

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

重金屬暴露生物指標之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-040-004-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學職業安生衛生學系

計畫主持人：嚴正傑

共同主持人：陳文貴

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 1 日

摘要：

人體非必需微量元素鉛為藍灰色金屬元素，元素鉛或其合金化物“類金屬”存於工業製程中如鉛蓄電池、焊錫、燃料添加物，另日常用品中殺蟲劑(砷酸鉛)、白漆(矽酸鉛)、金屬表面防護漆(四氧化三鉛，俗稱鉛丹)等用途廣泛，經由口、鼻、皮膚進入人體內。長期暴露造成血液方面病變、腸胃、神經系統失調，且產生生殖功能障礙、抑制生化酵素合成，進而引發自由基造成細胞氧化性傷害。

選擇北部與中部三家鉛金屬相關作業工廠員工及行政人員共 154 位，其中男性 115 位，女性 39 位，年齡在 18 歲至 55 歲間，以低金屬污染之採血針，含肝素抗凝劑之真空採血管抽取約 5 毫升之全血樣品。由本實驗室或附設醫院血清室分析其血鉛濃度。剩餘檢體則由本研究室帶回準備測定其過氧化歧化酶活性，脂質過氧化，血紅素及硒元素濃度。不需立即分析之檢體，均於分裝後冰存於-85°C 超低溫冷凍櫃中保存。

血紅素、過氧化歧化酶活性、硒元素濃度、脂質過氧化產物濃度數值分佈關係時發現當血鉛濃度介 50ug/dl~ 60 ug/dL 時，四項指標有著規律之變化‘亦即當過氧化歧化酶每活性升高’血紅素及硒元素濃度亦升高、而脂質過氧化程度則下降，是否代表當血鉛濃度超過 50 ug/dl 時，體內代謝系統不同之反應機制，以因應高濃度鉛所帶來之負面影響，則尚待更多研究數據來驗證之。

前言：

人體非必需微量元素鉛為藍灰色金屬元素，元素鉛或其合金化物“類金屬”存於工業製程中如鉛蓄電池、焊錫、燃料添加物，另日常用品中殺蟲劑(砷酸鉛)、白漆(矽酸鉛)、金屬表面防護漆(四化三鉛氧，俗稱鉛丹)等用途廣泛，經由口、鼻、皮膚進入人體內(1)。長期暴露造成血液方面病變、腸胃、神經系統失調，且產生生殖功能障礙、抑制生化酵素合成，進而引發自由基造成細胞氧化性傷害(2,3)。

近年來勞委會規定暴露鉛作業場之工人需每年定期健康檢查血中鉛，且衛生署規定鉛濃度高於 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (男性)30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (女性)需依循通報系統告知予以監控。表 1 為 1977 年世界衛生組織(WHO)公佈之血中鉛濃度與人體之反應(3)，在文獻上曾提及鉛 δ -氨基- γ -酮戊酸脫水酉每(ALA-D)造成血基質蛋白如血紅素及細胞色素合成引起貧血現象之主因(1,4)。另鉛元素造成氧化性壓力產生氧分子自由基(ROS)攻擊細胞膜產生脂質過氧化產物(TBA-MDA)，但在抗氧化酵素、過氧化歧化酶(SOD)及抗氧化硒元素(Se)之保護之下得以平衡傷害機轉，減少細胞受損程度(5,6,7,8,9)本研究有鑑於生物偵測技術在探討毒性物質暴露時，是一個相當重要參考指標。因而以生物檢體——人體血液來探討下列問題：一·鉛金屬對體內硒元素濃度變化之？二·鉛金屬對人體血球細胞氧化性之指標——血紅素(HGB)及脂質過氧化(LPO)傷害程度。三·鉛金屬在體內所產生自由基或氧化性緊迫(oxidative stress)對過氧化歧化酶(SOD)活性變化之相關性為何？

材料與方法：

(1)血液樣品採集

選擇北部與中部三家鉛金屬相關作業工廠員工及行政人員共 154 位，其中男性 115 位，女性 39 位，年齡在 18 歲至 55 歲間，以低金屬污染之採血針，含肝素抗凝劑之真空採血管抽取約 5 毫升之全血樣品。為避免採血過程之污染，所有員工均應在抽血前洗淨雙手及手肘部位。全血收集後，儘速帶回醫院分裝檢體後，一部份樣品由本實驗室或附設醫院血清室分析其血鉛濃度。剩餘檢體則由本研究室帶回準備測定其過氧化歧化酶活性，脂質過氧化，血紅素及硒元素濃度。不需立即分析之檢體，均於分裝後冰存於-85 $^{\circ}\text{C}$ 超低溫冷凍櫃中保存。

(2)藥品試劑

金屬元素分析所需超純級硝酸，GC 級界面活性劑 Triton X-100 及金屬元素標準液等，為德國 E. Merck 公司生產之試藥，清洗器材用之硝酸溶液則是由 RDH 公司製造之 GR 級試劑，全血標準品採用 SeronormTM，Bio-Rad[®] 生產之參考物質，以驗證實驗流程。

此外，過氧化歧化酶活性之測定，則是購買 RANDOX 公司出產之 RANSOD (RANDOX Laboratories, Ltd, U. K.) 試劑組來操作。脂質過氧化程度定量所需之試劑包括磷鎢酸，硫酸 TBA(Thiob-abituric acid)，MDA(Malondialdehyde) 等，皆採用日本林純藥或 E. Merck 等公司之製品。實驗用水均使用二次去離子或再經二次蒸餾裝置純化後之二次蒸餾純水。

(3) 器材清洗

本研究使用於血樣分裝金屬元素偵測之實驗器皿包括玻璃定量瓶，Pipette Tips，1.5cc 尖底離心管，原子吸收光譜儀用之樣品杯皆需 1:1 稀釋硝酸溶液浸泡至少一天，取出後以二次蒸餾水浸泡後用超音波振盪清洗，或經由 15% 硝酸溶液熱蒸汽迴流沖洗，直接以二次蒸餾水清洗無塵操作檯內晾乾備用，其它實驗器皿，則依一般清洗流程，浸泡鹼性清潔劑後，以超音波振盪清洗，並用二次水沖洗後，烘乾備用。

測定方法

(1) 金屬元素分析：

金屬元素之分析工作，在鉛金屬部份由本研究室暨本校附設醫院檢驗科血清室共同完成，硒元素則由本研究室測定。作業勞工全血檢體送至本研究室後，輕輕搖晃混合，吸取 100 微升之全血置入預先洗淨之 1.5 毫升之尖底離心管中(pp 材質)，並加入 900 微升之稀釋液(0.5% Triton X-100 溶於 0.2% 超純級硝酸水溶液)，充份混合。使樣品溶液中之大型分子如胞膜碎片、脂肪酸、醣類、蛋白質及核酸等能經由界面活性劑 Triton X-100 乳化後成均勻分佈之溶液，另一方面亦可經藉由硝酸的金屬溶離作用，避免金屬沉積於管壁或吸附於大分子上。稀釋後之全血樣品，以自動取樣器之毛吸管定量取 20 微升並添加基質修飾劑包括 200ug 磷酸二氫氮及 20ug 硝酸鎂溶液後，以原子吸收光譜儀(PERKIN-ELMER mode 5100pc)含石墨爐式原子化裝置，Zeeman 背景校正系統偵測鉛金屬含量。而硒元素則是取樣 20 微升後，加入基質修飾劑含 5ug 鈹金屬及 15ug 硝酸鎂溶液後以原子吸收光譜儀測定(10.11.12.13)。鉛、硒元素測定前樣品取樣前均由超音波取樣器(PERKIN-ELMER USS-100)充份混合。

同時，為了確保實驗室分析數據之品質，採用已知濃度之參考物質如 Seronorm™, Bio-Rad® 全血標準品驗證實驗流程。

(2) 脂質過氧化測定

將作業勞工全血輕晃混合(操作過程試管均置於碎冰中處理,以免在室溫下氧化傷害增加),取全血樣品 75 微升,置入 15 毫升塑膠離心管中,並加入 4 毫升 1/12 N 硫酸溶液及 0.5 毫升 10% 磷鎢酸溶液,振盪混合 5 分鐘後,置入離心機中,以每分鐘 3000 轉速度離心 10 分鐘。離心後,迅速將上清液倒掉,再加入 2 毫升 1/12N 硫酸溶液及 0.3 毫升 10% 磷鎢酸溶液振盪 10 分鐘。再一次離心後,倒掉上清液。試管底部之沉澱物加入呈色劑 TBA(Thiobarbituric acid)醋酸水溶液 1 毫升及 4 毫升二次水,混合均勻後於 95°C 水浴恆溫振盪 60 分鐘使呈色劑與脂質過氧化之裂解產 MDA(malondialdehyde)形成螢光複合物,待冷卻至室溫,加入 3 毫升正丁醇,去萃取螢光複合物。將此正丁醇溶液以螢光光度計在激發波長 515nm 發散螢光波長 555 nm,偵測螢光強度。

(3) 血色素測定

作業勞工全血樣品輕晃充份混合,取 0.5 毫升全血樣品置入 1.5 毫升離心試管(測定之前以低溫狀態下處理),用血球自動分析儀(Sysmes K-1000 三東儀器公司)測定定量,以取樣器自動取樣 50 微升,利用醋酸溶破紅血球後,透過光譜分析求得血色素之濃度(13-15)。

(4) 過氧化歧化酶含量測定

取某一電化工廠勞工靜脈全血樣品,總數共 60 名,將血樣輕晃混合(操作過程試管均置於碎冰中處理,以免在室溫下氧化傷害增加),取樣全血 0.5 毫升置入 1.5 毫升離心試管(pp 質),置入冷凍離心機(Freezed centrifugen, Hettich. UNIVERSAL, 16R)設定 4°C 3000 轉,離心 10 分鐘後,去除上層血清,隨即時使用 3 毫升 0.9% NaCl 沖洗(去除紅血球表面沾黏的雜質抗體等)4 次,每次均用 3000 轉,10 分鐘 4°C 離心去除上清液後,加二次水至 2.0 毫升,充份混合後置入 4°C 冷藏室 15 分鐘。將紅血球胞膜充份破壞後,取混合液 50 微升,以 RANSOD 試劑組經由紫外光/可見光 分光光譜(Hitachi, U3000),測定其過氧化歧化酶每(SOD)之活性,並將前述之血色素測定結果,作為濃度校正之依據(6, 16)。

(5) 數據統計與分析

所有之實驗數據皆輸入電腦,用 Sigma Plot 及 Sigma State 視窗版軟體作圖形繪製及數據統計分析之工作。

結果

將血紅素濃度依照不同之血鉛含量予以分組後，顯示在血鉛濃度大於 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時，血紅素的濃度即呈現上下跳動變化之趨勢(圖 1)。而圖 2 則是紅血球中過氧化歧化酶活性與血鉛濃度關係圖，由圖中可以明顯觀察到血鉛濃度在 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間有不穩定高低變動之酵素活性，而血鉛濃度大於 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上時，幾乎所有的酵素活性皆有偏低之分佈。可以更清楚地發現過氧化歧化酶之活性在血鉛濃度 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間跳升，而且也有顯著差異($P < 0.05$)。此外，當血鉛濃度在 60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 70 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間，酵素活性則有下降之趨勢。圖 3 則是工人血液中脂質過氧化程度與不同血鉛濃度之變化關係圖，當血鉛濃度高於 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時，脂質過氧化程度則略有上升之趨勢，但無統計上之意義。作者分析血樣中硒元素濃度時發現當血鉛濃度逐漸上升時，硒元素濃度亦呈現不規則之變化(圖 4)，當血鉛濃度在 30-40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間，硒元素含量降至最低，隨後有回升，在鉛濃度 50-60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間達到最高濃度，兩組之間同時有顯著差異($p < 0.05$)。

討論：

對工作或生活環境中的毒性物質加以監控，使之能維持在安全濃度以下，乃是維護健康之基本條件。但是，由於這些安全容許濃度皆是對大多數人不造成危害之考慮而設定，並未包括由於個體代謝能力之差異，整體暴露概況，生活習慣等不同所引發之雖然曝露於相同劑量卻可能導致之不同程度反應之狀況。因此，如何能更精確地評估個體對某些特定毒性物質的真實暴露量，或者藉此建立危害指標，防止傷害進一步地擴大，即為目前相當重要之課題。近年來，生物偵測(Biological monitoring)或生物效應偵測(Biological effect monitoring)技術，即在前述考量下，再輔以精密儀器不斷地開發，靈敏度不斷地提高下，而得以蓬勃發展。

本研究針對環境鉛金屬暴露所可能引起之貧血及其引起的重金屬-觸化 Haber-weiss reation 及過氧化趨動 Fenton reation: 金屬³⁺ + $\text{o}_2^- \rightarrow$ 金屬²⁺ + o_2 , 金屬²⁺ + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ 金屬³⁺ + $\text{OH}^- + \text{OH}^-$ 產生自由基引發體內過氧化程度增加等生物效應，選擇包括血紅素，硒元素，過氧化歧化酶及鉛金屬濃度等相關效應指標來評估不同程度之鉛濃度暴露下，所引之變化效應(1-9)。

本研究室亦定量工人血中血紅素(圖 1)，過氧化歧化酶(圖 2)，脂質過氧化(圖 3)及硒元素(圖 4)濃度，並比較各組與血鉛濃度之關係。前人研究發現，鉛金屬已確認在血中紅血球方面會抑

制體內血基質(Heme)的生合成,血球容積量,紅血球總量,增加血球被氧化量(提高 葡萄糖-6-磷酸去氫酶及麩氨酸過氧化酶活性)造成容易貧血之現象(1,7,14)。但由圖 2 發現,當血鉛高於 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時,血紅素的濃度有高低間隔出現之傾向。這種現象可能與鉛金屬抑制血基質生合成,同時亦造成體內氧化程度增加,因而引發代償性反應有關,包括抗氧化機制、血基質合成機制等酵素系統之高度活化(7),致使血紅素濃度在體內代償機制回復修補能力高於鉛之破壞力時,即有顯著增加,隨後在血紅蛋白增加之回饋抑制下,體內代償機制活性局部或全部下降,而鉛金屬卻在體內逐漸累積,毒性亦逐漸增加,因而導致血紅素合成又受抑制,濃度下降。這些推論,尚待更多的實驗數據予以釐清。

至於和體內氧化反應程度有關之過氧化歧化酶,脂質過氧化程度及硒元素等指標在血鉛濃度 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上時,即開始有所變化(圖 1-4)。顯示即使工人暴露在少量鉛濃度環境中,其血鉛濃度僅僅略高於一般人之正常範圍 9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ -15 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (9,13),但工人體內之氧化緊迫(Oxidative stress)卻已有增加的現象。尤其是過氧化歧化酶的明顯跳升(圖 3,血鉛 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ -30 $\mu\text{g}/\text{dL}$)(2.4.6.16-18),是否表示過氧化歧化酶對血鉛濃度變化的敏感範圍在鉛 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ -30 $\mu\text{g}/\text{dL}$,尚待進一步實驗驗證。但已知暴露鉛金屬環境會有明顯影響些酵素,如葡萄糖-6-磷酸去氫酶(G-6-PD)及麩氨酸過氧化酶(GSH),過氧化歧化酶(SOD),觸酶(Catalase)等(16-24)和作者實驗數據所顯示之符合,血鉛濃度高於 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$,即有使過氧化歧化酶活性低於正常範圍 1800 Unit/g Haemoglobin (14-17)的表現。因此,過氧化歧化酶的活性應可成為評估鉛金屬之生物效應指標之一。

曾有報告指出(2.4.9.14)脂質過氧化程度在高濃度血鉛工人有明顯正相關之趨勢,在本篇文章之圖 4 顯示,當血鉛高於 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時,脂質過氧化程度即略有上升之變化但無顯著差異,表示隨著血鉛濃度增加,工人體內之氧化緊迫程度亦隨之升高。硒元素在工人血液樣品中,隨著血鉛濃度變化而有高低起伏之趨勢,尤其在血鉛濃度開始增加時,硒元素濃度下降,在血鉛濃度大於 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時,則開始增加,進一步探討鉛與硒之間關係,有論文(19)指出在動物飲食中同時添加低濃度的硒元素 (0.15-0.50 ppm),可明顯降低鉛毒性所引發之尿中 δ -ALA 之排泄量(20),或緩和因飲食中加入鉛 (20 mg/kg diet)所抑制之腦內琥珀酸去氫酉每'乙醯膽鹼酉每及 Na^+/K^+ ATPase 之活性(19)。但若添加硒濃度較高(1ppm)或遲緩 15 天供給,則會使鉛毒性效應更為加強(19-20)。此外供給高濃度硒元素會對動物產生毒害效應,若同時給予低濃度之鉛元素,則反而會有頡抗的保護作用(20-21)。而同時給予較高濃度的鉛與硒元素,在雞肝臟內有明顯增

加紫質含量,顯示毒性更趨嚴重(22)。至於人體血中鉛與硒元素濃度間相互關係,有報告(23)記錄在正常的血中硒元素含量(Se $163.6 \mu\text{g/L} \pm 71.5 \mu\text{g/L}$)的族群中,鉛(Pb $< 82.6 \mu\text{g/L} \pm 12.4 \mu\text{g/L}$)與硒有負相關之關係($r = -0.32$ $P < 0.05$)。以上結果顯示硒在人體內之吸收、排泄及代謝與鉛金屬有著相當密切之關係,值得作更進一步來研究在高濃度的鉛暴露工人族群中, 硒元素所扮演的角色。然而作者更進一步發現血紅素、過氧化歧化酶活性、硒元素濃度、脂質過氧化產物濃度數值分佈關係時發現當血鉛濃度介 $50 \mu\text{g/dl} \sim 60 \mu\text{g/dL}$ 時,四項指標有著規律之變化‘亦即當過氧化歧化酉每活性升高‘血紅素及硒元素濃度亦升高、而脂質過氧化程度則下降,是否代表當血鉛濃度超過 $50 \mu\text{g/dl}$ 時,體內代謝系統不同之反應機制,以因應高濃度鉛所帶來之負面影響,則尚待更多研究數據來驗證之。

圖 1

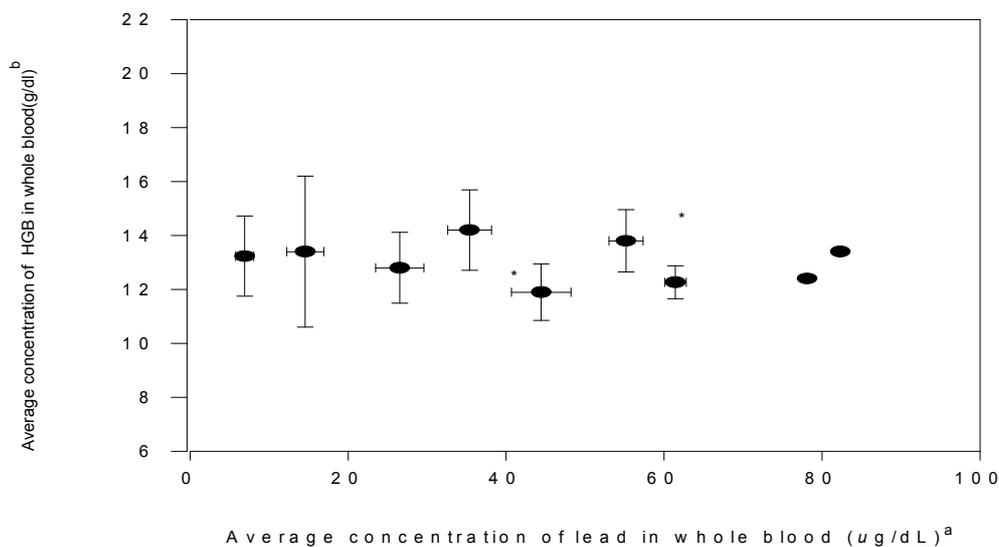


圖 1. 血鉛區間平均濃度與血紅素平均濃度之相對關係圖

- (a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內 (10 ug/dL) 血鉛數值平均濃度。
- (b) 血紅素平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中血紅素濃度平均值。
- (c) * 表 t-test $P < 0.05$ 有顯著差異。

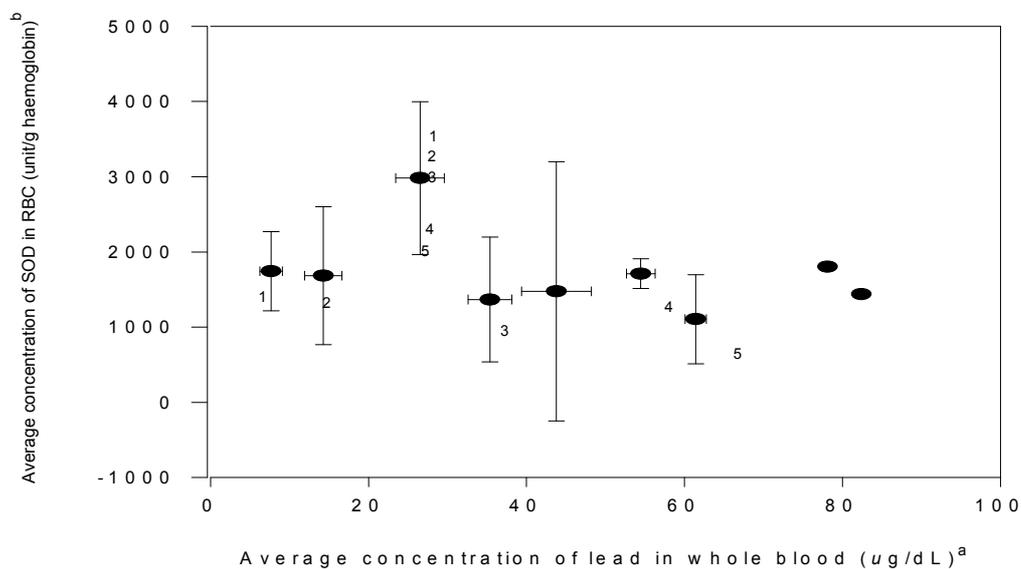


圖 2. 血鉛區間平均濃度與過氧化歧化酶平均濃度之相對關係圖

- (a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內 (10 ug/dL) 血鉛數值平均濃度。
- (b) 過氧化歧化酶平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中過氧化歧化酶濃度之平均值。
- (c) 1.2.3.4.5 表 T-test $P < 0.05$ 有顯著差異。

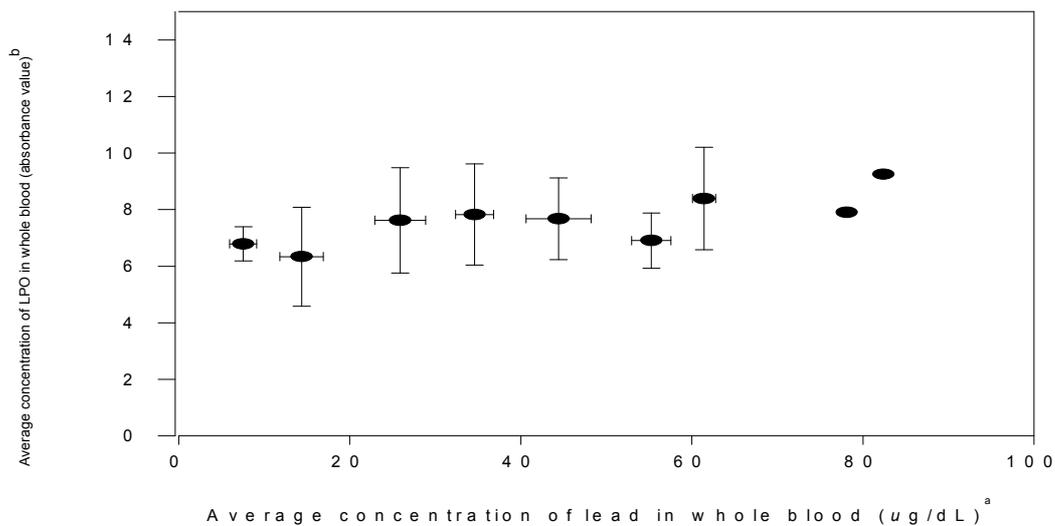


圖 3 血鉛區間平均濃度與脂質過氧化產物值(LPO) 平均濃度之相對關係圖。

(a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛數值

平均濃度。(b) 脂質過氧化產物值平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中過氧化產物濃度平均值。

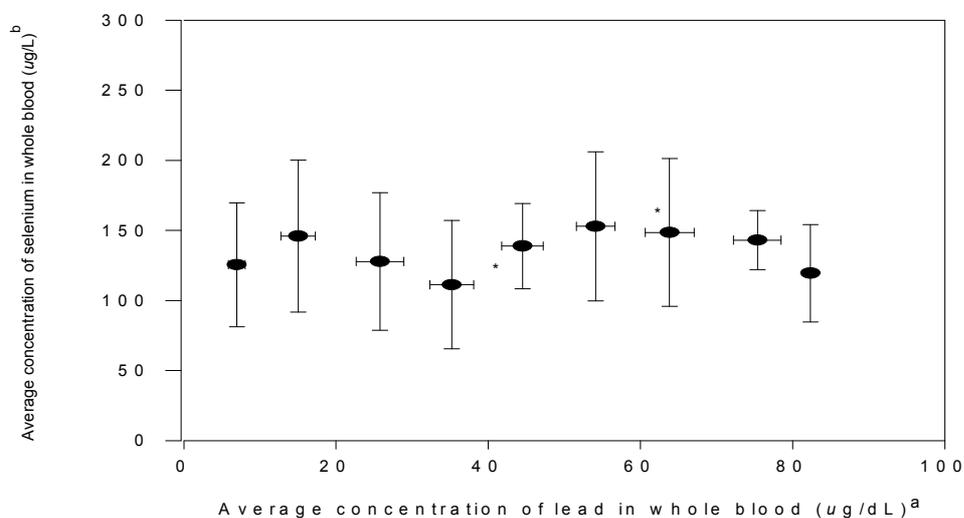


圖 4. 血鉛區間平均濃度與硒元素濃度平均濃度之相對關係圖。

(a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛數值

平均濃度。(b) 硒元素濃度 = 相同區間之血鉛樣品中硒元素濃度平均值。(c) * 表 t-test $P < 0.05$ 有顯著差異。

References:

1. 劉宗榮等：基礎毒理學(第一版) 臺北市藝軒出版社
中華民國 85 年 338-357.
2. S. J. STOHS and D. BAGCHI:Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Med* 1995; Vol 18 1102p 321-336.
3. RA Goyer:Toxic Effect of Metal. In:Doull J, Kloassen CD, Amdur Mo eds. *Casarett and Doull Toxicology*, 3rd, ed . New York ;Macmillian 1986:598-605.
4. Wasserman G, Grazian JH et al:Independent effects of lead exposure and iron deficiency anemia on development outcome at age 2 years; *Journal of Pediatrics*, 1992, Nov, 695-703.
5. Skoczynska A, Smolik R:Lipid abnormalities in rats given small dose of lead. *Archives of Toxicology* 1993, 67(3):200-4.
6. Carine Michiels, Maroine Raes :Importance of Se-Glutathione peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival Against Oxidative Stress *Free Radical Biology & Medicine* Vol 17, No3 pp249-258;1994.
7. Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge:Role of free radicals and catalytic metal ions in Human disease:An overview. *Methods in Enzymology* 1996, Vol186, 1-85.
8. Sunderman F.W. *Ir Acta Pharmacol Toxicol* 1986:59(Suppl 7):248-255.
9. Lin, S. J. Lin T. H. *Acta Environ Health* 1994;49(4):256-259.
10. V. Lagesson, and L. Andrasko:Direct determination of Pb and Cd in whole blood and urine by flameless AAS, *Clin. Chem.* A1975;25:1948.
11. P. A. Pleban, and K. H. Pearson Determination of Pb in Whole Blood and Urine *Zeeman Effect Flameless AAD lett*, 1979:935.

12. M. Stoepler, Automated Blood Lead Determinations by Electrothermal AAS. Clin Chem. Clin Biochem, 1978;16:58.
13. 李瑤玲 劉嘉斌：鉛蓄電池工場作業員血中鉛濃度與血液常規檢查之關係。公共衛生季刊，1993, In Press.
14. Christie A, Knudsen, AL.L. Tappel: Multiple Antioxidants protect against Heme protein and lipid oxidation in kidney tissue. Free Radical Biology & Medicine, 1996, vol20, No2, pp165-173.
15. Nehru B, Iyer A.:Effect of selenium on lead-induced neurotoxicity in different brain regions of adult rats. Journal of Environmental pathology. Toxicology & Oncology. 1994;13(4):265-8.
16. Brooke T. Mossman, Piyawan Surinrut, et al: Transfection of a manganese-containing superoxide dismutase gene into hamster tracheal epithelial cells ameliorates asbestos-mediated cytotoxicity : Free radical biology & medicine :1996 vol 21 NO 2. pp 125-131 .
17. Nirmal k. Roy, Toby G. Rossman :Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds: Mutation research 1992 , 298:97-103 .
18. Denis Vezina, Francois Muffette, et al :Selenium-vitamin E supplementation in infertile men, effects on semen parameters and micro nutrient levels and distribution : Biological trace element reserch. 1996 vol 53. 65-83 .
19. Solliway BM, Schaffer A : Effects of exposure to lead on selected biochemical and hematological variables: Pharmacology & Toxicology 1996 Jan 78(1):18-22.

20. Greene Ls. Asthma and oxidant stress ;nutritional , environmental , and genetic risk factors, [review] Journal of the American college of nutrition :1995 Aug :14(4);317-324
21. Khan Mz , Szarek J, Kransnodebska-Depta A etal :Effect of concurrent administration of lead and selenium on some hematological and biochemical parameters of broiler chickens . Acta veterinaria Hungarica 1993. 41(1-2):123-137 °
22. Scandhir R, Gillk D: Effect of lead on lipid peroxidation in liver rats : Biological trace element research 1995 Apr 48(1):91-97.
23. Gerald, F. Combs, Jr. et al : The role of selenium in nutrition ,chap 6 (biochemical function of selenium): New York ,Academic press. 1986. 205-247 °