim vrijednostima ^{169, 174, 175, 184}. Kokošja jaja s endemske lokacije sadrže prosječno tri puta više Se od uzoraka s kontrolne lokacije. Srednja vrijednost udjela Se utvrđena u uzorcima iz Slavanskog Kobaša od 177 ng/g je u opsegu vrijednosti utvrđenih u SAD-u, Australiji i Slovačkoj ^{169, 172, 174, 176}, dok su vrijednosti utvrđene u uzorcima iz Ivanovaca bliže onima utvrđenim u Grčkoj ¹⁷⁵. Jaja imaju velik kapacitet nakupljanja Se, ali konačna količina je teško predvidiva ako se ne znaju detalji prehrane nesilica.

Prehrana smjesama s dodatkom Se može značajno povišiti koncentraciju Se u jajima peradi, pri čemu je kapacitet nakupljanja izrazito veći od mišićnog tkiva, te nešto bolji od iznutrica poput jetre i bubrega ¹⁸⁵. Sukladno ostalim dosad spomenutim proizvodima, udio Se u mesu i proizvodima uzetim s endemske lokacije je viši u odnosu na uzorke s kontrolne lokacije (**Tablica 6**). Utvrđene vrijednosti za svježe svinjsko, pileće, pureće i juneće meso za obje lokacije, su općenito nešto više od vrijednosti utvrđenih u Austriji, Slovačkoj i Grčkoj, te najvećim dijelom u opsegu nalaza iz SAD-a (Ohio) i Australije ^{169, 172, 174, 175, 184}. Koncentracije Se u piletini su ujedno u opsegu vrijednosti (115-170 ng/g) koje su Beker i sur. ¹⁸⁶ utvrdili u uzorcima tri mesnoprerađivačka proizvođača u Hrvatskoj. Isti autori su analizom krmiva koje su proizvođači koristili tijekom uzgoja, utvrdili vrijednosti od 0,25-0,55 ppm, što je rezultiralo razinama Se u pilećoj jetri od 293-460 ng/g ¹⁸⁶. Srednja vrijednost Se u pilećoj jetri endemske lokacije se nalazi na donjem kraju ovog opsega, dok je vrijednost za kontrolnu lokaciju 197 ng/g. Opseg rezultata gore spomenutih autora je gotovo identičan vrijednostima utvrđenim u pilećoj jetri u Slovačkoj, gdje su uzorci isto bili podrijetlom od industrijski uzgojenih životinja ¹⁶⁹. Očito je stoga da prehrana peradi isključivo krmnim smjesama s anorganskim Se, dovodi do neravnomjernog povećanja razine Se u tkivima. Individualnim načinom uzgoja, za razliku od industrijskog, životinje unose veći udio Se u obliku selenoaminokiselina koje se mogu nasumice ugrađivati u bjelančevine mišićnog tkiva. Ovdje utvrđene koncentracije Se u svinjetini i svinjskoj jetri su na gornjem kraju opsega vrijednosti (40-140 ng/g za meso i 160-390 ng/g za jetru) kojeg su utvrdili Beker i Šatović ¹⁸⁷. U tom radu su najvišu količinu Se imali uzorci industrijskog proizvođača koji je koristio krmiva sa 0,15-0,21 ppm Se. Individualni uzgajivači nisu koristili komercijalne krmne smjese, pa je unos Se životinja najvećim dijelom ovisio o udjelu Se u lokalno uzgojenom bilju. Količina Se u svinjskoj jetri s endemske i kontrolne lokacije se minimalno razlikuje od literaturnih nalaza u drugim zemljama ^{169, 175}. Srednja koncentracija Se u junetini s kontrolne lokacije je gotovo dvostruko niža od srednje vrijednosti uzoraka endemske lokacije (**Tablica 6**). Prethodnim analizama u Hrvatskoj je utvrđena srednja vrijednost od 50 ng/g ¹⁸⁷. Autori su očekivali znatno niže koncentracije Se kod životinja uzgojenih na području s niskim udjelom Se u tlu (Požeška kotlina). Razlike s drugom skupinom životinja uzgojenom na lokaciji s dvostruko višom koncentracijom Se u tlu ipak nisu bile značajne. To je najvjerojatnije posljedica prehrane životinja krmivima s dodatkom Se. Koncentracija Se u iznutricama poput pilećeg srca i želuca, te svinjskog srca je identična nalazima u Austriji ¹⁸⁴. Količina Se u kupovnim mesnim proizvodima varira ovisno o sastavu proizvoda, te nizu drugih čimbenika, i utvrđen je opseg koncentracija od 69-118 ng/g, sličan vrijednostima iz literature ^{169, 175}. Dodatak Se u krmiva komplicira interpretaciju podataka jer već koncentracije u komercijalnim smjesama (0,1-0,3 ppm) mogu značajno povišiti udio Se u tkivima peradi i svinja ¹⁸⁵. Učinak je najočitiji na iznutricama poput jetre i bubrega.

Krmiva s dodatkom Se za goveda ne povisuju značajnije koncentraciju u tkivima ili mlijeku, kako je već spomenuto gore, ali je moguće postojanje adaptivnih mehanizama koji poboljšavaju resorpciju kod niskog unosa Se. Nema značajnije razlike u koncentraciji Se u dvije često konzumirane vrste riba, podrijetlom iz ribnjaka nedaleko endemske, odnosno kontrolne lokacije (**Tablica 6**). U Slovačkoj je analiza mesa šarana dala nešto viši rezultat ¹⁶⁹. Analizom konzervirane morske ribe je identificiran jedan od najboljih izvora Se u ispitivanoj populaciji sa 715 ng/g. Vrijednosti su identične onima iz SAD-a, Grčke i Australije ^{172, 174-176}. Od slatkiša je analizirana jedino čokolada kao značajniji izvor Se, i utvrđena vrijednost je jednaka literaturnim vrijednostima ¹⁷⁵. Analizom tri različite juhe iz vrećice su dobivene vrijednosti koje odgovaraju njihovu sastavu i podrijetlu sirovina ('Goveđa juha' je uvozni proizvod) (**Tablica 6**).

Koncentracija Se u uzorcima zemlje uzetim s endemske i kontrolne lokacije je dana u **Tablici 7**. Zbog uočene tendencije višeg udjela Se u namirnicama uzgojenim na endemskoj u odnosu na kontrolnu lokaciju, nalaz niže koncentracije Se u tlu kontrolne lokacije ne iznenađuje. Ukupni udio Se u tlu ipak nije jedini čimbenik koji utječe na konačnu koncentraciju u namirnici. Utvrđeno je da neka tla i pored visokog udjela Se ne dovode do toksičnih razina ovog elementa u biljkama zbog adsorpcije Se na organsku tvar, vezanja za željezne oksihidrokside ili aluminij, ili zbog neodgovarajućeg pH (adsorpcija i stvaranje kompleksa s drugim metalima se smanjuju povišenjem pH), čime Se postaje neraspoloživ za biljke ^{86, 185, 188}. Sva endemska sela su smještena blizu naslaga ugljena i škrljeveca ⁹³. Škrljevac se smatra najčešćim čimbenikom u nastanku tla s toksičnim razinama Se ¹⁸⁵. Feder i sur. ⁹³ ujedno smatraju vrlo vjerojatnim da mehanička, kemijska, i mikrobiološka razgradnja naslaga ugljena može dovesti do promjena pH i količine kisika u tlu, što može utjecati na promjenu kemijskog oblika (time i topljivosti i raspoloživosti) najrazličitijih anorganskih sastojaka tla. S druge strane, neke geološke značajke endemskih sela poput tla nastalog iz eruptivnih stijena, ili pješčani sedimenti, su karakteristične za područja s niskom količinom Se u biljakama, zbog njegove neraspoloživosti ili vrlo niske koncentracije ¹⁸⁵. Očito je stoga da će na konačni udio Se u biljnim namirnicama s endemskog područja utjecati omjer svih navedenih činioca na mikrolokaciji uzgoja. U Kini je utvrđeno da različit sastav tla može utjecati na raspoloživost Se u takvoj mjeri da u istom selu kukuruz može imati previsoku i deficitarnu koncentraciju ⁸⁶. Od tri uzorka tla s endemske lokacije, jedan je uzet s polja na kojem je uzgojen kukuruz s vrlo visokom koncentracijom Se. Udio Se nije značajno drukčiji od uzorka tla na kojem je uzgojen kukuruz sa 4,5 puta manjom koncentracijom. Tako postaje očito (ukoliko nije riječ o dvije različite sorte ove biljke sa znatnom razlikom u kapacitetu nakupljanja ovog elementa) da je ustanovljena razlika koncentracija u uzorcima kukuruza uvjetovana svojstvima tla i s time vezanom raspoloživosti Se. Slično bi moglo objasniti i razliku između utvrđenih koncentracija Se u kravljem mlijeku. Analizom tla u Požeškoj kotlini su dobivene vrijednosti od

20-48 ppb Se ¹⁴, a Beker i Šatović ¹⁸⁷ navode i najvišu vrijednost od 280 ppb za uzorke tla iz Podravine. U literaturi postoje velike razlike u udjelu Se ovisno o zemljopisnom podrijetlu. Npr., srednja koncentracija Se u austrijskim tlima je 270 ppb ¹⁸⁹, u Kini je utvrđen opseg od 38-560 ppb za većinu tala (s opsegom od 43-263 ppb u području u kojem se javlja Kešanska bolest), u SAD-u, Engleskoj i Walesu od <10 do 4700 ppb ¹⁸⁸, u Japanu od 200-1000 ppb ¹⁹⁰, itd.

U sklopu određivanja unosa Se hranom ispitanici s kontrolne i endemske lokacije su podijeljeni u više skupina. Srednja dob i BMI ovih skupina je prikazana u **Tablici 8**. Osim ispitanika oboljelih od endemske nefropatije (EN) čija je prosječna dob u trenutku anketiranja bila 64 godine, nema značajnih razlika u srednjoj dobi ili BMI-ju između ostalih skupina ispitanika. Prosječna dob zdravih ispitanika endemske, te kontrolne lokacije je između 40 i 44 g, uz opseg koji uključuje odraslu populaciju od 17-74 godine. Ipak, daleko najveći dio ispitanika u svim skupinama (osim pacijenata od EN) pripada tzv. radnoj populaciji (18-60 g). Srednji BMI se kreće između 24 i 26 u svim skupinama (**Tablica 8**). Vrijednost BMI-ja od 24,9 se uzima kao gornja granična vrijednost normalne uhranjenosti ¹⁹¹, te je očit visok udio pretilih ispitanika. U skupini svih zdravih ispitanika s endemske lokacije je takvih 45% (srednji BMI 29), a u kontrolnoj skupini 52% svih ispitanika (srednji BMI 28).

Pojedinačni dnevni unos energije i osnovnih hranjivih tvari za ispitanike je dan u **Tablici 9**, dok su srednje vrijednosti unosa energije i nutrijenata za skupine ispitanika, kao i njihov udio u ukupnom energijskom unosu, dani u **Tablici 10**.

Pregledom utvrđenog dnevnog unosa energije u skupini EN pacijenata uočljivo je veliko odstupanje vrijednosti unutar skupina oba spola. Srednja vrijednost za muškarce (11,0 MJ/d) je nešto viša od preporuka za Europsku Uniju za odgovarajuću dobnu skupinu, od 9,2 MJ/d ⁸⁸. Kod žena je obratno, te je utvrđena srednja vrijednost od 6,8 MJ/d niža od preporuka (7,8 MJ/d). Unos bjelančevina izražen kao g/kg tjelesne mase na dan, je viši za muškarce (za 43%), te malo niži za žene (za 11%) od preporuka za EU koje su jednake za odrasle muškarce i žene i iznose 0,75 g/kg tjel. mase/d ⁸⁸. Iz udjela bjelančevina u unosu energije je također vidljivo da se ženski pacijenti bolje pridržavaju savjeta liječnika s obzirom na prehranu, koja bi trebala biti siromašna bjelančevinama. S druge strane, udio masti u dnevnom energijskom unosu je i kod žena i kod muškaraca viši od preporučene vrijednosti od 30% ¹⁹². Aktivnim osobama, kakva ispitivana populacija u pravilu jest bez obzira na dob, je dozvoljen udio energije od masti i do 35%, ali je udio energije od masti za muškarce znatno viši i od toga (**Tablica 10**). Masnokiselinski sastav prehrane je kod oboljelih oba spola karakteriziran jednakim unosom zasićenih masnih kiselina (ZMK), većim unosom jednostruko nezasićenih masnih kiselina (JMK) kod muškaraca (39 vs. 36% masti), te višim unosom višestruko nezasićenih masnih kiselina kod žena (24 vs. 20% masti). Udio ZMK u energijskom unosu je viši od gornje preporučene granice od 10% ¹⁹² kod oba spola.

Udio VMK u unosu energije je 9%, uz odnos VMK : ZMK (računat za oba spola; žene 0,7 i muškarci 0,5) od 0,6. Ovaj odnos je u skladu s važećim preporukama nekih zemalja ¹⁹³. Unos linolne kiseline (LOK) čini 7% dnevnog unosa energije što je u opsegu preporuka WHO i FAO ¹⁹². Ujedno, LOK čini 84% unosa VMK, iz čega proizlazi (ako se uzme da je udio arahidonske kiseline u VMK 1,5%, prema rezultatima dobivenim na ispitanicima s ovog područja ¹⁹³), da je odnos n-6 i n-3 masnih kiselina 5,7 : 1. Udio n-3 masnih kiselina time zadovoljava preporuke ¹⁹². Ugljikohidrati doprinose 55% dnevnom unosu energije kod pacijentica, te 45% kod muškaraca (**Tablica 10**). Ovo je razumljivo obzirom na manji udio bjelancevina i masti u unosu energije ispitanica. Unos prehrambenih vlakana za oba spola je također u opsegu preporučenih vrijednosti od 20-35 g/d ili 10-13 g/4,2 MJ ¹⁹⁴. Utvrđena je velika razlika između muškaraca i žena u unosu alkohola u ovoj skupini (**Tablica 10**), koji kod muškaraca doseže 1,7% energijskog unosa. Ovo se donekle može objasniti izraženim uvjerenjem nekih pacijenata da unos piva potpomaže funkciju oboljelih bubrega. Najvažnija značajka prehrane pacijentica i pacijenata od EN je viši udio masti u prehrani od preporuka. Visok unos masti se povezuje s većom učestalošću raka i kardiovaskularnih bolesti ¹⁹³, pa bi ga bilo dobro smanjiti zbog već postojećeg višeg rizika obolijevanja od tumora mokraćnog trakta kod EN pacijenata (*VIDI Teorijski dio*). Ujedno, visok unos masti može ubrzati napredovanje bolesti bubrega ¹⁹⁵. Smanjenje bi bilo najbolje postići manjim unosom namirnica životinjskog podrijetla kao najvažnijih izvora zasićenih masti u ispitivanoj populaciji, koje se najčešće spominju kod ispitivanja veze masti i kroničnih bolesti. Manji unos životinjskih bjelancevina u muškoj skupini ispitanika bi bio i u skladu s prehrambenim režimom kod bubrežne insuficijencije. Pored spomenutog manjeg udjela bjelancevina i masti u hrani, promjene prehrane uslijed bolesti kod pacijentica dovele su i do znatno veće konzumacije ribe. Velika većina ispitanica i ispitanika ove skupine ima zadovoljavajući unos voća i povrća, koji je očit i iz unosa prehrambenih vlakana (**Tablice 9 i 10**). Ujedno, ovakav unos voća i povrća značajno doprinosi utvrđenom višem unosu n-3 masnih kiselina, a predstavlja i najvažniji izvor većine vitamina. Neodgovarajući (tj. previsoki) odnos n-6 : n-3 masnih kiselina dovodi do proizvodnje eikozanoida koji bi mogli pogoršati upalne simptome bolesti, onih koji potiču progresiju tumora, kao i eikozanoida koji pojačavaju agregaciju trombocita ^{8, 193}. Pregledom radova objavljenih u dvadesetogodišnjem razdoblju, Kamat i Lamm ¹⁹⁶ kao najvažnije činioce u sprječavanju uroloških tumora navode viši unos vitamina A, B6, C, D i E, smanjenje unosa životinjske masti, i povećan unos voća i povrća.

Skupina ispitanica i ispitanika iz endemskih sela koji su članovi obitelji (SKOB) u kojoj je bilo pojave EN nemaju znatno drukčiji ukupni dnevni unos energije u odnosu na skupinu endemske lokacije u čijoj obitelji nije bilo slučajeva ove bolesti (tzv. kontrole s istim uvjetima okoliša, SKKO) (**Tablica 10**). Utvrđene vrijednosti za ženske podskupine od 11,9 i 10,6 MJ/d u

potpunosti odgovaraju preporučenim vrijednostima unosa energije za stupanj tjelesne aktivnosti i srednju tjelesnu masu ispitanica^{88, 113}. Kao odgovarajući stupanj tjelesne aktivnosti za ispitivanu populaciju je odabran tzv. srednji težak rad koji se po utrošku energije nalazi između kućanskih poslova i poljoprivrednih radova. Analogno su određene preporučene vrijednosti za muškarce koje su također odgovarale srednjim vrijednostima od 14,7 i 15,5 MJ/d za obje podskupine muških ispitanika s endemske lokacije. Srednji dnevni unosi bjelančevina za žene dviju skupina se ne razlikuju znatnije kad se izraze u g/kg tjelesne mase na dan, ali su i do 76% viši od preporuka⁸⁸. Preračunati srednji dnevni unosi bjelančevina za muškarce su prilično viši u SKKO skupini (1,30 vs. 1,66 g/kg tjel. mase/d), i ove vrijednosti su 73-121% više od preporuka. Razlike u ovako izraženom unosu bjelančevina između muškaraca i žena unutar skupina su značajnije jedino u SKKO skupini (žene 1,24 i muškarci 1,66 g/kg tjel. mase/d). Udio bjelančevina u dnevnom unosu energije je nešto viši kod SKKO skupine (13 vs. 12%). Dnevni unos masti je u obje skupine s endemske lokacije visok (**Tablica 10**), koji kod nekih ženskih i muških ispitanika doseže 193, odnosno 269 g (**Tablica 9**). Riječ je o najmlađim ispitanicima s vrlo visokim unosom mesa i mesnih proizvoda. Doprinos masti ukupnom energijskom unosu je veći u SKOB skupinama (43 vs. 39%). Kod nekih ispitanica i ispitanika mast čini i do 57% dnevnog energijskog unosa, što je gotovo dvostruko više od preporuka¹⁹². Razlika u ukupnom unosu masti između skupina se uglavnom može pripisati većem unosu ZMK i JMK u SKOB skupini, jer se apsolutne vrijednosti unosa VMK slične (**Tablica 10**). Odnos VMK : ZMK je 0,6 u SKOB i 0,7 u SKKO skupini, dok je udio LOK u unosu energije 8% za obje skupine. Odnos n-6 : n-3 je 5,9 za SKOB, odnosno 6,6 za SKKO skupinu. Udio ZMK u unosu energije je u obje skupine s endemske lokacije viši od preporuka, dok je udio VMK, kao i odnos VMK i ZMK, te n-6 i n-3 masnih kiselina zadovoljavajući^{192, 193}. Uslijed znatno nižeg doprinosa masti unosu energije, udio ugljikohidrata u unosu energije je nešto veći kod SKKO skupine (**Tablica 10**). Dnevni unos vlakana je unutar gore navedenog preporučenog opsega, uz nešto više srednje vrijednosti za SKKO skupinu (11,4 vs. 13,9 g/4,2 MJ). Unos alkohola je kao i u skupini EN pacijenata, višestruko viši za muškarce i čini od 0,2% (SKKO, žene) do 2,6% dnevnog energijskog unosa (SKOB, muškarci). Najviši doprinos alkohola dnevnom unosu energije je 8,5% kod ispitanika (SKKO) s unosom od 45 g/d (**Tablica 9**).

Skupine ispitanica i ispitanika s kontrolne lokacije (tzv. kontrole uz različite uvjete okoliša) imaju srednje dnevne unose energije koji su identični rezultatima dobivenim sa skupinama endemske lokacije (**Tablica 10**). Kontrolna i endemska populacija imaju iste radne i životne navike, pa su kao preporučene vrijednosti dnevnog unosa energije korištene iste vrijednosti. Udio bjelančevina u ukupnom unosu energije je za oba spola 13%, te ni tu nema veće razlike u odnosu na endemsku populaciju. Dobivene vrijednosti su također znatno više od

preporuka (1,50 g/kg tjele. mase/d, tj. 100% više kod muškaraca, i 1,29 g/kg tjele. mase/d, tj. 72% kod žena)⁸⁸. Utvrđena vrijednost unosa bjelančevina u g/kg tjelesne mase je jednaka utvrđenim vrijednostima za žene endemske lokacije, dok se srednji unos muškaraca nalazi između unosa SKOB i SKKO skupine. Apsolutne vrijednosti unosa masti su nešto niže od prosjeka za endemsku lokaciju, dok je srednji doprinos masti unosu energije 38% što je niže od prosjeka za obje podskupine endemske populacije (**Tablica 10**). Međutim, uočljiva je prilična razlika između muške i ženske podskupine kontrolne lokacije u postotku energije od masti (41% žene, 35% muškarci). Time su muškarci kontrolne lokacije zapravo jedina skupina koja ima unos masti u skladu s preporukama za aktivnu populaciju¹⁹². Usporedbom masnokiselinskog sastava masti, nema bitnijih razlika u odnosu na endemsku populaciju ako se promatraju skupne vrijednosti. Sastav masti muške skupine ipak podrazumijeva viši udio ZMK i JMK, te manje VMK u odnosu na žensku skupinu. Gornja granica preporuke za unos ZMK od 10% energije je i ovdje prekoračena, udio LOK u energijskom unosu je manji od 10%, odnos VMK : ZMK je 0,6, a odnos n-6 i n-3 masnih kiselina 6,1 (posljednja dva pokazatelja su izračunata za kontrolnu populaciju kao jednu skupinu). Osim unosa ZMK, ostale vrijednosti su u skladu s preporukama^{192, 193}. Unos ugljikohidrata predstavlja veći udio energijskog unosa u ovoj populaciji u odnosu na endemsku, te je naročito dobar u muškoj skupini (**Tablica 10**). Prehrambenih vlakana u prehrani kontrolne populacije ima prosječno 12,7 g/4,2 MJ, što je jednako vrijednostima u endemskoj populaciji kao i preporučenim vrijednostima¹⁹⁴. Unos je alkohola u ispitivanoj skupini kontrolne lokacije mali, uz najviši zabilježeni unos kod jednog ispitanika od 10,7 g/d ili 3,2% unosa energije (**Tablica 9**). Srednji doprinos alkohola dnevnom unosu energije kontrolne populacije od 0,2% predstavlja jedinu ozbiljniju razliku između kontrolne i endemske populacije.

Slično kao kod EN pacijenata, ustanovljene srednje vrijednosti unosa energije i osnovnih hranjivih tvari za kontrolnu i endemske skupine upućuju na prehranu s visokim udjelom masti. Kako je već spomenuto gore, visoka razina tjelesne aktivnosti omogućava neškodljiv unos masti hranom i do 35% energijskog unosa. Osim muškaraca s kontrolne lokacije, kod svih ostalih skupina je udio masti u energijskom unosu viši od te vrijednosti (**Tablica 10**). Udio masti u prehrani je najviši u skupini ispitanika endemske lokacije u čijoj je obitelji bilo pojave EN. Već prema višem unosu ZMK i JMK u odnosu na druge skupine, za razliku od VMK, očito je da ova skupina ispitanika jede nešto više namirnica bogatih ovim masnim kiselinama, u prvom redu meso, mlijeko i proizvode. Razlike su uvjetovane i masnoćom korištenom pri kuhanju (npr. 52% SKOB ispitanica i ispitanika koristi isključivo mast pri kuhanju, za razliku od 45% u SKKO skupini; ulje je isključiva masnoća pri kuhanju kod 9% SKOB, odnosno 16% SKKO ispitanika). Mada se na temelju raspoloživih podataka teško može povezati visok unos masti, ZMK i JMK s nastankom EN, udio masti u energijskom unosu, te naročito ZMK, je potrebno smanjiti zbog

njihove uloge u nastanku raka, ali i niza drugih bolesti. Naime, veća učestalost tumora mokraćnog trakta, ali i ostalih vrsta raka je zabilježena ne samo kod EN pacijenata, nego i kod članova njihove obitelji, te kod ostale populacije endemskih sela (učestalost opada s redoslijedom navođenja)⁹⁵. Pored utvrđenih dokaza za genetsku predispoziciju za EN i uz nju vezane tumore (VIDI *Teorijski dio*), veći rizik obolijevanja je, osim moguće jednake izloženosti uzročnom agensu, možda i posljedica istih prehrambenih navika. Tako je npr. udio energije od hranjivih tvari muškaraca oboljelih od EN identičan onom u muškoj SKOB skupini koju čine članovi obitelji pacijenata (**Tablica 10**). Slično nije ustanovljeno za žene, vjerojatno zbog boljeg pridržavanja savjeta liječnika u vezi prehrane pacijentica. Unos je bjelančevina (naročito životinjskog podrijetla) izražen na tjelesnu masu, viši kod sve tri skupine od preporučenih vrijednosti, ali noviji dokazi upućuju na veće potrebe kod tjelesno aktivnijih osoba, koje najvjerojatnije ne dovode do slabljenja funkcije bubrega^{197, 198}. Nema značajnije razlike u apsolutnim vrijednostima unosa ugljikohidrata između skupina, pa je očito da razlike u doprinosu dnevnom unosu proizlaze iz odnosa s unosom masti i bjelančevina. Kao i kod EN pacijenata, unos prehrambenih vlakana je visok u sve tri skupine, te odražava visok unos voća i povrća, kako je i očekivano u seoskoj populaciji. Unos alkohola je mali za ispitanice svih skupina, dok ispitanici endemske lokacije imaju 4,3 puta viši unos od ispitanika kontrolne lokacije (**Tablica 10**). Usporedbom ovih rezultata s vrijednostima dobivenim na urbanom uzorku s područja Istočne Slavonije, mogu se ustanoviti znatno više vrijednosti energijskog unosa u seoskoj populaciji obje lokacije (gradski uzorak: 6,7 MJ/d za žene i 8,3 MJ/d za muškarce)¹⁹³. Slično je uočeno i prije kod usporedbe seoske i gradske populacije¹⁹⁹. Urbani uzorak je ipak imao nešto manju srednju BMI vrijednost, te je prosječna dob bila niža (treba uzeti u obzir različitu metodologiju; u navedenom radu su korišteni duplikati obroka). Ustanovljen je i udio masti u energijskom unosu od 33%, jednak unos VMK i ZMK, te odnos n-6 i n-3 masnih kiselina od 15,8¹⁹³. Prethodnim radovima je također utvrđeno da i pored višeg unosa energije, te nekih činioca rizika kroničnih bolesti (npr. ukupna mast, ZMK), nema veće učestalosti ovih bolesti u seoskoj, nego baš obratno, u gradskoj populaciji^{199, 200}. Smatra se da je viša razina tjelesne aktivnosti ključni razlog ovog paradoksa. Ujedno, veća količina hrane najčešće podrazumijeva i veći unos najrazličitijih sastojaka namirnica koji djeluju zaštitno u nastanku bolesti (npr. vitamini, mikroelementi, vlakna). Uspoređujući neke pokazatelje masnokiselinskog sastava masti kod gradske i seoske populacije ovog područja, mogu se ustanoviti znatne razlike. Iako je ukupni unos masti manji u urbanoj skupini, odnos masnih kiselina je znatno bolji u seoskom uzorku. Gradska populacija unosi znatno manje n-3 masnih kiselina i/ili unosi znatno više n-6 masnih kiselina (LOK čini 98% n-6 masnih kiselina¹⁹³). Ovakav odnos između ovih skupina masnih kiselina je važan činioc u nastanku niza bolesti. Udjeli osnovnih hranjivih tvari u unosu energije dobiveni u drugim zemalja su uglavnom

slični ovdje dobivenim vrijednostima^{133, 137, 149, 151, 201, 202}.

Pojedinačni dnevni unos Se je dan u **Tablici 9**, dok je prosječni dnevni unos Se skupina ispitanika prikazan u **Tablici 11**. U istoj tablici je naveden i srednji %-ak preporučenih vrijednosti, te dnevni unos Se po kg tjelesne mase ispitanika. Ovim posljednjim pokazateljom se dobija bolji uvid u opskrbljenost ispitanika Se, uklanjajući razlike zbog većeg energijskog unosa.

Činioci za koje bi se moglo očekivati da najjače oblikuju unos Se hranom u skupini EN pacijenata su spol, dob i promjena prehrane uzrokovana bolešću. Postoji statistički značajna razlika između muških i ženskih pacijenata ($p < 0,05$), koja ostaje i nakon pretvorbe u $\mu\text{g/kg}$ tjel. mase/d. Udio Se namirnice je snažno povezan s udjelom bjelančevina⁸⁷. Budući da je apsolutni srednji unos bjelančevina 42% viši u muškoj skupini, viši ukupan unos Se ove skupine ne iznenađuje. Dnevni unos bjelančevina muškaraca je viši i kad se izrazi u g/kg tjelesne mase, pa je to dovelo i do razlika između dnevnog unosa Se izraženog u $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase ženske i muške skupine (**Tablica 11**). Usporedbom doprinosa hranjivih tvari unosu energije kod EN pacijentica i zdravih ispitanica iz endemskih sela, vidi se da su svjesne promjene prehrane prema preporukama liječnika značajno promijenile odnos hranjivih tvari pacijentica (**Tablica 10**). Njihova prehrana uključuje manji udio energije od bjelančevina i masti, te viši od ugljikohidrata, što svakako utječe na unos Se. Istovremeno, udio hranjivih tvari kod pacijenata je ostao jednak skupini zdravih muškaraca s endemske lokacije, članova obitelji EN pacijenata (**Tablica 10**). Najveći utjecaj na manji unos Se kod pacijentica u odnosu na kontrole ipak ima niži ukupni unos hrane. Starenje može imati za posljedicu manji unos hrane, te je npr. unos energije ispitanica i ispitanika endemske lokacije starijih od 65 godina (prosjeak 68 god.): 9,7 odnosno 12,2 MJ/d, a ispitanica i ispitanika mlađih od 65 godina (prosjeak 39 god.): 11,4 odnosno 15,9 MJ/d. Pacijentice i pacijenti od EN (prosječne dobi 63 tj. 64 god.) imaju srednji unos energije koji je niži od skupina kontrola s endemske lokacije starijih od 65 godina, pri čemu je to naročito uočljivo kod pacijentica (**Tablica 10**). Postaje jasno da je sama kronična bolest bubrega zapravo najvjerojatniji razlog manjeg ukupnog unosa hrane, što je već uočeno prije²⁰³. Veći utjecaj bolesti na prehranu pacijentica u odnosu na pacijente bi se mogao objasniti višim stadijem bolesti u ženskoj skupini, višom razinom tjelesne aktivnosti muškaraca, i dr. Doprinos pojedinih skupina namirnica unosu Se za pacijentice i pacijente od EN prikazan je u **Tablici 12**. Promjene prehrane zbog bolesti su i ovdje dovele do znatnih razlika među skupinama, te se može vidjeti viši doprinos jaja, mesa i žitarica unosu Se kod muškaraca, te znatno viši doprinos ribe kod žena. Uzimajući u obzir neujednačenost bioraspoloživosti Se iz različitih namirnica, ovo bi još više moglo povećati neadekvatnost statusa Se pacijentica.

Analizom ukupnog dnevnog unosa Se u dvije skupine zdravih ispitanica i ispitanika s endemske lokacije utvrđen je očekivano viši unos muškaraca ($p < 0,05$ za SKOB i $p < 0,01$ za

SKKO skupinu) (**Tablica 11**). Nakon pretvorbe unosa Se u $\mu\text{g/kg}$ tjele. mase/d, razlike među spolovima u SKOB skupini nestaju, ali ostaju u SKKO skupini ($p < 0,01$). Ovo je u skladu sa 25% višim unosom bjelančevina izraženim u g/kg tjelesne mase muškaraca SKKO skupine u odnosu na žene, dok ovakvih razlika nema u SKOB skupini. Uspoređujući ukupan dnevni unos Se između muškaraca dvije skupine nije utvrđena statistički značajna razlika (**Tablica 11**). Izražavanjem unosa Se u $\mu\text{g/kg}$ tjele. mase/d razlika među skupinama postaje značajna ($p < 0,05$). Unos bjelančevina (izražen na tjelesnu masu) muškaraca SKKO skupine je također 22% viši od srednjeg unosa u muškoj SKOB skupini, pa su utvrđene razlike očekivane. Između ženskih skupina nema značajnih razlika bez obzira na način izražavanja Se (**Tablica 11**). Malo je vjerojatno da ovdje utvrđeni niži unos Se kod muškaraca SKOB skupine ima ulogu u etiologiji EN. U prvom redu zbog činjenice da isto nije utvrđeno za žene SKOB skupine. Ako se pogledaju skupni srednji unosi Se (izraženog na tjelesnu masu) za sve ispitanice i ispitanike SKOB i SKKO skupina, razlika postaje minimalna, bez statističke značajnosti (**Tablica 11**). Stoga će se nadalje, u usporedbi endemske i kontrolne populacije, koristiti skupne vrijednosti za endemsku lokaciju.

Dosad spomenuti rezultati sugeriraju povezanost unosa Se i unosa bjelančevina. Korelacijskom analizom je ispitana povezanost dnevnog unosa Se ($\mu\text{g/kg}$ tjele. mase) s dnevnim unosom bjelančevina (g/kg tjele. mase) ukupne ispitivane endemske populacije (**Slika 1**). Utvrđena je visoko značajna veza između ovih varijabli ($r=0,95$; $p < 0,01$). Obzirom na visok udio pretilih osoba u endemskom uzorku, ukupni dnevni unos Se je, nakon podešavanja za dob (BMI i dob su snažno povezani u ovoj populaciji: $r=0,51$; $p < 0,01$) koreliran sa BMI-jem (**Slika 2**). Koeficijent korelacije ($r=-0,28$; $p < 0,01$) upućuje na tendenciju smanjenja unosa ovog mikroelementa kod pretilih osoba. Utjecaj pretilosti je ispitan i podjelom ispitanika u dvije skupine: one sa BMI-jem jednakim ili većim od 25, te one sa BMI-jem manjim od 25. Vrijednosti unosa energije, bjelančevina i Se su bile niže u pretiloj skupini, bez statističke značajnosti, dok su obje skupine imale identični unos Se u 10 MJ energijskog unosa hrane. Međutim, skupina pretilih je imala stariju prosječnu dob (45 ± 12 god.) u odnosu na normalno uhranjenu skupinu (39 ± 16 god.), te to treba uzeti u obzir u interpretaciji rezultata. Ispitana je i povezanost dobi s ukupnim unosom Se hranom (nakon podešavanja za BMI), te je ponovno utvrđena značajna negativna korelacija ($r=-0,36$; $p < 0,01$) (**Slika 3**). Skupni uzorak je također podijeljen u tri dobne skupine: 18-30 ($\bar{X}=25 \pm 4$ god.), 31-50 ($\bar{X}=40 \pm 5$ god.) i 50 i više godina ($\bar{X}=62 \pm 6$ god.), te su izračunate srednje vrijednosti unosa energije, bjelančevina, Se i BMI-ja. Unos energije i bjelančevina je bio najviši u najmlađoj skupini (bez statističke značajnosti), pri čemu je ta skupina imala srednji BMI 22, a ostale dvije 26. Ukupni unos Se prve skupine je statistički značajno viši samo od srednje vrijednosti druge dobne skupine (**Slika 4**). Unos Se izražen na 10 MJ energijskog unosa je tek minimalno veći u dobnoj skupini 18-30 godina starosti u odnosu na druge dvije skupine.

Muškarci kontrolne lokacije imaju ukupni dnevni unos Se viši od žena ($p < 0,01$), ali statistička značajnost razlika nestaje kad se unos Se preračuna u $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase (**Tablica 11**). Povezanost unosa Se s unosom bjelanjčevina (obje veličine izražene na jedinicu tjelesne mase) je ispitana i u ovoj populaciji (**Slika 5**). Utvrđena je vrlo snažna korelacija ($r = 0,98$; $p < 0,01$). Korelacija ukupnog unosa Se podešenog za dob sa BMI-jem (veza dobi i BMI-ja: $r = 0,31$; n.s.) je snažnija nego u endemskoj populaciji ($r = -0,44$; $p < 0,05$) (**Slika 6**). Podjelom ispitanika u pretilu i normalno uhranjenu skupinu prema vrijednosti BMI-ja, dobivene su više srednje vrijednosti za unos energije, bjelanjčevina, te Se za normalno uhranjenu skupinu, mada niti jedna razlika nije statistički značajna. Unos Se u 10 MJ je neznatno viši u normalno uhranjenoj skupini. Prosječna dob ispitanica i ispitanika u normalno uhranjenoj skupini je devet godina niža od srednje dobi pretila skupine (36 ± 12 god. vs. 45 ± 14 god.), te je to vjerojatno imalo utjecaj na usporedbu ispitanika prema BMI-ju. Utjecaj dobi na unos Se podešenog za BMI je i posebno ispitan korelacijskom analizom, ali uočeni trend smanjenja unosa Se ($r = -0,28$) nije statistički značajan. Kontrolna populacija je također podijeljena u tri dobne skupine na isti način kako je već opisano za endemsku populaciju, ali je utvrđena samo tendencija višeg unosa energije, bjelanjčevina i Se u najmlađoj u odnosu na druge dvije skupine bez statističke značajnosti. Također, udio Se u 10 MJ je kod sve tri dobne skupine podjednak.

Ispitivanje veze unosa Se hranom s dobi i BMI-jem korelacijskom analizom, u endemskoj, ali i u kontrolnoj populaciji upućuje na trend smanjenja unosa Se sa stupnjem pretilosti i životne dobi ispitanika. Međutim, podjelom ispitanica i ispitanika u skupine prema vrijednostima ovih varijabli, nisu uočene znatnije razlike u apsolutnim vrijednostima unosa Se, kao ni u gustoći prehrane s obzirom na udio Se. Iz ovih rezultata je očito da pretilost i dob ispitanika ipak ne utječu značajno na apsolutni unos Se ovih populacija. Najvjerojatniji razlog ovomu je održanje visoke razine tjelesne aktivnosti (time i veći ukupni unos hrane) do kasne životne dobi. Tako je razlika u dnevnom energijskom unosu najmlađe i najstarije dobne skupine endemske populacije samo 1,2 MJ. Ako se unos energije najmlađe skupine usporedi sa skupinom najstarijih ispitanica i ispitanika (65 god. i više, VIDI GORE), razlika se povećava na 2,7 MJ. Starenjem u ove dvije seoske populacije očito ne dolazi ni do većih promjena odnosa hranjivih tvari, te se održava jednaka gustoća hrane s obzirom na udio Se između najmlađih i najstarijih predstavnika radne populacije.

Ukupni dnevni unos Se žena endemske lokacije (SKOB i SKKO skupina zajedno, $71,0 \pm 20,9$ $\mu\text{g/d}$) je statistički značajno viši od dnevnog unosa žena kontrolne lokacije od $50,6 \pm 15,5$ $\mu\text{g/d}$ ($p < 0,01$). Isto vrijedi i kod usporedbe muških skupina (SKOB i SKKO skupina zajedno, $98,9 \pm 28,6$ $\mu\text{g/d}$ vs. $72,9 \pm 24,9$ $\mu\text{g/d}$; $p < 0,05$). Skupne vrijednosti ukupnog unosa Se za ispitanice i ispitanike obje lokacije su $56,4 \pm 20,4$ $\mu\text{g/d}$ za kontrolnu, te $79,4 \pm 26,6$ $\mu\text{g/d}$ za endemsku

lokaciju, i ove vrijednosti se također statistički značajno razlikuju ($p < 0,01$). Pretvorbom unosa Se u $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase na dan dobivene su vrijednosti od $1,09 \pm 0,38 \mu\text{g/kg/d}$ za kombiniranu žensku skupinu, i $1,30 \pm 0,46 \mu\text{g/kg/d}$ za kombiniranu mušku skupinu endemske lokacije. Ovakav unos Se kombinirane ženske skupine endemske lokacije je značajno viši od unosa žena kontrolne lokacije od $0,78 \pm 0,31 \mu\text{g/kg/d}$ ($p < 0,01$). Međutim, zajednička vrijednost za muškarce endemske lokacije nije statistički značajno drukčija od vrijednosti za muškarce kontrolne lokacije ($0,94 \pm 0,38 \mu\text{g/kg/d}$). Ovo se može pripisati nižim vrijednostima unosa Se u SKOB skupini (**Tablica 11**), čiji srednji unos se također ne razlikuje značajno od unosa u muškoj skupini kontrolne lokacije (zasebnom usporedbom, obje ženske, te muška SKKO skupina imaju značajno više srednje vrijednosti od odgovarajućih skupina u kontrolnoj populaciji). Skupne vrijednosti (ispitanice + ispitanici) unosa Se izražene po jedinici tjelesne mase su $0,82 \pm 0,33 \mu\text{g/d}$ za kontrolnu i $1,15 \pm 0,42 \mu\text{g/d}$ za endemsku lokaciju, i razlika između ovih vrijednosti je visoko statistički značajna ($p < 0,01$) (**Slika 7**).

Budući da je udio Se prosječno viši u tlu i namirnicama endemske lokacije, viši unos Se ove populacije je očekivan. Ujedno, viša gustoća prehrane s obzirom na udio Se kod endemske populacije ($64,7 \mu\text{g/10 MJ}$ vs. $47,9 \mu\text{g/10 MJ}$) nije posljedica drugih čimbenika, ako se uzmu u obzir male razlike u unosu osnovnih hranjivih tvari (**Tablica 10**), posebice bjelančevina (skupni dnevni unos bjelančevina u g/kg tjel. mase je $1,34$ za endemsku, i $1,35$ za kontrolnu populaciju), te prosječna dob i BMI koji se također ne razlikuju značajnije između ovih skupina (**Tablica 8**). Ovdje utvrđeni dnevni unos Se je viši od rezultata prijašnjih sličnih radova u Hrvatskoj. U radu u kojem je određen dnevni unos hranom ispitanica zagrebačkog područja, dobivena je srednja vrijednost od $34,0 \mu\text{g/d}$ ²⁰⁴, dok je u uzorku stanovnika Osijeka srednji dnevni unos bio $27,3 \mu\text{g/d}$ ¹⁵. Razlike se mogu donekle objasniti činjenicom da su kod prethodnih radova subjekti bili mahom iz gradske populacije, manje tjelesne mase i BMI-ja, te ukupnog unosa energije. Ukoliko se vrijednosti dnevnog unosa Se iz ovih radova preračunaju na srednje vrijednosti unosa energije za muškarce, odnosno žene kontrolnog i endemskog uzorka, dobije se $43,2 \mu\text{g/d}$ za ispitanice iz prvog spomenutog rada, te $40,5 \mu\text{g/d}$ za žene, odnosno $57,5 \mu\text{g/d}$ za muškarce iz drugog rada. Osim toga, vrijednosti unosa Se dobivene računanjem na osnovi udjela u namirnici i potrošnje te namirnice su uvijek više od stvarnih zbog gubitaka Se tijekom kuhanja, koji kod nekih namirnica mogu dosegnuti i 50%^{42, 175}. Bratakos i sur.²⁰⁵ su tako uobičajenim kuhanjem namirnica ustanovili smanjenje dnevnog unosa Se sa 110 na $95 \mu\text{g/d}$. Na procjenu dnevnog unosa može u znatnoj mjeri utjecati i metodologija primjenjena u radovima (sedmodnevni MBV + analiza namirnica, analiza seruma, i duplikati dnevnih obroka u radu provedenom na zagrebačkom području, te duplikati dnevnih obroka na osječkom području)^{15, 204}. Duffield i Thomson²⁰² su

odredili unos Se koristeći UUN, trodnevni MBV, te duplikate dnevnih obroka, i utvrdili 44% više vrijednosti upitnikom u odnosu na druge dvije metode. Među ostalim, ovo objašnjavaju potvrđenim navođenjem/prikupljanjem manje količine hrane od stvarno konzumirane kod MBV-a i duplikata obroka. Također, UUN se odnosi na duže vremensko razdoblje te može točnije odrediti unos rjeđe konzumiranih namirnica bogatih selenijem (npr. riba, iznutrice), što može dovesti do razlike u unosu od 33%. Konačno, autori kao moguću navode i tendenciju upitnika da precijeni unos nekih skupina namirnica, naročito povrća i mesa, pri čemu se dobiju i do 15% više vrijednosti ²⁰². Ako se pretpostavi da je ovdje korišteni upitnik također precijenio unos Se za 15%, korekcijom vrijednosti za kontrolnu populaciju (**Tablica 11**) su dobivene vrijednosti vrlo slične onima za populaciju Osijeka (izraženim na ovdje dobiveni srednji unos energije za muškarce i žene umanjen za 3% do kojeg dovodi smanjenje količine mesa potrebno za 15% manji unos Se) ¹⁶⁷. Dnevni unos Se određen u drugim zemljama prikazan je u **Tablici 13**.

Tablica 13 Kategorizacija utvrđenog dnevnog unosa selenija hranom

Unos Se (µg/d)	Zemlja
< 15	Kina (područje s kešanskom bolešću) ²⁰⁶
15-35	Velika Britanija ¹⁷³ , Švedska ²⁰⁷ , Novi Zeland ²⁰⁸ , Turska (seoska populacija) ²⁰⁷ , Hrvatska ¹⁵ , ²⁰⁴ , Belgija (Liège) ²⁰⁷ , Burundi (seoska populacija) ²⁰⁹ , Finska (prije suplementacije gnojiva) ²¹⁰ , Austrija ²¹¹
36-50	Austrija ¹⁸⁹ , Slovačka ²¹² , Škotska ²¹³ , Belgija (Antwerp i Brussels) ²⁰⁷ , Burundi ²⁰⁹ , Njemačka ²¹⁴ , Francuska ²¹⁵ , Velika Britanija ¹⁷³
50-85	Danska ²⁰⁴ , Australija ¹⁷² , SAD (Sjeverna Carolina) ²⁰⁷ , Nizozemska ²¹⁶ , Belgija (Vilvoorde) ²⁰⁷ , Italija (bez ribe) ²⁰⁹ , Turska (gradska populacija) ²⁰⁷ , Velika Britanija ²⁰⁴ , Burundi (riba u prehrani) ²⁰⁹
86-110	Grčka ¹⁷⁵ , Finska (nakon suplementacije gnojiva) ²¹⁰ , Španjolska ²⁰⁷ , Švicarska ²¹⁷ , SAD (Kalifornija) ²¹⁸ , Italija (riba jednom tjedno) ²⁰⁹
111-150	Japan ²¹⁹
151-500	SAD (seleniferno područje) ²²⁰ , Venezuela ²⁰⁷ , Meksiko ²²¹
5000	Kina (seleniferno područje) ²⁰⁶

Vrijednosti iz literature su podijeljene u skupine prema učestalosti, te prema preporučenoj vrijednosti dnevnog unosa od 55 µg ^{88, 89}. Srednji dnevni unos Se od 56,4 µg za kontrolnu i 79,4 µg za endemsku populaciju se nalazi u skupini unosa 50-85 µg/d koja zadovoljava preporuke. Osim odstupanja među zemljama koja najvećim dijelom ovise o udjelu Se u tlu, u **Tablici 13** se mogu vidjeti i velike razlike u dnevnom unosu u istoj zemlji (npr. Belgija, Burundi, Velika Britanija, Turska) ^{173, 204, 207, 209}. Razina Se u tlu (Belgija ²⁰⁷) i vrsta konzumirane hrane (npr. u Italiji je ustanovljen 35% veći unos Se ako se jednom tjedno jede riba ²⁰⁹), presudno utječu na unos Se hranom i uočene varijacije. Zbog toga i svi čimbenici koji oblikuju prehranu pojedinca

moгу dovesti do znatnih odstupanja, poput društvenog statusa (npr. siromašna seoska populacija u Burundiju s neznatnim unosom mesa i ribe u odnosu na gradsku populaciju ²⁰⁹), etički ili zdravstveni razlozi (npr. vegetarijanstvo ²²²), i dr. Doprinos skupina namirnica ukupnom unosu Se različitih skupina ispitanika dan je u **Tablici 12**. Nema značajnijih razlika između muškaraca i žena, s tendencijom većeg doprinosa mesa unosu Se kod muškaraca, te mlijeka i mliječnih proizvoda kod žena endemske lokacije. Razlike među spolovima su uočljivije u kontrolnoj populaciji, sa znatno većim doprinosom mesa i povrća kod žena, te jaja, žitarica i voća kod muškaraca (**Tablica 12**). Usporedbom skupnih vrijednosti za endemsku populaciju s odgovarajućim vrijednostima za kontrolnu populaciju, može se vidjeti tek nešto viši doprinos žitarica i proizvoda u kontrolnoj, te ribe u endemskoj populaciji. Ukupno, proizvodi životinjskog podrijetla čine 53% ukupnog unosa Se u kontrolnoj, te 55% u endemskoj populaciji. Doprinos namirnica unosu Se se mijenja ovisno o prehranbenim navikama populacije i udjelu Se u tlu, ali je u većini radova ustanovljen najveći doprinos životinjskih proizvoda, od 45-82% ^{212, 217, 223}. Žitarice obično imaju veći udio tamo gdje je količina Se u tlu veća ²⁰². Ovdje utvrđen doprinos žitarica u obje populacije je veći od istog u Slovačkoj (14%) ²¹², a manji od doprinosa unosu Se u SAD-u, Kanadi ili Meksiku od 34-60% ^{221, 223}. U Meksiku se zapravo visok unos Se žitaricama pripisuje i njihovom visokom unosu hranom. Voće i povrće uglavnom čine između 4 i 10% ukupnog unosa Se ^{212, 223}, mada ima značajnih odstupanja s obzirom na prehrabene navike (npr. 32% unosa Se iz mahunarki u Meksiku, ili 34% iz povrća i 28% iz mahunarki u seoskoj populaciji Burundija ^{209, 221}). Unos Se iz povrća od otprilike 15% u obje ovdje ispitivane populacije odražava visoku učestalost mahunarki (u prvom redu graha) u prehrani. Također, najviši doprinos voća unosu Se (i do 35% unosa, **Tablica 12**) je uočen kod ispitanica i ispitanika s najvišom konzumacijom kikirikija i oraha, bogatih ovim elementom (**Tablica 6**). Konačan status Se pojedinca nije izravno povezan s ukupnim unosom hranom zbog različite bioraspodjelivosti ovog elementa ovisno o kemijskom obliku, te ukupnom sastavu hrane (*VIDI Teorijski dio*). Tako na primjer, više Se iz ribe kod endemske u odnosu na kontrolnu populaciju (**Tablica 12**) najvjerojatnije znači veći udio neiskoristivog Se kod endemske populacije, obzirom na malu raspoloživost Se iz ribe zbog vezanja za živu i druge teške metale ¹⁰.

Prema važećim preporukama ^{88, 89}, srednji dnevni unos Se muškaraca oboljelih od EN zadovoljava, dok je srednji dnevni unos žena niži (**Tablica 11**), koji kod jedne ispitanice čini 40% preporuka (**Tablica 9**). Prema načinu na koji su preporučene vrijednosti utvrđene, zadovoljenjem istih najvjerojatnije ne dolaze do izražaja kemopreventivni učinci Se koji nisu vezani za poznate selenoenzyme. Možda najvažnije djelovanje višeg unosa Se za ovu skupinu je smanjenje rizika obolijevanja od raka. Posebno značajne su naznake preventivnog djelovanja Se u nastanku raka mokraćnog mjehura ¹⁹⁶. Obzirom na ukupni unos Se pacijenata od EN, te na ukupni unos Se koji

je u intervencijskim studijama dostignut ($290 \mu\text{g/d}$)⁷⁸, kao i na ograničenje unosa bjelanjčevina, ne može se postići unos dovoljnih količina hranom. Stoga bi za preventijske svrhe bilo najbolje korištenje dodataka Se. Također, budući da je endemska nefropatija bolest koja uključuje oksidativni stres i upalu, suplementacija selenijem bi mogla umanjiti neke od simptoma bolesti. Pokusima na životinjama je dokazano pozitivno djelovanje dodatka Se kod dijabetičke nefropatije²²⁴.

U kontrolnoj populaciji čak 65% žena ima unos Se niži od preporučenih $55 \mu\text{g/d}$ (**Tablica 9**), te kod njih nisu optimizirane ni aktivnosti poznatih selenoenzima. Muškarci ove skupine imaju znatno bolju opskrbu selenijem hranom, pri čemu je najniža vrijednost unosa 24% manja od preporuka. U odnosu na preporučene vrijednosti, opskrbljenost selenijem je znatno bolja u endemskoj populaciji (**Tablica 11**), u kojoj samo jedna ispitanica ima unos Se manji od 50% preporuka (**Tablica 9**). Ipak, prosječnom vrijednošću unosa Se u endemskoj populaciji od $79,3 \mu\text{g/d}$, se također ne postižu kemopreventivni učinci Se koji bi bili naročito korisni u ovoj populaciji s povećanim rizikom obolijevanja od tumora mokraćnog trakta⁹⁵. Iz dobivenih rezultata je očito da deficita Se na endemskom području nema, pa sam nedostatak Se nema ulogu u etiologiji EN na način na koji nedostatak ovog elementa dovodi do šećerne bolesti. Ovdje utvrđeni udio Se u tlu i žitaricama je u prosjeku dvostruko viši od vrijednosti utvrđenih u endemskim područjima Jugoslavije^{13, 108}. Temeljem nalaza koji upućuju na to da Se nije jedini etiološki čimbenik, Maksimović¹³ smatra da deficit Se, slabljenjem njegovog enzima posredovanog djelovanja u organizmu, može dovesti do jačeg štetnog djelovanja različitih nefrotoksičnih agenasa. Prema ustanovljenom dnevnom unosu u zdravoj endemskoj populaciji 86% ispitanica i ispitanika ima optimalnu antioksidantnu aktivnost Se, kao i aktivnost drugih poznatih selenoenzima (tj. unos Se jednak ili veći od preporučenih $55 \mu\text{g/d}$). Ipak, radovi u kojima je ispitivan utjecaj ovog elementa na metabolizam toksikanata sugeriraju višestruko veće unose Se za očitovanje detoksikacijskog učinka^{11, 225}. Stoga se može pretpostaviti da i ovakva, bolja opskrbljenost selenijem u odnosu na endemska područja u drugim zemljama, nije dovoljna za zaštitu od hipotetskog uzročnika. Usporedbom razine izloženosti toksikantima moguće etiološke važnosti (ohratoksin, aromatski ugljikovodici, i dr.), te opskrbe selenijem u različitim populacijama u kojima se javlja endemska nefropatija, konačno bi se mogla rasvijetliti i uloga ovog elementa. Daljnja istraživanja bi također trebala utvrditi utjecaj čimbenika poput sastava tla. Naime, geološke značajke endemskog područja i utvrđene razlike u udjelu Se kukuruza i kravljeg mlijeka proizvedenih u istom selu, su možda naznaka značajnih odstupanja u količini iskoristivog Se u tlu između lokacija koje ne moraju biti jako udaljene jedna od druge. Otuda su zamisliva velika odstupanja u unosu Se između domaćinstava koja se oslanjaju najvećim dijelom na vlastitu proizvodnju hrane.

6. ZAKLJUČCI

Analizom tla i uzoraka namirnica utvrđene su više koncentracije selenija u uzorcima s endemske u odnosu na kontrolnu lokaciju.

Ustanovljene su znatne razlike u prehrambenim navikama i unosu selenija žena i muškaraca oboljelih od endemske nefropatije koje su posljedica boljeg pridržavanja savjeta liječnika o prehrani kod žena. Uočene značajke prehrane, kao i opskrbljenost selenijem mogu utjecati na prognozu bolesti.

Nema veće razlike između endemske i kontrolne populacije u unosu osnovnih hranjivih tvari.

Neke značajke prehrane pogoršavaju već postojeći veći rizik obolijevanja od raka mokraćnog trakta u endemskoj populaciji. Utvrđen je identičan odnos osnovnih hranjivih tvari kod muškaraca oboljelih od endemske nefropatije i muške podskupine endemske populacije sastavljene od članova obitelji u kojima je bilo pojave ove bolesti. To može upućivati na prehrambene navike kao čimbenik rizika od ove bolesti.

Endemsko područje nije deficitarno selenijem. Srednji unos selenija je 30% viši u endemskoj u odnosu na kontrolnu populaciju (79,3 vs. 56,4 $\mu\text{g/d}$). Unos selenija manji od preporučenih vrijednosti ima 14% ispitanica i ispitanika u endemskoj, i 56% ispitanica i ispitanika u kontrolnoj populaciji.

Izostanak deficita selenija u endemskoj populaciji isključuje primarnu ulogu ovog elementa u nastanku endemske nefropatije.

Daljnja istraživanja bi trebala ispitati odnos opskrbljenosti selenijem i izloženosti potencijalnim uzročnicima endemske nefropatije u različitim područjima. Obzirom na ustanovljeni opseg koncentracija selenija u uzorcima kukuruza i kravljeg mlijeka s endemske lokacije, potrebno je ispitati sastav tla koji presudno utječe na iskoristivost selenija što može dovesti do velikih odstupanja u unosu ovog elementa u istom selu.

7. LITERATURA

1. Cohen, H.J. & Avissar, N. (1994): Extracellular glutathione peroxidase - A distinct selenoprotein. U: *Selenium in biology and human health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 79-91.
2. Sunde, R.A. (1994): Intracellular glutathione peroxidases - Structure, regulation, and function. U: *Selenium in biology and human health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 45-77.
3. Becker, K.; Gromer, S.; Schirmer, R.H. & Müller, S. (2000): Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* **267**, 6118-6125.
4. Moschos, M.P. (2000): Selenoprotein P. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1836-1845.
5. Arthur, J.R. & Beckett, G.J. (1994): Roles of selenium in type I iodothyronine 5'-deiodinase and in thyroid hormone and iodine metabolism. U: *Selenium in Biology and Human Health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 93-115.
6. Kohrle, J.; Brigelius-Flohe, R.; Bock, A.; Gartner, R.; Meyer, O. & Flohe, L. (2000): Selenium in biology: Facts and medical perspectives. *Biol Chem* **381**, 849-864.
7. Ursini, F.; Heim, S.; Kiess, M.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Wissing, J. & Flohe, L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **285**, 1393-1396.
8. Rayman, M.P. (2000): The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233-241.
9. Hansen, J.C. & Deguchi, Y. (1996): Selenium and fertility in animals and man - A review. *Acta Vet Scand* **37**, 19-30.
10. Johnston, J.N. & Savage, G.P. (1991): Mercury consumption and toxicity with reference to fish and fish meal. *Nutr Abstr Rev* **61**, 73-116.
11. Combs, G.F., Jr. (1999): Chemopreventive mechanisms of selenium. *Med Klin* **94**, 18-24.
12. Čeočić, S. & Miletić-Medved, M. (1996): Epidemiological features of endemic nephropathy in the focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: *Endemic nephropathy in Croatia*, Čvorišćec, D.; Čeočić, S. & Stavljenić-Rukavina, A., ur.; Academia Croatica Scientiarum Medicarum, Zagreb, pp. 7-21.
13. Maksimović, Z.J. (1991): Selenium deficiency and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S12-S14.
14. Gavrilović, B. & Matešić, D. (1987): Importance of selenium quantity in soil and fodder in regard to the occurrence of some diseases in cattle, pigs, sheep and poultry in Yugoslavia. U: *Selenium in Biology and Medicine*, Combs, G.F., Jr.; Spallholz, J.E.; Levander, O. A. & Oldfield, J. E., ur.; Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 740-749.
15. Klapac, T.; Mandić, M.L.; Grgić, J.; Primorac, Lj.; Ikić, M.; Lovrić, T.; Grgić, Z. & Herceg, Z. (1998): Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. *Sci Total Environ* **217**, 127-136.
16. Tatu, C.A.; Orem, W.H.; Finkelman, R.B. & Feder, G.L. (1998): The etiology of Balkan endemic nephropathy: Still more questions than answers. *Environ Health Perspect* **106**, 689-700.
17. Daniels, L.A. (1996): Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res* **54**, 185-199.
18. Mutanen, M. (1986): Bioavailability of selenium. *Ann Clin Res* **18**, 48-54.
19. Luo, X.; Wei, H.; Yang, C.; Xing, J.; Liu, X.; Qiao, C.; Feng, Y.; Liu, J.; Liu, Y.; Wu, Q.; Guo, J.; Stoecker, B.J.; Spallholz, J.E. & Yang, S.P. (1985): Bioavailability of selenium to residents in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr* **42**, 439-448.
20. 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 Clin Nutr* **36**, 24-31.
21. Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Scheid, S. & Gessner, H. (1991): Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *J Nutr* **121**, 806-814.
22. Kato, T.; Read, R.; Rozga, J. & Burk, R.F. (1992): Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with high hepatic extraction. *Am J Physiol* **262**, G854-G858.
23. Ganther, H.E. (1999): Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
24. Ip, C.; Thompson, H.J.; Zhu, Z.J. & Ganther, H.E. (2000): In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: Evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res* **60**, 2882-2886.
25. Stadtman, T.C. (1996): Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* **65**, 83-100.
26. Janghorbani, M.; Martin, R.F.; Kasper, L.J.; Sun, X.F. & Young, V.R. (1990): The selenite-exchangeable metabolic pool in humans: A new concept for the assessment of selenium status. *Am J Clin Nutr* **51**, 670-677.
27. Corvilain, B.; Contempré, B.; Longombé, A.O.; Goyens, P.; Gervy-Decoster, C.; Lamy, F.; Vanderpas, J.B. & Dumont, J.E. (1993): Selenium and the thyroid: How the relationship was established. *Am J Clin Nutr* **57** (Suppl.), 244S-248S.
28. Hill, K.E. & Burk, R.F. (1994): Selenoprotein P - An extracellular protein containing multiple selenocysteines. U: *Selenium in biology and human health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 117-131.
29. Vendeland, S.C.; Beilstein, M.A.; Chen, C.L.; Jensen, O.N.; Barofsky, E. & Whanger, P.D. (1993): Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* **268**, 17103-17107.
30. Whanger, P.D. (2000): Selenoprotein W: A review. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1846-1852.

31. Behne, D.; Hammel, C.; Pfeifer, H.; Röthlein, D.; Gessner, H. & Kyriakopoulos, A. (1998): Speciation of selenium in the mammalian organism. *Analyst* **123**, 871-873.
32. Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Weiss-Nowak, C.; Kalcklösch, M.; Westphal, C. & Gessner, H. (1996): Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. *Biol Trace Elem Res* **55**, 99-110.
33. Burk, R.F. & Hill, K.E. (1999): Orphan selenoproteins. *Bioessays* **21**, 231-237.
34. Kiremidjian-Schumacher, L.; Roy, M.; Wishe, H.I.; Cohen, M.W. & Stotzky, G. (1994): Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biol Trace Elem Res* **41**, 115-127.
35. Roy, M.; Kiremidjian-Schumacher, L.; Wishe, H.I.; Cohen, M.W. & Stotzky, G. (1994): Supplementation with selenium and human immune cell functions. I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression. *Biol Trace Elem Res* **41**, 103-114.
36. Larsen, H.J.S. (1993): Relations between selenium and immunity. *Norw J Agric Sci* (Suppl. 11), 105-119.
37. Taylor, E.W. (1995): Selenium and cellular immunity: Evidence that selenoproteins may be encoded in the +1 reading frame overlapping the human CD4, CD8, and HLA-DR genes. *Biol Trace Elem Res* **49**, 85-95.
38. Bedwal, R.S. & Bahaguna, A. (1994): Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* **50**, 626-640.
39. Behne, D.; Weiler, H. & Kyriakopoulos, A. (1996): Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reproduct Fertil* **106**, 291-297.
40. MacPherson, A., Scott, R., and Yates, R. (1995): The effect of selenium supplementation in sub-fertile men. Trace Elements in Man and Animals -TEMA 8, Dresden, Njemačka. Anke, M., Meissner, D. & Mills, C.F., ur.; 566-569.
41. Scott, R. & MacPherson, A. (1998): Selenium supplementation in sub-fertile human males. *Br J Urol* **82**, 76-80.
42. IPCS - International programme on chemical safety (1987): *Environmental health criteria 58. Selenium*; World Health Organization, Geneva.
43. Whanger, P.D. (1985): Metabolic interactions of selenium with cadmium, mercury and silver. *Adv Nutr Res* **7**, 221-224.
44. Ganther, H.E. (1978): Modification of methylmercury toxicity and metabolism by selenium and vitamin E: Possible mechanisms. *Environ Health Perspect* **25**, 71-75.
45. Harman, D. (1981): The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7124-7128.
46. Olivieri, O.; Stanzial, A.M.; Girelli, D.; Trevisan, M.T.; Guarini, P.; Terzi, M.; Caffi, S.; Fontana, F.; Casaril, M.; Ferrari, S. & Corrocher, R. (1994): Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: The Nove study. *Am J Clin Nutr* **60**, 510-517.
47. Olivieri, O.; Girelli, D.; Azzini, M.; Stanzial, A.M.; Russo, C.; Ferroni, M. & Corrocher, R. (1995): Low selenium status in the elderly influences thyroid hormones. *Clin Sci* **89**, 637-642.
48. Hawkes, W.C. & Hornbostel, L. (1996): Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry* **39**, 121-128.
49. Finley, J.W. & Penland, J.G. (1998): Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. *J Trace Elem Exp Med* **11**, 11-27.
50. Oldfield, J.E. (1987): The two faces of selenium. *J Nutr* **117**, 2002-2008.
51. Ge, K. & Yang, G. (1993): The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr* **57** (Suppl.), 259S-263S.
52. Keshan Disease Research Group of Chinese Academy of Medical Sciences (1982): Keshan disease and selenium in China. U: *Adolescent nutrition*, Winick, M., ur.; John Wiley & Sons, New York, pp. 127-138.
53. Beck, M.A.; Shi, Q.; Morris, V.C. & Levander, O.A. (1995): Rapid genomic evolution of a non-virulent Cocksackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat Med* **1**, 433-436.
54. Beck, M.A. & Levander, O.A. (1998): Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection. *Annu Rev Nutr* **18**, 93-116.
55. Zhang, W.; Ramanathan, C.S.; Nadimpalli, R.G.; Bhat, A.A.; Cox, A.G. & Taylor, E.W. (1999): Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses. *Biol Trace Elem Res* **70**, 97-116.
56. Taylor, E.W.; Nadimpalli, R.G. & Ramanathan, C.S. (1997): Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. *Biol Trace Elem Res* **56**, 63-91.
57. Oster, O. & Prellwitz, W. (1990): Selenium and cardiovascular disease. *Biol Trace Elem Res* **24**, 91-103.
58. Salonen, J.T.; Alfthan, G.; Huttunen, J.; Pikkarainen, J. & Puska, P. (1982): Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* **2**, 175-179.
59. Virtamo, J.; Valkeila, E.; Alfthan, G.; Punsar, S. & Huttunen, J.K. (1985): Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am J Epidemiol* **122**, 276-282.
60. Kardinaal, A.F.M.; Kok, F.J.; Kohlmeier, L.; Martin-Moreno, J.M.; Ringstad, J.; Gomez-Aracena, J.; Mazaev, V.P.; Thamm, M.; Martin, B.C.; Aro, A.; Kark, J.D.; Delgado-Rodriguez, M.; Riemersma, R.A.; van't Veer, P. & Huttunen, J.K. (1997): Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men -The EURAMIC study. *Am J Epidemiol* **145**, 373-379.

61. Kok, F.J.; Hofman, A.; Witteman, J.C.M.; de Bruijn, A.M.; Kruyssen, D.H.C.M.; de Bruin, M. & Valkenburg, H.A. (1989): Decreased selenium levels in acute myocardial infarction. *JAMA* **261**, 1161-1164.
62. Jiang, C.; Jiang, W.; Ip, C.; Ganther, H.E. & Lu, J. (1999): Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. *Mol Carcinog* **26**, 213-225.
63. Glavaš-Obrovac, Lj.; Klapac, T.; Mandić, M.L. & Karner, I. (2000): Anticancer effects of selenium compounds on human colonic carcinoma cells. *Acta Aliment* **29**, 295-306.
64. Yan, L. & Spallholz, J.E. (1993): Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol* **45**, 429-437.
65. Ip, C. & Ganther, H.E. (1994): Novel strategies in selenium cancer chemoprevention research. U: *Selenium in biology and human health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 169-180.
66. Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Gessner, H.; Walzog, B. & Meinhold, H. (1992): Type I iodothyronine deiodinase activity after high selenium intake and relations between selenium and iodine metabolism in rats. *J Nutr* **122**, 1542-1546.
67. Schrauzer, G.N.; White, D.A. & Schneider, C.J. (1977): Cancer mortality correlation studies. III. Statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem* **7**, 23-34.
68. Shamberger, R.J. & Willis, C.E. (1971): Selenium distribution and human cancer mortality. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2**, 211-221.
69. Yu, S.; Chu, Y.; Gong, X. & Hou, C. (1985): Region variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China. *Ecol Trace Elem Res* **7**, 21-23.
70. Clark, L.C.; Cantor, K.P. & Allaway, W.H. (1991): Selenium in forage crops and cancer mortality in US counties. *Arch Environ Health* **46**, 37-42.
71. Salonen, J.T.; Alfthan, G.; Huttunen, J.K. & Puska, P. (1984): Association between serum selenium and the risk of cancer. *Am J Epidemiol* **120**, 342-349.
72. Knekt, P.; Marniemi, J.; Teppo, L.; Heliovara, M. & Aromaa, A. (1998): Is low selenium status a risk factor for lung cancer? *Am J Epidemiol* **148**, 975-982.
73. van den Brandt, P.A.; Goldbohm, R.A.; van't Veer, P.; Bode, P.; Dorant, E.; Hermus, R.J.J. & Sturmans, F. (1993): A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer. *Cancer Res* **53**, 4860-4865.
74. Virtamo, J.; Valkeila, E.; Alfthan, G.; Punsar, S.; Huttunen, J.K. & Karvonen, M.J. (1987): Serum selenium and risk of cancer. A prospective follow-up of nine years. *Cancer* **60**, 145-148.
75. Garland, M.; Morris, J.S.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Spate, V.L.; Baskett, C.K.; Rosner, B.; Speizer, F.E.; Willett, W.C. & Hunter, D.J. (1995): Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *J Natl Cancer Inst* **87**, 497-505.
76. van den Brandt, P.A.; Goldbohm, R.A.; van't Veer, P.; Bode, P.; Dorant, E.; Hermus, R.J.J. & Sturmans, F. (1994): Toenail selenium levels and the risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* **140**, 20-26.
77. Young, K.J. & Lee, P.N. (1999): Intervention studies on cancer. *Eur J Cancer Prev* **8**, 91-103.
78. Clark, L.C.; Combs, G.F.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; Krongrad, A.; Lesher, J.L.; Park, H.K.; Sanders, B.B.; Smith, C.L. & Taylor, J.R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin - A randomized controlled trial. *JAMA* **276**, 1957-1963.
79. Yu, S.Y.; Zhu, Y.J. & Li, W.G. (1997): Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol Trace Elem Res* **56**, 117-124.
80. Klapac, T., Mandić, M.L. & Primorac, Lj. (1998): *Značenje selena za zdravlje*; Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
81. Temple, N.J. (2000): Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutr Res* **20**, 449-459.
82. Mates, J.M.; Perez-Gomez, C. & Blanca, M. (2000): Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clin Chim Acta* **296**, 1-15.
83. Tarp, U. (1994): Selenium and the selenium-dependent glutathione peroxidase in rheumatoid arthritis. *Danish Med Bul* **41**, 264-274.
84. Kuklinsky, B. & Schweder, R. (1996): Acute pancreatitis, a free radical disease; reducing the lethality with the sodium selenite and other antioxidants. *J Nutr Environ Med* **6**, 393-394.
85. Hasselmark, L.; Malmgren, L.; Zetterstrom, O. & Unge, G. (1993): Selenium supplementation in intrinsic asthma. *Allergy* **48**, 30-36.
86. Fordyce, F.M.; Zhang, G.D.; Green, K. & Liu, X.P. (2000): Soil, grain and water chemistry in relation to human selenium-responsive diseases in Enshi District, China. *Appl Geochem* **15**, 117-132.
87. Navarro-Alarcón, M. & López-Martínez, M.C. (2000): Essentiality of selenium in the human body: Relationship with different diseases. *Sci Total Environ* **249**, 347-371.
88. Commission of the European Communities (1993): Reports of the Scientific Committee for Food, Nutrient and Energy Intakes for the European Community; European Commission, Brussels.
89. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes of the Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, the National Academies with Health Canada (2000): Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids; National Academy Press, Washington D.C.

90. Yang, G.Q. & Xia, Y.M. (1995): Studies on human dietary requirements and safe range of dietary intakes of selenium in China and their application in the prevention of related endemic diseases. *Biomed Environ Sci* **8**, 187-201.
91. Duffield, A.J.; Thomson, C.D.; Hill, K.E. & Williams, S. (1999): An estimation of selenium requirements for New Zealanders. *Am J Clin Nutr* **79**, 896-903.
92. Fuchs, R. & Radić, B. (1996): Endemic nephropathy. U: *Endemic nephropathy in Croatia*, Čvorišćec, D.; Čeočić, S. & Stavljenić-Rukavina, A., ur.; Academia Croatica Scientiarum Medicarum, Zagreb, pp. 31-38.
93. Feder, G.L.; Radovanović, Z. & Finkelman, R.B. (1991): Relationship between weathered coal deposits and the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S9-S11.
94. Radonić, M.; Radošević, Z. & Županić, V. (1966): Endemic nephropathy in Yugoslavia. U: *The kidney*, Mostofi, F.K., ur.; Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 503-522.
95. Čukuranović, R.; Ignjatović, M. & Stefanović, V. (1991): Urinary tract tumors and Balkan nephropathy in the South Morava River basin. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S80-S84.
96. Đorđević, V.B.; Strahinjić, S.; Koračević, D.; Miljković, P.; Đorđević, V.; Pavlović, D. & Stefanović, V. (1991): Erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase measurement in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S93-S96.
97. Wedeen, R.P. (1991): Environmental renal disease: Lead, cadmium and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S4-S8.
98. Orem, W.H.; Feder, G.L. & Finkelman, R.B. (1999): A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignite by groundwater: Preliminary investigation. *Int J Coal Geol* **40**, 237-252.
99. Šarić, M.; Peraica, M.; Radić, B. & Lucić, A. (1997): Uloga mikotoksina u etiologiji endemske nefropatije. *Arh Hig Rada Toksikol* **48**, 113-118.
100. Vrabcheva, T.; Usleber, E.; Dietrich, R. & Martlbauer, E. (2000): Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agric Food Chem* **48**, 2483-2488.
101. Pfohlleszkowicz, A.; Pinelli, E.; Bartsch, H.; Mohr, U. & Castegnaro, M. (1998): Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450S in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Mol Carcinogen* **23**, 76-85.
102. Toncheva, D.; Dimitrov, T. & Tzoneva, M. (1988): Cytogenetic studies in Balkan endemic nephropathy. *Nephron* **44**, 18-21.
103. Toncheva, D.I.; Gergov, T.D.; Tzoneva, M.T. & Bouchakliev, Z.P. (1991): Spontaneous and induced chromosome aberrations in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl. 34), S97-S101.
104. Pavlović, N.M.; Varghese, Z.; Persaud, J.W.; Stefanović, V.; Strahinjić, S.; Savić, V. & Moorehead, J.F. (1991): Partial lecithin : cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency in Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int* **40** (Suppl.34), S102-S104.
105. Aleraj, B. (1996): A study of the viral etiology of endemic nephropathy. U: *Endemic nephropathy in Croatia*, Čvorišćec, D.; Čeočić, S. & Stavljenić-Rukavina, A., ur.; Academia Croatica Scientiarum Medicarum, Zagreb, pp. 23-29.
106. Maksimović, Z. & Đujić, I. (1998): Selenium research in Serbia, Yugoslavia. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **17**, 165-171.
107. Yang, G.Q.; Chen, J.; Wen, Z.; Ge, K.; Zhu, L.Z. & Chen, X. (1984): The role of selenium in Keshan disease. U: *Advances in Nutritional Research*, Draper, H.H., ur.; Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 203-231.
108. Mihailović, M.; Lindberg, P.; Jovanović, I. & Antić, D. (1992): Selenium status of patients with Balkan endemic nephropathy. *Biol Trace Elem Res* **33**, 71-77.
109. Bellisola, G.; Guidi, G.C.; Cinque, G.; Galassini, S.; Liu, N.Q.; Moschini, G.; Rugiu, C. & Lupo, A. (1996): Selenium status and plasma glutathione peroxidase in patients with IgA nephropathy. *J Trace Elem Med Biol* **10**, 189-196.
110. Bingham, S.A. (1987): The dietary assessment of individuals; Methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Nutr Abstr Rev* **57**, 705-742.
111. Barrett-Connor, E. (1991): Nutrition epidemiology: How do we know what they ate? *Am J Clin Nutr* **54**, 182S-187S.
112. Lee-Han, H.; McGuire, V. & Boyd, N.F. (1989): A review of methods used by studies of dietary measurement. *J Clin Epidemiol* **42**, 269-279.
113. Kaić-Rak, A. & Antić, K. (1990): *Tablice o sastavu namirnica i pića*; Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb.
114. Medlin, C. & Skinner, J.D. (1988): Individual dietary intake methodology: A 50-year review of progress. *J Am Diet Assoc* **88**, 1250-1257.
115. Bingham, S.A. (1991): Limitations of the various methods for collecting dietary intake data. *Ann Nutr Metab* **35**, 117-127.
116. Gersovitz, M.; Madden, J.P. & Smicklas-Wright, H. (1978): Validity of the 24-hr dietary recall and seven-day record for group comparisons. *J Am Diet Assoc* **73**, 48-55.

117. Bingham, S.A.; Wiggins, H.S.; Englyst, H.; Seppänen, R.; Helms, P.; Strand, R.; Burton, R.; Jorgensen, I.M.; Poulsen, L.; Paerregaard, A.; Bjerrum, L. & James, W.P. (1982): Methods and validity of dietary assessments in four Scandinavian populations. *Nutr Cancer* **4**, 23-33.
118. Bolland, J.E.; Yuhás, J.A. & Bolland, T.W. (1987): Estimation of food portion sizes: Effectiveness of training. *J Am Diet Assoc* **88**, 817-821.
119. Kretsch, M.J. & Fong, A.K.H. (1990): Validation of a new computerized technique for quantitating individual dietary intake: The Nutrition Evaluation Scale System (NESSy) vs. the weighed food record. *Am J Clin Nutr* **51**, 477-484.
120. Isaksson, B. (1993): A critical evaluation of the duplicate-portion technique in dietary surveys. *Eur J Clin Nutr* **47**, 457-460.
121. Kim, W.W.; Mertz, W.; Judd, J.T.; Marshall, M.W.; Kelsay, J.L. & Prather, E. (1984): Effect of making duplicate food collections on nutrient intakes calculated from diet records. *Am J Clin Nutr* **40**, 1333-1337.
122. Haines, C.J.; Chung, T.K.H.; Leung, P.C.; Leung, D.H.Y.; Wong, M.Y. & Lam, L.L. (1994): Dietary calcium intake in postmenopausal Chinese women. *Eur J Clin Nutr* **48**, 591-594.
123. Beaton, G.H.; Milner, J.; Corey, P.; McGuire, V.; Cousins, M.; Stewart, E.; de Ramos, M.; Hewitt, D.; Grambsch, P.V.; Kassim, N. & Little, J.A. (1979): Sources of variation in 24-hour dietary recall data: Implications for nutrition study design and interpretation. *Am J Clin Nutr* **32**, 2546-2559.
124. Borrelli, R. (1990): Collection of food intake data: A reappraisal of criteria for judging the methods. *Br J Nutr* **63**, 411-417.
125. Deurenberg-Yap, M.; Li, T.; Tan, W.L.; van Staveren, W.A. & Deurenberg, P. (2000): Validation of a semiquantitative food frequency questionnaire for estimation of intakes of energy, fats and cholesterol among Singaporeans. *Asia Pac J Clin Nutr* **9**, 282-288.
126. Margetts, B.M.; Cade, J.E. & Osmond, C. (1989): Comparison of a food frequency questionnaire with a diet record. *Int J Epidemiol* **18**, 868-873.
127. Horwath, C.C. (1993): Validity of a short food frequency questionnaire for estimating nutrient intake in elderly people. *Br J Nutr* **70**, 3-14.
128. Flegal, K.M. & Larkin, F.A. (1990): Partitioning macronutrient intake estimates from a food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* **131**, 1046-1058.
129. Tjønneland, A.; Haraldsdóttir, J.; Overvad, K.; Stripp, C.; Ewertz, M. & Møller Jensen, O. (1992): Influence of individually estimated portion size data on the validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Int J Epidemiol* **21**, 770-777.
130. Eck, L.H.; Klesges, R.C.; Hanson, C.L.; Slawson, D.; Portis, L. & Lavasque, M.E. (1991): Measuring short-term dietary intake: Development and testing of a 1-week food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* **91**, 940-945.
131. Primorac, Lj.; Mandić, M.L.; Klačec, T.; Folivarski, K.; Perl, A. & Sudar, R. (2000): Adequacy of a food composition database to estimate fat and fatty acid intake. *Int J Food Sci Nutr* **51**, 25-32.
132. Deharveng, G.; Charrondiere, U.R.; Slimani, N.; Southgate, D.A.T. & Riboli, E. (1999): Comparison of nutrients in the food composition tables available in the nine European countries participating in EPIC. *Eur J Clin Nutr* **53**, 60-79.
133. Riboli, E.; Toniolo, P.; Kaaks, R.; Shore, R.E.; Casagrande, C. & Pasternack, B.S. (1997): Reproducibility of a food frequency questionnaire used in the New York University Women's Health Study: Effect of self-selection by study subjects. *Eur J Clin Nutr* **51**, 437-442.
134. Salvini, S.; Hunter, D.J.; Sampson, L.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Rosner, B. & Willett, W.C. (1989): Food-based validation of a dietary questionnaire: The effects of week-to-week variation in food consumption. *Int J Epidemiol* **18**, 858-867.
135. Rimm, E.B.; Giovannucci, E.L.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Litin, L.B. & Willett, W.C. (1992): Reproducibility and validity of an expanded self-administered semiquantitative food frequency questionnaire among male health professionals. *Am J Epidemiol* **135**, 1114-1126.
136. Willett, W.C.; Sampson, L.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Bain, C.; Witschi, J.; Hennekens, C.H. & Speizer, F.E. (1985): Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* **122**, 51-65.
137. Tjønneland, A.; Overvad, K.; Haraldsdóttir, J.; Bang, S.; Ewertz, M. & Møller Jensen, O. (1991): Validation of a semiquantitative food frequency questionnaire developed in Denmark. *Int J Epidemiol* **20**, 906-912.
138. Black, A.E.; Goldberg, G.R.; Jebb, S.A.; Livingstone, M.B.E.; Cole, T.J. & Prentice, A.M. (1991): Critical evaluation of energy intake using fundamental principles of energy physiology: 2. Evaluating the results of published surveys. *Eur J Clin Nutr* **45**, 583-599.
139. Samaras, K.; Kelly, P.J. & Campbell, L.V. (1999): Dietary underreporting is prevalent in middle-aged British women and is not related to adiposity (percentage body fat). *Int J Obes* **23**, 881-888.
140. Sawaya, A.L.; Tucker, K.; Tsay, R.; Willett, W.C.; Saltzman, E.; Dallal, G.E. & Roberts, S.B. (1996): Evaluation of four methods for determining energy intake in young and older women: Comparison with doubly labelled water measurements of total energy expenditure. *Am J Clin Nutr* **63**, 491-499.
141. Larkin, F.A.; Metzner, H.L.; Thompson, F.E.; Flegal, K.M. & Guire, K.E. (1989): Comparison of estimated nutrient intakes by food frequency and dietary records in adults. *J Am Diet Assoc* **89**, 215-223.

142. Kroke, A.; Klipstein-Grobusch, K.; Voss, S.; Moseneder, J.; Thielecke, F.; Noack, R. & Boeing, H. (1999): Validation of a self-administered food-frequency questionnaire administered in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study: Comparison of energy, protein, and macronutrient intakes estimated with the doubly labeled water, urinary nitrogen, and repeated 24-h dietary recall methods. *Am J Clin Nutr* **70**, 439-447.
143. Prentice, A.M.; Black, A.E.; Coward, W.A.; Davies, H.L.; Goldberg, G.R.; Murgatroyd, P.R.; Ashford, J.; Sawyer, M. & Whitehead, R.G. (1986): High levels of energy expenditure in obese women. *Br Med J* **292**, 983-987.
144. Mertz, W.; Tsui, J.C.; Judd, J.T.; Reiser, S.; Hallfrisch, J.; Morris, E.R.; Steele, P.D. & Lashley, E. (1991): What are people really eating? The relation between energy intake derived from estimated diet records and intake determined to maintain body weight. *Am J Clin Nutr* **54**, 291-295.
145. Bergman, E.A.; Boyungs, J.C. & Erickson, M.L. (1990): Comparison of a food frequency questionnaire and a 3-day diet record. *J Am Diet Assoc* **90**, 1431-1433.
146. Colditz, G.A.; Willett, W.C.; Stampfer, M.J.; Sampson, L.; Rosner, B.; Hennekens, C.H. & Speizer, F.E. (1987): The influence of age, relative weight, smoking, and alcohol intake on the reproducibility of a dietary questionnaire. *Int J Epidemiol* **16**, 392-398.
147. Willett, W.C.; Reynolds, R.D.; Cottrell-Hoehner, S.; Sampson, L. & Browne, M.L. (1987): Validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire: Comparison with a 1-year diet record. *J Am Diet Assoc* **87**, 43-47.
148. Musgrave, K.O.; Giambalvo, L.; Leclerc, H.L.; Cook, R.A. & Rosen, C.J. (1989): Validation of a quantitative food frequency questionnaire for rapid assessment of dietary calcium intake. *J Am Diet Assoc* **89**, 1484-1488.
149. Martin-Moreno, J.M.; Boyle, P.; Gorgojo, L.; Maisonneuve, P.; Fernandez-Rodriguez, J.C.; Salvini, S. & Willett, W.C. (1993): Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol* **22**, 512-519.
150. Donner, A. & Koval, J.J. (1980): The estimation of intraclass correlation in the analysis of family data. *Biometrics* **36**, 19-25.
151. Pietinen, P.; Hartman, A.M.; Haapa, E.; Räsänen, L.; Haapakoski, J.; Palmgren, J.; Albanes, D.; Virtamo, J. & Huttunen, J.K. (1988): Reproducibility and validity of dietary assessment instruments I. A self-administered food use questionnaire with a portion size picture booklet. *Am J Epidemiol* **128**, 655-666.
152. Willett, W.C. & Stampfer, M.J. (1986): Total energy intake: Implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol* **124**, 17-27.
153. Stuff, J.E.; Garza, C.; Smith, E.O.; Nichols, B.L. & Montandon, C.M. (1983): A comparison of dietary methods in nutritional studies. *Am J Clin Nutr* **37**, 300-306.
154. Flagg, E.W.; Coates, R.J.; Calle, E.E.; Potischman, N. & Thun, M.J. (2000): Validation of the American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Survey Cohort food frequency questionnaire. *Epidemiol* **11**, 462-468.
155. Bull, N.L. & Wheeler, E.F. (1986): A study of different dietary survey methods among 30 civil servants. *Hum Nutr Appl Nutr* **40A**, 60-66.
156. Russell-Briefel, R.; Caggiula, A.W. & Kuller, L.H. (1985): A comparison of three dietary methods for estimating vitamin A intake. *Am J Epidemiol* **122**, 628-636.
157. Pietinen, P.; Hartman, A.M.; Haapa, E.; Räsänen, L.; Haapakoski, J.; Palmgren, J.; Albanes, D.; Virtamo, J. & Huttunen, J.K. (1988): Reproducibility and validity of dietary assessment instruments. II A qualitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* **128**, 667-676.
158. Crews, H.M.; Lewis, D.J.; Fairweather-Tait, S.J.; Fox, T.; Arthur, J.R. & Brown, K.M. (1997): The analyst's viewpoint with special reference to selenium. *Nutr Food Sci* **6**, 221-224.
159. Galgan, V. & Frank, A. (1993): Notes and comments on the determination of selenium in biological materials. *Norw J Agric Sci (Suppl. 11)*, 57-74.
160. Raptis, S.E.; Kaiser, G. & Tölg, G. (1983): A survey of selenium in the environment and a critical review of its determination at trace levels. *Fresenius Z Anal Chem* **316**, 105-123.
161. Neve, J.; Hanocq, M.; Molle, L. & Lefebvre, G. (1982): Study of some systematic errors during the determination of the total selenium and some of its ionic species in biological materials. *Analyst* **107**, 934-941.
162. Hocquellet, P. & Candillier, M.P. (1991): Evaluation of microwave digestion and solvent extraction for the determination of trace amounts of selenium in feeds and plant and animal tissues by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* **116**, 505-509.
163. Fairhurst, J.; Lloyd, B. & Delves, H.T. (1987): Determination of selenium in human tissues by atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* **197**, 97-104.
164. Reamer, D.C. & Veillon, C. (1981): Preparation of biological materials for determination of selenium by hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* **53**, 1195-1199.
165. Fecher, P. & Ruhnke, G. (1998): Determination of arsenic and selenium in foodstuffs - Methods and errors. *Atom Spectroscopy* **19**, 204-206.

166. Campbell, A.D. (1984): Determination of selenium in biological materials and water. *Pure Appl Chem* **56**, 645-651.
167. Klapac, T. (1997): Procjena dnevnog unosa selena hranom. *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
168. Brodarec, A. (1975): *Tablice o sastavu i prehrambenoj vrijednosti normativa za planiranje prehrane u školama*; Školska knjiga, Zagreb.
169. Kadrabova, J.; Madarič, A. & Ginter, E. (1997): The selenium content of selected food from the Slovak Republic. *Food Chem* **58**, 29-32.
170. Analytical Methods Committee (1979): Determination of small amounts of selenium in organic matter. *Analyst* **104**, 778-787.
171. Julshamn, K.; Ringdal, O.; Slinning, K.E. & Braekkan, O.R. (1982): Optimization of the determination of selenium in marine samples by atomic absorption spectrometry: Comparison of a flameless graphite furnace atomic absorption system with a hydride generation atomic absorption system. *Spectrochim Acta* **37B**, 482.
172. Fardy, J.J.; McOrist, G.D. & Farrar, Y.J. (1989): The determination of selenium status in the Australian diet using neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem* **133**, 397-405.
173. Joint Food Safety and Standards Group (1997): Food Surveillance Information Sheet, No. 126, UK Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London.
174. Snook, J.T.; Kinsey, D.; Palmquist, D.L.; DeLany, J.P.; Vivian, V.M. & Moxon, A.L. (1987): Selenium content of foods purchased or produced in Ohio. *J Am Diet Assoc* **87**, 744-749.
175. Bratakos, M.S.; Zafiroopoulos, T.F.; Siskos, P.A. & Ioannou, P.V. (1987): Selenium in foods produced and consumed in Greece. *J Food Sci* **52**, 817-822.
176. Pennington, J.A.T.; Young, B.E.; Wilson, D.B.; Johnson, R.D. & Vanderveen, J.E. (1986): Mineral content of foods and total diets: The selected minerals in Foods Survey, 1982 to 1984. *J Am Diet Assoc* **86**, 876-891.
177. Olson, O.E.; Novacek, E.J.; Whitehead, E.I. & Palmer, I.S. (1970): Investigations on selenium in wheat. *Phytochem* **9**, 1181-1188.
178. Gavrilović, B. (1981): O pojavi bolesti dudolikog srca među svinjama u Požeškoj kotlini. *Praxis Vet* **28**, 331-335.
179. Matešić, D.; Kos, K. & Strašek, A. (1981): Količina selena u nekim krmivima i smjesama za perad s područja SR Hrvatske. *Vet Arhiv* **51**, 79-82.
180. Finley, J.W.; Matthys, L.; Shuler, T. & Korynta, E. (1996): Selenium content of foods purchased in North Dakota. *Nutr Res* **16**, 723-728.
181. Alaejos, M.S. & Romero, C.D. (1995): Selenium concentration in milks. *Food Chem* **52**, 1-18.
182. Golubkina, N.A. & Sokolov, Y.A. (1997): Level of selenium provision in the inhabitants of the northern economic region of Russia. *Gigiena Sanitariya*, 22-24.
183. Wright, P.L. & Bell, M.C. (1966): Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. *Am J Physiol* **211**, 6-10.
184. Pfannhauser, W. (1988): *Essentielle Spurenelemente in der Nahrung*; Springer-Verlag, Berlin.
185. Beale, A.M.; Fasulo, D.A. & Craigmill, A.L. (1990): Effects of oral and parenteral selenium supplements on residues in meat, milk and eggs. *Rev Environ Contam Toxicol* **115**, 125-150.
186. Beker, D.; Šatović, V. & Vukelić, N. (1994): Selenium content of chicken meat in Croatia. *Nahrung* **38**, 267-272.
187. Beker, D. & Šatović, V. (1994): Selenium levels in foodstuffs of animal origin. *Vet Arhiv* **64**, 69-75.
188. Johnson, C.C.; Ge, X.; Green, K.A. & Liu, X. (2000): Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People's Republic of China. *Appl Geochem* **15**, 385-401.
189. Wilplinger, M.; Sima, A. & Pfannhauser, W. (1998): Selengehalt in der Nahrung und dessen Zusammenhang zum Gehalt im Boden. *Lebensmittelchemie* **52**, 93-95.
190. Mizutani, T.; Tanabe, K.; Watanabe, K. & Goto, M. (1996): Selenium contents in Astragalus and uncultivated soils in Japan. *Jap J Toxicol Environ Health* **42**, 360-366.
191. WHO (1990): Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases
192. WHO/FAO (1995): WHO and FAO Joint consultation: Fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev* **53**, 202-205.
193. Primorac, Lj. (1998): Osobine prehrane dijela populacije Istočne Slavonije s obzirom na unos masti i masnih kiselina. *Doktorski rad*, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.
194. Marlett, J.A. & Slavin, J.L. (1997): Health implications of dietary fiber - Position of ADA. *J Am Diet Assoc* **97**, 1157-1159.
195. Fried, L.F.; Orchard, T.J. & Kasiske, B.L. (2001): Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: A meta-analysis. *Kidney Int* **59**, 260-269.
196. Kamat, A.M. & Lamm, D.L. (1999): Chemoprevention of urological cancer. *J Urol* **161**, 1748-1760.
197. Lemon, P.W.R. (2000): Beyond the zone: Protein needs of active individuals. *J Am Coll Nutr* **19** (5 Suppl. S), 513S-521S.
198. Poortmans, J.R. & Dellalieux, O. (2000): Do regular high protein diets have potential health risks on kidney function in athletes? *Int J Sport Nutr* **10**, 28-38.

199. Mennen, L.I.; Mbanya, J.C.; Cade, J.; Balkau, B.; Sharma, S.; Chungong, S. & Cruickshank, J.K. (2000): The habitual diet in rural and urban Cameroon. *Eur J Clin Nutr* **54**, 150-154.
200. Chadha, S.L. (1998): Urban-rural differences in prevalence of coronary heart disease and its risk factors. *Current Sci* **74**, 1069-1073.
201. Koch, V. & Pokorn, D. (1999): Some differences in nutritional habits between males and females in the Republic of Slovenia. *Food Technol Biotechnol* **37**, 181-186.
202. Duffield, A.J. & Thomson, C.D. (1999): A comparison of methods of assessment of dietary selenium intakes in Otago, New Zealand. *Br J Nutr* **82**, 131-138.
203. Bunker, V.W.; Lawson, M.S.; Stansfield, M.F. & Clayton, B.E. (1988): Selenium balance studies in apparently healthy and housebound elderly people eating self-selected diets. *Br J Nutr* **59**, 171-180.
204. Matek, M.; Blanuša, M. & Grgić, J. (2000): Determination of the daily dietary selenium intake in Croatia. *Eur Food Res Technol* **210**, 155-160.
205. Bratakos, M.S.; Zafiroopoulos, T.F.; Siskos, P.A. & Ioannou, P.V. (1988): Selenium losses on cooking Greek foods. *Int J Food Sci Technol* **23**, 585-590.
206. Yang, G.Q.; Wang, S.; Zhou, R. & Sun, S. (1983): Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* **37**, 872-881.
207. Robberecht, H.J.; Hendrix, P.; van Cauwenbergh, R. & Deelstra, H.A. (1994): Actual daily dietary intake of selenium in Belgium, using duplicate portion sampling. *Z Lebensm Unters Forsch* **199**, 251-254.
208. Robinson, M.F. (1988): 1988 McCollum award lecture. The New Zealand selenium experience. *Am J Clin Nutr* **48**, 521-534.
209. Benemariya, H.; Robberecht, H. & Deelstra, H. (1993): Daily dietary intake of copper, zinc and selenium by different population groups in Burundi, Africa. *Sci Total Environ* **136**, 49-76.
210. Varo, P.; Alfthan, G.; Huttunen, J.K. & Aro, A. (1994): Nationwide selenium supplementation in Finland: Effects on diet, blood and tissue levels, and health. U: *Selenium in Biology and Human Health*, Burk, R.F., ur.; Springer-Verlag, New York, pp. 197-218.
211. Pfannhauser, W. (1992): Das essentielle Spurenelement Selen: Bedeutung, Wirkung und Vorkommen in der Nahrung: Selenversorgung und Aufnahmedaten aus Österreich im Vergleich mit Daten aus anderen Ländern. Schlußfolgerungen. *Ernährung* **16**, 642-646.
212. Kadrabova, J.; Madarič, A. & Ginter, E. (1998): Determination of the daily selenium intake in Slovakia. *Biol Trace Elem Res* **61**, 277-286.
213. Shortt, C.T.; Duthie, G.G.; Robertson, J.D.; Morrice, P.C.; Nicol, F. & Arthur, J.R. (1997): Selenium status of a group of Scottish adults. *Eur J Clin Nutr* **51**, 400-404.
214. Oster, O. & Prellwitz, W. (1989): The daily dietary selenium intake of West German adults. *Biol Trace Elem Res* **20**, 1-14.
215. Pelus, E.; Arnaud, J.; Ducros, V.; Faure, H.; Favier, A. & Roussel, A.M. (1994): Trace element (Cu, Zn, Fe, Mn, Se) intakes of a group of French men using the duplicate diet technique. *Int J Food Sci Nutr* **45**, 63-70.
216. van Dokkum, W.; de Vos, R.H.; Muys, T. & Wesstra, J.A. (1989): Minerals and trace elements in total diets in the Netherlands. *Br J Nutr* **61**, 7-15.
217. Zimmerli, B. & Haldimann, M. (1998): Selenstatus der schweizerischen Bevölkerung 3. Veränderungen und deren Ursachen. *Mitt Gebiete* **89**, 257-293.
218. Robberecht, H.J. & Deelstra, H.A. (1984): Dietary selenium intake in Belgium. *Z Lebensm Unters Forsch* **178**, 266-271.
219. Hirai, K.; Noda, K. & Danbara, H. (1996): Selenium intake based on representative diets in Japan, 1957 to 1989. *Nutr Res* **16**, 1471-1477.
220. Swanson, C.A.; Longnecker, M.P.; Veillon, C.; Howe, S.M.; Levander, O.A.; Taylor, P.R.; McAdam, P.A.; Brown, C.C.; Stampfer, M.J. & Willett, W.C. (1990): Selenium intake, age, gender, and smoking in relation to indices of selenium status of adults residing in a seleniferous area. *Am J Clin Nutr* **52**, 858-862.
221. Wyatt, C.J.; Meléndez, J.M.; Acuna, N. & Rascon, A. (1996): Selenium (Se) content of foods in northern Mexico, their contribution to the daily Se intake and the relationship of Se plasma levels and glutathione peroxidase activity. *Nutr Res* **16**, 949-960.
222. Roekens, E.J.; Robberecht, H.J. & Deelstra, H.A. (1986): Dietary selenium intake in Belgium for different population groups at risk for deficiency. *Z Lebensm Unters Forsch* **182**, 8-13.
223. Thomson, C.D. & Robinson, M.F. (1980): Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *Am J Clin Nutr* **33**, 303-323.
224. Douillet, C.; Tabib, A.; Bost, M.; Accominotti, M.; Borson-Chazot, F. & Ciavatti, M. (1999): Selenium in diabetes: Effects of selenium on nephropathy in type I streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Exp Med* **12**, 379-392.
225. Milner, J.A. (1995): Does dietary selenium really influence the cancer process. *Israel J Vet Med* **50**, 137-146.

8. PRILOZI

IME I PREZIME: _____

[illegible]

NAMIRNICA	KAKO ČESTO								KOLIČINA			
	2+ X NA DAN	1 X NA DAN	4-6 X TJEDNO	2-3 X TJEDNO	1 X TJEDNO	2-3 X MJESEČ.	1 X MJESEČ.	NIJEDNOM	SREDNJA PORCIJA (S)	M	S	V
POVRĆE												
Brokula									1 zdjelica			
Šparoge									1 zdjelica			
Blitva									1 zdjelica			
Patlidžan									4 srednje kriške			
Tikvice, varivo									1 zdjelica			
Tikvice, pohane									4 srednje kriške			
Sataraš									1 zdjelica			
Ajvar									1 jušna žlica			
MESO I PROIZVODI												
Svinjetina, pečena									srednji dlan (80 g)			
Svinjetina, pirjana*									80 g			
Prasetina, pečena									80 g			
Mljeveno meso									100 g			
Junetina, kuhana									50 g			
Junetina, pirjana*									50 g			
Teletina									70 g			
Janjetina, pečena									80 g			
Riba, riječna, kuh.									150 g			
Riba, riječna, peč.									150 g			
Riba, morska									150 g			
Riba, konzervirana									1 konzerva			
Morski plodovi									1,5 zdjelica			
Piletina, pečena									70 g			
Piletina, kuhana*									70 g			
Puretina									70 g			
Pašteta									1 konzerva od 50 g			
Mesni doručak									1 konzerva od 100			
Hrenovke									1 par			
Salama (koja?)									2 kriške ili 45 g			
Šunka, u crijevu									2 kriške ili 45 g			
Šunka, dimljena									2 kriške ili 60 g			
Kobasice, dimljene									60 g			
Krvavica									60 g			
Švargl									60 g			
Slanina									60 g			
Čvarci									1/2 zdjelice			
Iznutrice									1/2 zdjelice			
JAJA, MLIJEKO I PROIZVODI												
Jaja, pečena									2 komada			
Jaja, kuhana									2 komada			
Mlijeko, punomasno									1 šalica			
Mlijeko, 2,8% m.m.									1 šalica			
Mlijeko, 1% m.m.									1 šalica			
Sir, svježi									1/2 zdjelice			
Sir, trapist									50 g			

* -podrazumijeva samostalnu namirnicu ali i istu u složenim jelima

NAMIRNICA	KAKO ČESTO								KOLIČINA			
	2+ X NA DAN	1 X NA DAN	4-6 X TJEDNO	2-3 X TJEDNO	1 X TJEDNO	2-3 X MJESEČ.	1 X MJESEČ.	NIJEDNOM	SREDNJA PORCIJA (S)	M	S	V
JAJA, MLIJEKO I PROIZVODI												
Sir, krem, namaz									60 g			
Sir, topljeni									2 komada ili 60 g			
Jogurt									2 dl			
Vrhnje									2 jušne žlice			
Čokoladno mlijeko									1 šalica			
KRUH, TIJESTO, ŽITARICE												
Kruh, bijeli									2 kriške ili 100 g			
Kruh, crni									2 kriške ili 100 g			
Kruh, raženi									2 kriške ili 100 g			
Kruh sa sjemenkama									2 kriške ili 100 g			
Pecivo									1 komad			
Piroške, Croissant									1 komad			
Burek (koji?)									1 / 4			
Tijesto, Spaghetti									2 zdjelice			
Lasagna									1 zdjelica			
Pizza									1 komad (30 cm)			
Riža									1 zdjelica			
Müsli									1/2 zdjelice			
Corn flakes									1 zdjelica			
Zobene pahuljice									1/2 zdjelice			
Palačinke (koje?)									3 komada			
Knedle od šljiva									2 srednje veličine			
Žganci									1,5 zdjelica			
Griz									1,5 zdjelica			
BRZA HRANA, SLATKIŠI, SNACK PROIZVODI												
Kolač									2 komada ili 60 g			
Keks, slani									1/2 zdjelice			
Keks, slatki									1/2 zdjelice			
Grickalice									1/2 zdjelice			
Sladoled									2 kugle			
Čokolada									50 g			
Čokoladni namaz									3 čajne žličice			
Puding									1/2 zdjelice			
Pekmez									3 čajne žličice			
Med									3 čajne žličice			
Šećer, kao dodatak									1 čajna žličica			
Kikiriki, pistacije									1/2 zdjelice			
Hamburger (koji?)									1 komad			
Hot dog									1 komad			
Čevapi									1 porcija			
Kokice									2 zdjelice			
MASTI												
Maslac									1 pakovanje (25 g)			

NAMIRNICA	KAKO ČESTO								KOLIČINA			
	2+ X NA DAN	1 X NA DAN	4-6 X TJEDNO	2-3 X TJEDNO	1 X TJEDNO	2-3 X MJESEČ.	1 X MJESEČ.	NIJEDNOM	SREDNJA PORCIJA (S)	M	S	V
MASTI												
Margarin (koji?)									1 pakovanje (25 g)			
Majoneza									3 čajne žličice			
Mast, svinjska									25 g			
PIĆA												
Bezalk. pića (cola)									2 dl			
Pivo									0.5 l			
Vino									2 dl			
Oštra alk. pića									1 čašica			
Prirodni sokovi									2 dl			
Čaj									1 šalica			
Kava									2 šalice za kavu			
JUHE												
Krem juhe									3/4 zdjelice ili 3 dl			
Juhe od povrća									3/4 zdjelice ili 3 dl			
Bistre juhe									3/4 zdjelice ili 3 dl			
Juha od rajčice									3/4 zdjelice ili 3 dl			

Molimo navedite način pripreme jela s obzirom na upotrebljenu masnoću:

1. samo svinjska mast
2. samo ulje
 - suncokretovo
 - maslinovo
 - biljno ulje
3. kombinirano (mast i ulje)

9. ŽIVOTOPIS

Kandidat je rođen 24. 8. 1968. u Osijeku u obitelji Marije (Kalmar) i Krešimira Klapca. Osmogodišnju školu je završio u Osijeku, te zbog interesa za kemiju upisao srednju kemijsku školu (Š. C. Ruđer Bošković, Osijek). Oslobođen je završnog ispita zahvaljujući odličnom uspjehu tijekom školovanja. Nakon reguliranja vojne obaveze, nastavio je školovanje na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku, gdje je diplomirao 1994. godine s odličnim uspjehom, uz prosječnu ocjenu 3,85. Po završetku studija, prihvatio je radno mjesto na istom fakultetu, u svojstvu znanstvenog novaka na projektu Ministarstva znanosti i tehnologije broj 4-07-066, čija je voditeljica bila prof. dr. sc. M. L. Mandić. Početkom 1995. godine dva mjeseca je proveo na Tehničkom Univerzitetu u Grazu, Institutu za kemiju hrane i biokemiju, gdje je ostvario dobijenu stipendiju austrijske vlade. Pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. W. Pfannhausera prošao je obuku na mikrovalnom uređaju za pripremu uzoraka za AAS, te sam rad sa AAS. Trenutno sudjeluje u provedbi dva znanstveno istraživačka projekta Ministarstva znanosti i tehnologije (113003 i 113005). Nositelj je i poticajnog projekta za mlade znanstvenike. Dosad je, kao suautor, objavio knjigu, osam znanstvenih radova, te sudjelovao na tri domaća i šest međunarodnih znanstvenih skupova. Dobitnik je državne nagrade za znanost za 1998. godinu u kategoriji znanstvenih novaka, na području biotehničkih znanosti.