

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Bestimmung von Selen aus Trockenblut und zum  
Zusammenhang von Selenstatus und Wachstumsregulation bei  
Kindern

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Blasig

aus Ludwigsfelde

Datum der Promotion: 05.06.2016



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
2.1	Selen .....	9
2.1.1	Physiologische Funktion und Erkrankungen .....	9
2.1.2	Selenversorgung und Toxizität.....	11
2.1.3	Selen und Neugeborene .....	13
2.1.4	Selen und Schilddrüse .....	14
2.1.5	Selen und Wachstum.....	16
2.2	Kupfer.....	18
2.2.1	Physiologische Funktion und Erkrankungen .....	18
2.2.2	Kupferversorgung und Toxizität .....	19
2.2.3	Kupfer und Schilddrüse.....	20
2.2.4	Kupfer und Wachstum .....	20
2.3	Dried Blood Spots (DBS).....	21
2.3.1	Neugeborenen-Screening.....	21
2.3.2	Weitere Anwendungsmöglichkeiten von DBS .....	22
2.4	Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)-Analytik .....	22
2.5	Zielsetzung der Arbeit.....	23
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1	Geräte und Chemikalien.....	25
3.2	Untersuchung von Kindern mit konnataler Hypothyreose und mit Kleinwuchs .....	25
3.2.1	Probanden und Material.....	25
3.2.2	Methode und Probenvorbereitung.....	26
3.3	DBS-Untersuchung.....	27
3.3.1	Probanden und Material.....	27
3.3.2	Methode und Probenvorbereitung.....	28
3.4	Datenauswertung und Statistik .....	29
<b>4</b>	<b>Entwicklung der Methode zur Selenbestimmung aus DBS</b> .....	<b>30</b>
4.1	Vorüberlegung .....	30
4.1.1	Wahl der verwendeten Lösemittel.....	30
4.1.2	Verwendetes Probematerial und Volumen der Lösungsmittel .....	31
4.2	Ergebnisse .....	32
4.2.1	Lösungsmittel zur Probenaufbereitung .....	32

4.2.2	Optimierungsversuche der HCI-basierten Methode .....	36
4.3	Validierung der HCI-basierten Methode.....	38
4.4	Zusammenfassung der Arbeitsschritte der HCI-basierten Methode.....	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung von Kinder und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose und Kleinwuchs .....</b>	<b>42</b>
5.1	Untersuchung der Gruppe mit konnataler Hypothyreose .....	43
5.1.1	Auffälligkeiten der Spurenelemente und Schilddrüsenhormone.....	45
5.1.2	Unterschiede zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Altersgruppen.....	48
5.1.3	Zusammenhänge von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen.....	49
5.1.4	Zusammenhänge von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen in den verschiedenen Altersgruppen.....	51
5.2	Untersuchung der Gruppe mit Kleinwuchs .....	52
5.2.1	Auffälligkeiten der Spurenelemente und des IGF-1-Spiegels.....	53
5.2.2	Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern .....	55
5.2.3	Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen .....	57
5.2.4	Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen in den verschiedenen Altersgruppen .....	59
5.2.5	Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen getrennt nach Geschlechtern.....	60
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
6.1	Untersuchung der Kinder mit konnataler Hypothyreose und Kleinwuchs .....	61
6.1.1	Se, Cu, Cu/Se-Quotient und die Schilddrüsenhormonachse .....	61
6.1.2	Se, Cu, Cu/Se-Quotient und die Wachstumshormonachse.....	66
6.1.3	Limitation der Untersuchungen .....	68
6.1.4	Spurenelementversorgung der pädiatrischen Patienten .....	68
6.1.5	Selensupplementation.....	70
6.2	Selenbestimmung aus DBS .....	71
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>85</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>86</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

cGPx	zytosolische Glutathion Peroxidase(n)
Cu	Kupfer
DBS	Dried Blood Spots/ getrockneter Blutstropfen
DIO	Iod-Thyronin-Deiodase(n)
Fe	Eisen
fT4	freies Tetraiodthyronin, Thyroxin
GH	growth hormone/ Wachstumshormon, Somatotropin
GPx	Glutathion Peroxidase(n)
HCl	Salzsäure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IGFBP-3	IGF-bindendes Protein 3
IGF-1	insulin-like growth factor 1, Somatomedin C
ICC	Indian Childhood Cirrhosis
n	Stichprobenanzahl
NICC	Non-Indian Childhood Cirrhosis
pGPx	Plasma Glutathion Peroxidase(n)
PHGPx	Phospholipid Hydroperoxid Glutathion Peroxidase(n)
rpm	revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
rT3	reverses Triiodthyronin
Se	Selen
SePP	Selenoprotein P
TPO	Thyreoperoxidase
TSH	Thyroideastimulierendes Hormon, Thyrotropin
TXRF	Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz
TXNRD	Thioredoxin Reduktase(n)
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin, Thyroxin
Zn	Zink

## 1 Abstrakt

*Einleitung:* Die essentiellen Spurenelemente Selen (Se) und Kupfer (Cu) haben Einfluss auf die Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse und damit auf Reifungs- und Wachstumsprozesse des menschlichen Körpers. Doch über die Frage, ob tatsächlich ein direkter Zusammenhang von Selen- bzw. Kupferstatus und dem Spiegel von Schilddrüsenhormonen und Wachstumsfaktoren besteht, herrscht Uneinigkeit. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Serumkonzentrationen von Se und Cu mit der Schilddrüsenhormon- und Wachstumsachse korrelieren.

Darüber hinaus scheint Selen eine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen der Neugeborenenperiode wie der neonatalen Sepsis und der bronchopulmonalen Dysplasie zu spielen. Bislang wurde bei der Bestimmung des Selenstatus bei Neugeborenen häufig auf Nabelschnurblut zurückgegriffen, welches möglicherweise nicht exakt den kindlichen Status widerspiegelt. Venöse Blutentnahmen werden bei Kindern aufgrund der Schmerzhaftigkeit der Prozedur möglichst vermieden. Dagegen bietet das Aufbringen von Blut auf Filterpapierkarten die Möglichkeit der wenig invasiven Probengewinnung. Daher wurde eine neue Methode zur Bestimmung des Selenspiegels bei Neugeborenen aus Trockenblut (Dried Blood Spots, DBS) entwickelt, welche unter anderem für das Neugeborenen-Screening auf Anwendung getestet werden soll.

*Methodik:* Untersuchung der Selen- und Kupferspiegel im Serum von zwei pädiatrischen Patientenkohorten (84 Kinder mit konnataler Hypothyreose und 66 kleinwüchsige Kinder im Alter von 3 bis 17 Jahren) mittels Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF). Die Zusammenhänge von Spurenelementen und den Schilddrüsenhormonen TSH, T4, fT4, T3 sowie dem Wachstumsfaktor IGF-1 wurden mittels Pearson-Korrelation ermittelt.

Zur Entwicklung der Methode Selenbestimmung aus DBS wurden korrespondierende Serumproben mit DBS-Proben von insgesamt 10 erwachsenen freiwilligen Probanden verglichen und verschiedene Parameter der DBS-Aufbereitung für die Spurenelementanalyse optimiert.

*Ergebnisse:* Bei Kindern und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose bestand eine hochsignifikante positive Verbindung von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten mit der Schilddrüsenhormonachse in Form von T3 und T4 ( $p \leq 0,01$ ). Bei Kindern mit Kleinwuchs zeigte sich dieser Zusammenhang nicht. Allerdings war hier eine

hochsignifikante inverse Verbindung von Se mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 zu verzeichnen ( $p \leq 0,01$ ). Es konnte eine geeignete Methode entwickelt werden, um eine Selenmessung mittels TXRF-Analyse aus DBS vorzunehmen, die äquivalent zur Serummessung ist. Die Selenmessungen aus DBS wichen um weniger als 10% von den Serumproben ab, wenn die Probenextraktion aus den DBS mittels einer neu entwickelten HCl- basierten Methode erfolgte.

*Schlussfolgerungen:* Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Spurenelementen mit der Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse bei. Außerdem wurde die Möglichkeit geschaffen eine wenig invasive Bestimmung des Selenstatus aus kleinen, gut lagerbaren Trockenblutproben vorzunehmen. Weitere Untersuchungen in größeren Gruppen und mit anderen klinischen Fragestellungen sind notwendig, um das volle Potential dieser Methode auszuschöpfen.

### **Abstract**

*Introduction:* The essential trace elements selenium and copper affect the thyroid and growth hormone axis with effects on maturation and growth processes of the human body. However it is controversially discussed whether there is a direct link between the selenium or copper status and the levels of thyroid hormones and growth factors. Therefore, this work investigated whether the serum concentrations correlate.

In addition, selenium may have an effect on various diseases of the newborn period such as sepsis and bronchopulmonary dysplasia. So far umbilical cord blood was often used to determine the selenium status in newborns. This may not accurately reflect the child's status. Because of the painful procedure venous blood collection should be avoided in children where possible. In contrast application of blood on filter paper cards is less invasive. Therefore, a new method for determination of selenium levels in newborns from dried blood spots (DBS) was developed. This method was tested to be utilized within the newborn screening.

*Methods:* Study of selenium- and copper levels in serum of two pediatric patient cohorts (84 children with congenital hypothyroidism and 66 children with dwarfism from 3 to 17 years) using total reflection X-ray fluorescence spectroscopy (TXRF).

Interactions between trace elements and the thyroid hormones TSH, T4, fT4, T3 and the growth factor IGF-1 were determined by Pearson correlation.

To develop the method of selenium measurement from DBS, corresponding serum samples were compared with DBS samples from 10 adult volunteers. Various parameters of DBS treatment for trace element analysis were optimized.

*Results:* Children and adolescents with congenital hypothyroidism showed a highly significant positive correlation between copper or copper/selenium ratio with the thyroid hormone axis (T3 and T4,  $p \leq 0.01$ ). In children with dwarfism a highly significant inverse correlation between selenium and IGF-1 was demonstrated ( $p \leq 0.01$ ).

An accurate method was established to measure selenium using TXRF analysis of DBS, which is equivalent to serum measurements. Measurement of selenium from DBS deviated by less than 10% from serum using the newly developed HCl-based extraction method.

*Conclusion:* The results of this study contribute to a better understanding of the interaction of trace elements with the thyroid and growth hormone axis. In addition, a less invasive method of measuring selenium levels was developed based on small and well storable DBS samples.

Further investigations in larger groups and with other clinical issues are necessary in order to elucidate the full potential of the novel method.



## **2 Einleitung**

In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen den essentiellen Spurenelementen Selen und Kupfer und der Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse bei Kindern und Adoleszenten betrachtet. Zu diesem Zweck erfolgte eine Blutuntersuchung bei Kindern mit angeborener Hypothyreose sowie bei Kindern, bei denen ein Kleinwuchs besteht.

Darüber hinaus wurde eine neue Methode zur Bestimmung des Selenspiegels bei Neugeborenen aus Trockenblut etabliert. Diese Methode kann unter anderem beim Neugeborenen-Screening zum Einsatz kommen.

Es handelt sich um eine experimentell-wissenschaftliche Dissertation, die im Zeitraum von April 2011 bis Oktober 2015 am Institut für Experimentelle Endokrinologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow Klinikum erstellt wurde.

### **2.1 Selen**

#### **2.1.1 Physiologische Funktion und Erkrankungen**

Die Entdeckung von Se erfolgte im Jahre 1817 durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius. Aufgrund seines silbrigen Glanzes benannte er es nach der griechischen Mondgöttin „Selene“ (1). Lange Zeit ist das Element, welches zu der Gruppe der Chalkogene gehört, in seiner medizinischen Bedeutung unterschätzt worden. Erst im Jahre 1957 entdeckte das Forscherteam um Schwarz und Foltz die essentielle Bedeutung dieses Elements für den menschlichen Körper (1). Se kommt im Körper in Form zahlreicher niedermolekularer Substanzen und den Aminosäuren Selenomethionin und Selenocystein vor. Bisher sind ca. 35-50 Selenocystein-haltige Selenoproteine bekannt, die von 25 unterschiedlichen Genen im Menschen codiert werden (2). Für drei Selenoproteinfamilien - die Glutathion Peroxidasen (GPx), Iod-Thyronin Deiodasen (DIO) und Thioredoxin Reduktasen (TXNRD) - ist die Funktion im menschlichen Körper recht gut erforscht. Die GPx verfügen über eine antioxidative Wirkung, mit der sie die Zellen vor freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies schützen. Dies geschieht indem sie Peroxide mit Hilfe von Glutathion reduzieren. Die DIO spielen eine große Rolle im Schilddrüsenhormonmetabolismus. So katalysiert die 5'-Iod-Thyronin Deiodase Typ 2 (DIO2) die Umwandlung des Schilddrüsenhormons

Thyroxins (T4) in die biologisch aktive Form Triiodthyronin (T3). Die Deiodase Typ 3 (DIO3) katalysiert die Inaktivierung von T4 und T3, während die Deiodase Typ 1 (DIO1) beide Reaktionen, also eine Aktivierung oder eine Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen, katalysieren kann (3). Die TXNRD sind wie die GPX essentiell für das Redoxsystem der Zellen. Dadurch haben sie Einfluss auf zahlreiche zelluläre Signal- und Stoffwechselwege, unter anderem die DNA-Synthese (4).

Das essentielle Spurenelement Se besitzt nicht nur zahlreiche metabolische Funktionen im Körper von Säugetieren, ihm wird auch große Bedeutung in der Prävention von Krebserkrankungen zugeschrieben (5). Ferner geht man davon aus, dass Se eine kardioprotektive Wirkung und einen positiven Effekt bei einer diabetischen Stoffwechsellage hat (5).

Es wird angenommen, dass Se auch eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Sepsis spielt. Eine Metaanalyse von Heyland aus dem Jahr 2007 zeigt eine signifikante Letalitätsreduktion bei Behandlung mit Se (6). Auf der genannten Analyse beruht eine Empfehlung der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Laut der aktuellen Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis von 2011 kann hochdosiertes Se als adjuvante Therapie bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock bei Erwachsenen erwogen werden (Evidenzgrad Ia) (7). Der genaue Wirkungsmechanismus von Se bei der Therapie von Sepsis ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Diskutiert wird in diesem Kontext, dass Se die Aktivität verschiedener Selenoenzyme wie GPx und TXNRD erhöht. Dadurch ist eine Aufrechterhaltung des Redoxsystems möglich, welches für die Funktion immunkompetenter Zellen von entscheidender Bedeutung ist (8).

Jedoch existiert auch eine neuere Studie, die eine Mortalitätsreduktion durch Se wieder in Frage stellt, sodass noch weitere große randomisierte multizentrische Studien durchgeführt werden müssen, um eine endgültige Klärung zu erreichen (7). Entsprechend hat das Kompetenznetz Sepsis (9) eine solche multizentrische plazebokontrollierte Studie gestartet (SISPCT, ClinicalTrials.gov NCT00832039).

Ein Selenmangel tritt besonders bei parenteral ernährten Patienten, Dialysepatienten, aber auch bei Vegetariern auf (10). Dieser Mangel bleibt aber häufig subklinisch, da die Selenverteilung im Körper hierarchisch erfolgt und lebenswichtige Organe somit bevorzugt Se erhalten (11). Demgegenüber gibt es nur wenige selenspezifische

Mangelerkrankungen. Diese kommen nur in Regionen mit extrem selenunterversorgter Bevölkerung, wie etwa in ländlichen Bergregionen Asiens oder Zentralafrikas vor. Wobei häufig nicht der Selenmangel allein zu einem Auftreten der Krankheit führt, sondern auch bestimmte Cofaktoren für einen Ausbruch von endemischen Erkrankungen mitverantwortlich zu sein scheinen (3). So tritt in China und Ostsibirien die endemische Keshan-Krankheit auf. Hierbei handelt es sich um eine juvenile Kardiomyopathie, die vor allem Kinder zwischen 2 und 10 Jahren betrifft (12). Eine zusätzliche Coxsackie-Infektion scheint als Cofaktor zu wirken (13). Ebenfalls in China und auch im Gebiet der ehemaligen Sowjetunion tritt eine Selenmangelerkrankung namens Kashin-Beck-Krankheit auf; eine Form von Osteoarthritis, bei der ein oxidativer Knorpelschaden zu einer Knochenfehlstellung führt. Wiederum sind insbesondere Kinder betroffen, hier vor allem im Alter von 3 bis 13 Jahren (12). Auch hier werden Cofaktoren wie beispielsweise Mykotoxine diskutiert (3). In Regionen mit schwerem Iodmangel werden zwei Arten von endemischem Kretinismus gefunden. Der endemische myxödematöse Kretinismus, welcher gekennzeichnet ist durch Hypothyreose, Wachstumsretardierung und eine gestörte geistige Entwicklung, sowie der endemische neurologische Kretinismus. Für die Pathogenese der myxödematösen Form scheint eine Kombination von Iod- und Selenmangel verantwortlich zu sein, wie Untersuchungen in Zentralafrika gezeigt haben (14).

### **2.1.2 Selenversorgung und Toxizität**

Deutschland gehört zu den Ländern der Welt mit relativ selenarmen Böden. Hier produziertes Getreide enthält somit fast kein Se und trägt mit nur 5% zur gesamten Selenaufnahme durch die Nahrung bei. Einen Großteil des Se (85%) nehmen die Deutschen durch Fleischverzehr auf, da eine Selenanreicherung der Futtermittel von Tieren gesetzlich vorgeschrieben ist (5).

Laut Bundesumweltamt nehmen Erwachsene pro Tag im Mittel 0,67 µg Se/kg Körpergewicht auf. So ergibt sich eine tägliche Selen-Aufnahme beim Mann von durchschnittlich 47 µg und bei der Frau von 38 µg. Bei jungen Menschen ist die Aufnahme noch um 8-10 µg/Tag geringer (15). Die deutsche Gesellschaft für Ernährung gibt die in Tabelle 1 aufgeführten Empfehlungen für eine optimale Selenzufuhr (16).

**Tabelle 1: Empfehlungen für die optimale Selenzufuhr (16)**

<u>Alter</u>	<u>Selenmenge [µg/Tag]</u>
0 bis unter 4 Monate	5–15
4 bis unter 12 Monate	7–30
1 bis unter 4 Jahre	10–40
4 bis unter 7 Jahre	15–45
7 bis unter 10 Jahre	20–50
10 bis unter 15 Jahre	25–60
>15 Jahre	30–70
Schwangere	30–70
Stillende	30–70

Die Beziehung zwischen Selenaufnahme und Blutkonzentration ist über weite Bereiche relativ linear (5).

Die Referenzwerte für die Selenkonzentration im Serum sind in Tabelle 2 aufgeführt (17).

**Tabelle 2: Referenzwerte der Selenkonzentration im Serum (17)**

<u>Alter</u>	<u>Se im Serum [µg/l]</u>
Kleinkinder	58-116
Schulkinder	69-121
Erwachsene	74-139

Der Mittelwert der Selenkonzentration im Serum in Deutschland liegt bei 75 µg/l (5). Somit liegen die Deutschen eher im unteren Bereich der Selenversorgung und viele Bundesbürger müssen damit als selenunterversorgt eingestuft werden.

Doch eine Substitution mit Se sollte bei leichtem Selenmangel nicht ohne Bedacht erfolgen, da eine Selenintoxikation schwerwiegende Folgen haben kann. Bei Überschreitung der zehnfachen Tagesdosis kann es zu toxischen Symptomen kommen, die jedoch relativ uneinheitlich sind (18). Bisher wurden beschrieben: knoblauchartiger Mundgeruch, abdominale Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Erschöpfung, Kopfschmerzen, Selenrhinitis, Heiserkeit, Hautekzeme, Haarausfall, Onycholysis, Gewichtsabnahme, vermehrter Speichelfluss, Tachykardie, Hämatemesis, Nekrose von Leber und Nieren, Hirn- und Lungenödem, Koma bis hin zum Tod (15) (19).

### **2.1.3 Selen und Neugeborene**

Wie bereits ausgeführt sind besonders Kinder von Selenmangelerkrankungen betroffen. Doch auch in der Neugeborenenperiode, insbesondere bei Frühgeborenen, scheint Se eine entscheidende Rolle zu spielen.

Darlow et al. konnten 1995 erstmals zeigen, dass ein niedriger Selenspiegel mit einem Anstieg von Erkrankungen des Respirationstrakts bei Kindern mit sehr niedrigem Geburtsgewicht assoziiert ist (20). Dies konnte 2011 durch Mostafa-Gharehbaghi et al. bestätigt werden. Sie zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen bronchopulmonaler Dysplasie und einem niedrigen Selenstatus besteht (21). Die bronchopulmonale Dysplasie ist eine chronische Lungenerkrankung des Früh- und Neugeborenen, die 10% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g und 20-30% der Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g betrifft. Als Ursache wird eine längere Beatmung vermutet. Diese kann insbesondere bei unreifem Lungengewebe durch hohe Beatmungsdrücke und Sauerstofftoxizität über inflammatorische Prozesse zu einer Lungenschädigung führen. Die Behandlung gestaltet sich schwierig und langwierig, sodass in schweren Fällen die Letalität sogar bei über 25% liegt (22). Zurzeit ist noch unklar, ob eine Selensupplementation eine bronchopulmonale Dysplasie verhindern kann (21). Darlow et al. konnten im Jahre 2000 keine gesundheitliche Besserung bei untergewichtigen Neugeborenen durch eine Supplementation zeigen (23).

Wie bereits erwähnt spielt Se eine Rolle bei dem Krankheitsbild der Sepsis. Selbst in den Industriestaaten ist die Inzidenz der Sepsis bei Neugeborenen recht hoch. Es erkranken etwa 4 von 1000 Lebendgeborenen (24). Allerdings gelten die aktuellen Leitlinien zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis nicht für neonatale und pädiatrische Patienten. Eine separate Leitlinie soll hier erst erarbeitet werden (25). Somit ist bisher noch unklar, ob auch bei septischen Neugeborenen und Kindern eine adjuvante Therapie mit Se erwogen werden sollte.

Ferner wird die Bedeutung eines Selenmangels und damit abnehmende GPx-Aktivität bei der Ausbildung einer Frühgeborenen Retinopathie (Retinopathia praematurorum) diskutiert. Hierbei handelt es sich, genau wie die bronchopulmonale Dysplasie, um eine durch Sauerstoffradikale verursachte Erkrankung (26) (27). Sie ist die häufigste Ursache für eine Erblindung bei Kindern und ist gekennzeichnet durch eine fibrovaskuläre Proliferation von Netzhautgefäßen (28). Yang et al. wiesen bei Kindern mit Retinopathia praematurorum einen niedrigeren Selenspiegel als bei gesunden Kindern nach (27).

Da mehrere Studien zeigen, dass die GPx-Aktivität kein guter Marker für die Selenversorgung von Neugeborenen ist (29) (30), ist man auf die direkte Selenmessung angewiesen. Als Material für die Bestimmung des Selenstatus bei Neugeborenen nutzen viele der veröffentlichten Studien Nabelschnurblut (31) (32) (33). Jedoch ist fraglich, ob die Selenwerte im Nabelschnurblut exakt dem neonatalem Selen Spiegel entsprechen, da Nabelschnurblut immer auch eine gewisse Menge maternalen Bluts enthält. Die Selenwerte von neonatalen und Nabelschnurblut korrelieren laut Dison et al. zwar auf einem hohen Niveau (34), dies impliziert jedoch keine Äquivalenz der Selenwerte. Nabelschnurblut bietet ferner nur die Möglichkeit, den Selenstatus am Geburtstermin zu bestimmen.

#### **2.1.4 Selen und Schilddrüse**

Für eine normale kindliche Entwicklung ist eine ausreichende Versorgung mit Schilddrüsenhormonen obligat. Eine konnatale Hypothyreose liegt bei ca. 1 von 3000-4000 Neugeborenen vor (35). In 80-90% der Fälle liegt eine Dysgenese, also eine angeborene Entwicklungsstörung der Schilddrüse zugrunde. Die häufigste Ursache für die erworbene Hypothyreose ist ein Iodmangel, der auch schon intrauterin durch eine Mangelversorgung der Mutter auftreten kann (36). Unbehandelt führt die Hypothyreose des Neugeborenen zum Vollbild des Kretinismus. Dieses Krankheitsbild ist unter anderem durch eine schwere mentale Retardierung und eine Wachstumsstörung gekennzeichnet (37). Durch die Einführung des Neugeborenen-Screening sind jedoch derartig schwere Verläufe kaum noch nachweisbar. Vielmehr kommt es, bei rechtzeitigem Beginn einer L-Thyroxin Substitutionstherapie, zu einer nahezu unauffälligen kognitiven Entwicklung der Kinder mit einer konnatalen Hypothyreose (38). Allerdings bedürfen diese Patienten, sofern nicht eine transiente Form vorliegt, einer lebenslangen Substitution mit dem Schilddrüsenhormon T4.

Die Untersuchung der Verbindung von Se mit der Schilddrüsenhormonachse rückte über die Jahre immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Die Schilddrüse gehört zu den Organen mit dem höchsten Selengehalt im Körper (39). Inzwischen konnten verschiedene Selen-abhängige Enzyme identifiziert werden, die entscheidend für eine normale Schilddrüsenfunktion sind. DIO sorgen für eine Aufrechterhaltung des Schilddrüsenmetabolismus, indem sie T4 in das aktive T3 umwandeln bzw. die Wirkung

der Schilddrüsenhormone begrenzen (18) (39). Die DIO1 kommt besonders in Leber, Niere und der Schilddrüse vor (40). Durch Chanoine et al. wurde gezeigt, dass ein Selenmangel bei Ratten zu einem weitgehenden Verlust der Aktivität der DIO1 in der Leber führt (41). Die zytosolische Glutathion Peroxidase (cGPx) und die Plasma Glutathion Peroxidase (pGPx) sowie die Phospholipid Hydroperoxide Glutathion Peroxidase (PHGPx) schützen die Zellen vor oxidativem Stress und freien Radikalen und somit vor Zellzerstörung (39). Diese Enzymsysteme scheinen auch bei Schilddrüsenerkrankungen von Bedeutung zu sein. Die Rolle des Selenmangels bei der Pathogenese des endemischen myxödematösen Kretinismus wurde bereits angesprochen. Doch auch andere Schilddrüsenerkrankungen sollen durch den Selenstatus beeinflusst werden. Diskutiert wird beispielsweise, ob eine Selengabe durch die Steigerung der Aktivität der GPx zu einer Reduzierung des inflammatorischen Prozesses bei der Autoimmun-Thyroiditis führen kann (39). Die Mehrzahl der bisher durchgeführten randomisierten prospektiven klinischen Studien erzielten durch eine Therapie mit 200 µg Se eine Abnahme der Thyreoperoxidase (TPO)-Autoantikörper (39). In der klinischen Praxis erfolgt so häufig eine Selensubstitution bei Patienten mit Autoimmunthyreoiditis, nicht zuletzt auch wegen der subjektiven Besserung, die viele Patienten erfahren (42). Diskutiert wird darüber hinaus der Einfluss von Se bei malignen Erkrankungen der Schilddrüse. So konnten Kato et al. 2013 erstmals zeigen, dass Se in vitro hemmend auf das Wachstum von Schilddrüsenkrebs-Zellen wirkt (43). Es wird ferner vermutet, dass ein Selenmangel durch eine Abnahme der DIO1-Aktivität eine Bedeutung beim low-T3-Syndrom hat. Dieses Syndrom tritt bei Schwerkranken wie zum Beispiel Polytraumapatienten auf und ist gekennzeichnet durch eine mangelnde Konversion von T4 zu T3. Dies scheint sich nachteilig auf den eigentlichen Krankheitsverlauf auszuwirken (44). Berger et al. konnten bei Traumapatienten eine Korrelation von Se mit dem T3-Spiegel und einer Abnahme der T4-Deiodierung aufzeigen (45). Schilling et al. sahen diesen Zusammenhang hingegen nicht. Da größere randomisierte Studien fehlen, können bisher keine generellen Empfehlungen zur Selensubstitution beim low-T3-Syndrom gegeben werden (44).

Wie bereits erwähnt bedarf eine konnatale Hypothyreose einer Substitution mit T4, welches durch die DIO2 in T3 umgewandelt wird. Chanoine et al. zeigten, dass Kinder mit konnataler Hypothyreose im Vergleich zu euthyreoten Kindern einen höheren T4/T3-Quotienten aufweisen. Sie vermuteten, dass ein Selenmangel über eine verminderte Aktivität der DIO1 zu dieser verminderten Deiodierung von T4 führt (40), da

sie solch einen Zusammenhang bereits bei Ratten zeigen konnten (41). Allerdings führte eine Selensubstitution bei den untersuchten Kindern nicht zu einer Veränderung des Schilddrüsenhormonstatus (40). Hingegen konnte bei Patienten mit Phenylketonurie beobachtet werden, dass eine Selensupplementation zu einem Anstieg von T4, freiem T4 (fT4) und reversem T3 (rT3) führt (46). Auch bei Hämodialyse-Patienten mit chronischer Anämie ließ sich der Schilddrüsenhormonspiegel durch eine Selengabe beeinflussen (47). Ferner zeigten einige nicht-interventionelle Studien eine Verbindung des Selen- und Schilddrüsenhormonspiegels auf. Bei gesunden euthyreoten Probanden fand man eine schwache inverse signifikante Verbindung von Se und T4 sowie eine schwache signifikante Verbindung von Se mit einem Quotienten aus T3 und T4 (48). Ravaglia et al. wiesen bei sehr alten Patienten eine signifikante Korrelationen von Se und fT4 nach (49). Von Pizulli et al. wird aufgrund dreier Fallstudien gemutmaß, dass sogar alleiniger Selenmangel ohne ein Ioddefizit zu einer Hypothyreose führt (50).

Es wird deutlich, dass die Selenversorgung vielfältige Einflüsse auf die Schilddrüse hat. Doch über die Frage, ob tatsächlich ein direkter Zusammenhang von Selenstatus und der Höhe des Schilddrüsenhormonspiegels besteht, herrscht Uneinigkeit. Hingegen ist die grundlegende Bedeutung der Selenoproteine und deren Biosynthese für den Schilddrüsenhormonmetabolismus mit der Charakterisierung der ersten Kinder mit einem genetischen Defekt im Biosynthesegen SECISBP2 endgültig etabliert (51). Diese Kinder zeigen neben den auffälligen Schilddrüsenhormonspiegeln auch ein ausgeprägtes Reifungsdefizit der Entwicklung, im Besonderen der Knochenreifung.

### **2.1.5 Selen und Wachstum**

Ein Mangel an Wachstumshormon (Somatotropin, growth hormone, GH) ist neben vielen weiteren Faktoren eine mögliche Ursache für einen Kleinwuchs bei Kindern. Dieser Wachstumshormonmangel kann durch eine Störung auf Ebene der endokrinologischen Steuerzentren Hypothalamus und Hypophyse bedingt sein, beispielsweise durch Traumen oder angeborene Fehlbildungen. Die Wirkung der Wachstumshormone wird indirekt auch über die in der Leber gebildeten Wachstumsfaktoren, die sog. Somatomedine vermittelt (36). Daher kann eine Lebersynthesestörung ebenfalls einen Kleinwuchs hervorrufen. Unter den Wachstumsfaktoren kommt dem Somatomedin C, auch insulin-like growth factor 1 (IGF-



1) genannt, die größte Bedeutung zu. Liegt der Verdacht auf eine Wachstumsstörung vor, wird der Wachstumsfaktor IGF-1 und IGF-bindendes Protein 3 (IGFBP-3) zur Diagnostik im Blut bestimmt. Daran können sich verschiedene Stimulationstests der Hypophyse anschließen. Eine alleinige, einmalige Messung des Wachstumshormons ist aufgrund der pulsatilen Ausschüttung durch die Hypophyse hingegen nicht zur Diagnose eines Kleinwuchses geeignet. Die Behandlung des Kleinwuchses erfolgt durch tägliche Injektionen von synthetisch hergestelltem Wachstumshormon (52). Liegt die Ursache in einem gestörten Wachstumshormonrezeptor, der z.B. in der Leber die GH-abhängige Biosynthese und Sezernierung von IGF-1 kontrolliert, so kann auch direkt mit IGF-1 substituiert werden.

Bereits seit den 1970er Jahren wird die Verbindung von Se mit der Wachstumshormonachse erforscht (53). Mehrfach wurde an Ratten beobachtet, dass ein Selendefizit zu einer Wachstumsretardierung führt (54) (53). Moreno-Reyes et al. konnten sogar zeigen, dass dieses Selendefizit zu einer Abnahme des Wachstumshormon- und IGF-1-Serumspiegels führt (54). Es wird diskutiert, ob der beobachtete Zusammenhang von der Schilddrüsenhormonachse abhängt. So könnte das Selendefizit zu einer Abnahme der DIO-Aktivität führen und damit zu einer verminderten Umwandlung von T4 in T3, welches wichtig für die normale Synthese des Wachstumshormons ist (54). Der Zusammenhang von Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse ist somit derzeit ebenfalls ein intensiv untersuchter Forschungsgegenstand. So konnten Ramajayam et al 2012 erstmals zeigen, dass die Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Osteoblasten durch TSH über IGF vermittelt wird (55).

Aus der Analyse von Mäusen mit genetisch gestörtem Selenstoffwechsel durch die Inaktivierung des Selentransporters Selenoprotein P (SePP) weiß man ebenfalls, dass die homozygot SePP-defizienten Tiere ein stark eingeschränktes Wachstum zeigen (56). Dieser Wachstumsdefekt lässt sich in diesem Tiermodell durch eine verbesserte Selenaufnahme weitgehend vermeiden.

Im humanmedizinischen Bereich erfolgte bisher nur eine Studie bei älteren Probanden (über 65 Jahre), bei der eine schwache positive Korrelation von IGF-1 und Se nachgewiesen werden konnte (57).

## 2.2 Kupfer

### 2.2.1 Physiologische Funktion und Erkrankungen

Cu ist nach Eisen (Fe) und Zink (Zn) das dritthäufigste Spurenelement im menschlichen Körper (58). Kupferhaltige Enzyme erfüllen zahlreiche essentielle Funktionen im Organismus. So sorgt Ceruloplasmin für eine an den Bedarf angepasste Verteilung von Cu im Körper (58). Es ist ein Akute-Phase-Protein, schützt die Zellen vor oxidativem Stress und ist wichtig für die Regulation des Eisenmetabolismus. Die Cu-haltige Lysyloxidase spielt eine Rolle bei der Bindegewebssynthese, indem es neu gebildete Elastin- und Kollagenfasern vernetzt. Die Cu-haltige Tyrosinase trägt hingegen zur Melaninsynthese und die Cu-haltige Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase zur Neurotransmittersynthese bei. Die Cytochrom-c-Oxidase ist das letzte Enzym der Atmungskette in den Mitochondrien und ebenfalls Cu-abhängig. Die zytosolische Superoxiddismutase, die neben Cu auch Zn enthält, schützt vor freien Radikalen. Auch dem Metallothionin wird eine Funktion bei der antioxidativen Abwehr zugeschrieben, ferner dient es der Kupferbindung (59).

Ein schwerer Kupfermangel kommt eher selten vor. Ursachen können eine verminderte Zufuhr mit der Nahrung, aber auch verringerte Aufnahme z.B. im Rahmen einer Enteropathie sein. Die Kupferaufnahme kann auch durch die gleichzeitige Zufuhr von Fe und Zn gestört werden (58). Kupfermangel kann zu allen Formen von Anämien führen, ferner zu Leukopenie, Neutropenie und selten auch zu Thrombozytopenie (60). Bei Kindern mit einem Kupferdefizit wurden außerdem Knochenveränderungen nachgewiesen (61). Darüber hinaus werden verschiedene neurologische Störungen wie Demyelinisierung oder Motoneuronenerkrankungen als Folge eines Kupfermangels diskutiert (60). Bekannte Krankheiten des Kupferstoffwechsels sind das Menkes-Syndrom, der Morbus Wilson sowie die Indian Childhood Cirrhosis (ICC) und die Non-Indian Childhood Cirrhosis (NICC). Bei den beiden erstgenannten sind Genmutationen als Ursache bekannt, bei ICC und NICC werden genetische Faktoren noch diskutiert (59). Beim Morbus Wilson ist durch einen defekten Transporter die Kupferausscheidung über die Galle gestört, sodass Cu in der Leber und im Hirn akkumuliert. Es werden drei Formen unterschieden, bei denen jeweils Leberfunktionsstörungen, neurologische oder psychiatrische Symptome führend sind. Beim Menkes-Syndrom bedingt ein defekter Transporter eine insuffiziente Kupferaufnahme über den Darm. Neurologische Symptome sind bei dieser, in den ersten Lebensjahren tödlich verlaufenden, Krankheit

führend. ICC und NICC sind ebenfalls tödlich verlaufende Erkrankungen. Sie treten bei Säuglingen und kleineren Kindern auf und sind gekennzeichnet durch eine feinknotige Leberzirrhose und einen sehr stark erhöhten Kupfergehalt der Leber. Als Ursache werden unter anderem eine gesteigerte Kupferaufnahme durch Benutzung von Messinggeschirr oder korrodierte kupferhaltige Wasserleitungen diskutiert (62).

### 2.2.2 Kupferversorgung und Toxizität

Lebensmittel mit besonders hohem Kupfergehalt sind Nüsse und Innereien. Ebenso ist Kupfer im Getreide enthalten, jedoch in geringeren Mengen. Der Gehalt ist hier abhängig von der Kupferkonzentration im Boden (62). Weiterhin kann Leitungswasser Cu enthalten. Dies ist vornehmlich durch Korrosionsvorgänge in kupferhaltigen Wasserleitungen bedingt (59). Die deutsche Gesellschaft für Ernährung gibt die in Tabelle 3 aufgeführten Empfehlungen für eine optimale Kupferzufuhr (16).

**Tabelle 3:** Empfehlungen für die optimale Kupferzufuhr (16)

<u>Alter</u>	<u>Kupfermenge [mg/Tag]</u>
0 bis unter 4 Monate	0,2–0,6
4 bis unter 12 Monate	0,6–0,7
1 bis unter 7 Jahre	0,5–1,0
>7 Jahre	1,0–1,5

Die Referenzwerte für die Kupferkonzentration im Serum unterscheiden sich in den verschiedenen Altersstufen nur geringfügig und sind in Tabelle 4 aufgeführt (63).

**Tabelle 4:** Referenzwerte für die Kupferkonzentration im Serum (63)

<u>Alter</u>	<u>Cu im Serum [µg/l]</u>
1-5 Jahre	800-1500
6-9 Jahre	840-1360
10-13 Jahre	800-1210
14-19 Jahre	640-1170

Cu ist zwar essentiell für den menschlichen Körper, andererseits kann eine erhöhte Aufnahme zum Teil schwerwiegende Folgen haben. Akut führt eine Kupferintoxikation zu gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen. Eine Intoxikation kann aber auch zu schweren Leber- und Nierenschäden, hämolytischen Anämien bis hin zu Koma und Tod führen (59). In der Trinkwasserversorgung wird daher ein Grenzwert von 2 mg Cu pro Liter Trinkwasser festgesetzt (64).

### **2.2.3 Kupfer und Schilddrüse**

Seit einigen Jahren wird diskutiert, ob verschiedene Spurenelemente wie Cu, Zn und Se, die gebunden in Metalloenzymen als Teil der oxidativen Abwehr des Körpers gegen Zellschäden fungieren, bei der Pathogenese verschiedener Schilddrüsenerkrankungen involviert sind. So wurden bei Patienten mit malignen Schilddrüsenerkrankungen mehrfach höhere Kupferwerte als bei Gesunden und Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen, wie beispielsweise Hashimoto-Thyreoiditis, nachgewiesen (65) (66). Aihara et al. fanden hingegen bei Patienten mit Hyperthyreose signifikant höhere Kupferspiegel als bei Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen oder Gesunden. Ferner zeigten sie eine Korrelation des Kupferspiegels mit T3 und T4 (67). Liu et al. untersuchen eine Gruppe von Patienten mit auffälligen Schilddrüsenwerten, die größtenteils an Morbus Basedow litten. Hierbei konnte kein Unterschied des Kupfergehalts in Erythrozyten zwischen hyper-, hypo- und der gesunden Vergleichsgruppe beobachtet werden. Allerdings identifizierte die Forschergruppe bei den Patienten mit Hypothyreose eine signifikante Korrelation des Kupfergehalts von Erythrozyten mit dem T3/T4-Quotienten und dem TSH-Level im Serum (68).

Es wird deutlich, dass die meisten der veröffentlichten Studien den Zusammenhang von Cu mit den Schilddrüsenhormonen bei Erkrankungen prüfen, die durch entzündliche oder proliferative Prozesse hervorgerufen werden. Über die Zusammenhänge bei Patienten mit kongenitaler Hypothyreose, bei der die Störung der Schilddrüsenfunktion in den meisten Fällen genetisch durch eine Schilddrüsendysgenese hervorgerufen wird (36), ist hingegen wenig bekannt.

### **2.2.4 Kupfer und Wachstum**

Seit Jahren wird ebenso am Zusammenhang von Cu mit dem Knochenmetabolismus geforscht. Mehrfach wurde in Nagetierstudien gezeigt, dass ein Kupferdefizit zu einer

Abnahme der Knochenstärke führt. Diskutiert wird als Ursache die verminderte Aktivität des kupferhaltigen Enzyms Lysyloxidase (69) (70), welches wie oben erwähnt für die Quervernetzung von Kollagen und Elastin im Bindegewebe verantwortlich ist (59). Erstaunlicherweise führte das Kupferdefizit der Ratten in der Studie von Roughead et al. aber nicht nur zu einer Abnahme der Knochenstärke, sondern auch zu einer Wachstumsretardierung mit Abnahme des IGF-1-Spiegels (70).

Im humanmedizinischen Bereich liegen hingegen bisher kaum Studien vor, die den Zusammenhang von Cu und der Wachstumshormonachse untersuchen. Brandão-Neto et al. beobachteten bei einigen ihrer gesunden erwachsenen Probanden einen Anstieg des Wachstumshormons nach Kupfergabe (71).

## **2.3 Dried Blood Spots (DBS)**

### **2.3.1 Neugeborenen-Screening**

Das Neugeborenen-Screening ist eine diagnostische sekundäre Präventionsmaßnahme, die flächendeckend in Deutschland bei allen Neugeborenen durchgeführt wird, um behandelbare endokrine und metabolische Störungen frühzeitig zu erkennen. Das erweiterte Neugeborenen-Screening umfasst insgesamt 14 Krankheiten, unter anderem Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom, Biotinidasemangel, Galaktosämie und Phenylketonurie (72). Seit 2005 handelt es sich hierbei um eine Regelleistung der gesetzlichen Krankenversicherung. Die Standardscreeningmethode ist seither die Tandemmassenspektrometrie (73). Das Untersuchungsmaterial sind mit Blut getränkte Filterpapiere, sogenannte Dried Blood Spots (DBS). Die Blutentnahme für das Screening sollte in den ersten 36-72 Lebensstunden im Rahmen der 2. Kinderfrüherkennungsuntersuchung (U2) erfolgen. So wird sichergestellt, dass auch frühzeitig auftretende Stoffwechsel- und Elektrolytkrisen rechtzeitig behandelt werden können. Die Blutentnahme erfolgt in der Regel aus Kapillarblut der Ferse des Neugeborenen. Das Blut wird auf vorgeschriebene Kreise eines Filterpapiers getropft, anschließend liegend getrocknet und an ein Labor versandt. Bei positivem Befund erfolgt eine weitere Abklärung mittels venöser Blutentnahme und evtl. eine Vorstellung bei einem Endokrinologen oder in einer Stoffwechselsprechstunde (72).

### **2.3.2 Weitere Anwendungsmöglichkeiten von DBS**

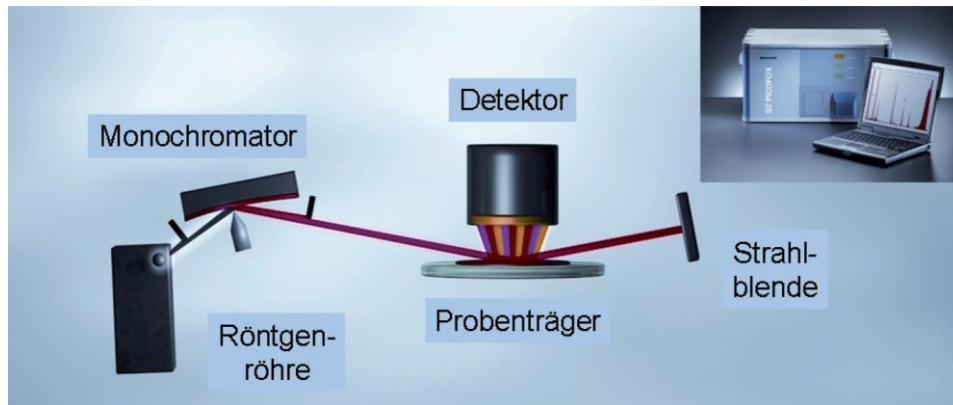
Die DBS finden nicht nur Anwendung im Neugeborenen-Screening, sondern können auch bei der Spurenelementanalytik eine Rolle spielen.

In verschiedene Studien konnte dargelegt werden, dass DBS zur Bestimmung eines Eisendefizits geeignet sind. So konnten Flowers et al 1999 zeigen, dass eine valide Messung des Ferritin- und Transferrinrezeptorspiegels aus mit Plasma getränktem getrockneten Filterpapier möglich ist (74). 1998 wurden von Ahluwalia et al. valide Ferritinmessungen aus serumgetränkten getrockneten Filterpapieren durchgeführt (75). Damit wurde die Möglichkeit geschaffen, auch in ländlichen Gebieten ohne Zugang zu Laboratorien epidemiologische Studien zur Eisenmangelanämie durchzuführen (74).

DBS finden aber auch Anwendung bei der Untersuchung von Umweltbelastungen. Das DABSE Biomonitoring Projekt verwendete DBS, um im Blut von Wildvögeln die Belastung mit toxischen Stoffen wie Cadmium, Blei, Pestiziden und auch Se nachzuweisen (76). Ferner erfolgten Studien zur Verwendung von DBS beim therapeutischen drug monitoring, in der forensischen Toxikologie und beim Nachweis von Drogenabusus (77).

### **2.4 Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)-Analytik**

Eine zuverlässige Möglichkeit zum Nachweis von Spurenelementen bietet die TXRF-Analytik. Sie ermöglicht sensitiv und matrixunabhängig einen Nachweis auch aus kleinsten Probenmengen. Die Materie wird hierbei durch Röntgenstrahlung angeregt. Jedes enthaltene Element emittiert daraufhin Strahlung einer bestimmten Energie und Wellenlänge. Durch die spezifischen Emissionsspektren lassen sich so einzelne Elemente einer Probe identifizieren und über die Intensität der Strahlung auch Konzentrationsbestimmungen vornehmen. Die anregende Röntgenstrahlung muss in einem flachen Winkel auf die Probe auftreffen, damit diese vollständig reflektiert wird und nicht in den Detektor gelangt. Hierfür wird ein dünner Film des Probenmaterials auf einen reflektierenden Träger, bevorzugt eine Quarzplatte, aufgetragen. Über eine Software erfolgt dann eine Auswertung der Emissionsspektren (78). In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau und das Bild eines TXRF-Gerätes dargestellt.



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau und Bild eines TXRF-Gerätes (78)

Die Filterung der Röntgenstrahlung erfolgt am Monochromator. Die Strahlung trifft anschließend auf die getrocknete Probe. Wellenlänge und Strahlungsintensität werden vom Detektor aufgenommen und über eine Auswertungssoftware digital verarbeitet. An der Strahlblende werden die erzeugten Röntgenstrahlen letztlich gestoppt (78).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das essentielle Spurenelement Se ist in Form von Selenocystein als Bestandteil verschiedener Selenoenzyme an der Regulation zahlreicher wichtiger Körperfunktionen beteiligt. Die Schilddrüse ist das Organ mit dem höchsten Selengehalt im menschlichen Körper und wird auf vielfältige Weise durch die Selenoenzyme DIO und GPx beeinflusst. Ebenso erscheinen Wachstums- und Reifungsprozesse selenabhängig zu sein. Neben Se hat auch das essentielle Spurenelement Cu einen Einfluss auf die Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse. In der vorliegenden Arbeit soll daher als zentrales Ziel die Hypothese überprüft werden, dass die Serumkonzentration von Se oder Cu mit der Schilddrüsenhormon- und Wachstumsachse bei Kindern korrelieren. Zu diesem Zweck erfolgt die Untersuchung von zwei pädiatrischen Patientenkohorten im Berliner Raum; einer Gruppe von Kindern mit konnataler Hypothyreose und einer Gruppe von Kindern, bei denen ein Kleinwuchs besteht.

Generell lässt sich dann anhand des Vergleiches der beiden untersuchten Gruppen auch eine Aussage darüber treffen, ob pädiatrische Patienten in Berlin möglicherweise eine Unterversorgung mit den untersuchten Spurenelementen aufweisen und ob es hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Altersgruppen gibt.

Aber auch bei Neugeborenen ist die Kenntnis des Selenstatus von enormer Wichtigkeit, z.B. im Rahmen der Behandlung einer bronchopulmonalen Dysplasie oder einer Neugeborenen-Sepsis. Bislang wurde hierzu häufig auf die Selenmessung aus Nabelschnurblut zurückgegriffen, welches neben dem kindlichen Blut auch immer mütterliches Blut enthält. Somit spiegelt Nabelschnurblut möglicherweise nicht exakt den kindlichen Status wieder. Um Auskunft über den Selenstatus nach der Geburt zu erhalten, ist man auf Blutproben angewiesen, die direkt vom Säugling stammen. Eine venöse Blutentnahme wird im Regelfall aber gerade bei gesunden Neugeborenen und kleinen Kindern, aufgrund der Schmerzhaftigkeit der Prozedur und dem Infektionsrisiko vermieden. Die Technik der DBS bietet demgegenüber die Möglichkeit, auf wenig invasivem Wege Blutproben von Kindern zu erhalten. Daher soll in dieser Arbeit auch eine praktikable und preiswerte Methode entwickelt werden, um Spurenelemente aus DBS zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden korrespondierende Serumproben mit DBS-Proben verglichen und verschiedene Parameter der DBS-Aufbereitung für die Spurenelementanalyse optimiert.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Chemikalien

In Tabelle 5 findet sich eine Auflistung der Geräte und Chemikalien, die bei der Untersuchung der Kinder mit konnataler Hypothyreose und bei Kindern mit Kleinwuchs, sowie bei der Entwicklung der Methode „Selenbestimmung aus DBS“ verwendet wurden.

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Luftfilterwerkbank Laminair HB 2448	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Microspin FV-2400	Hartenstein
Pipetten Eppendorf research 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl	Eppendorf AG
Vortexer	Merck KGaA
S2 Picofox	Bruker AXS Microanalysis GmbH
Ultraschallprozessor	Labsonic®
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
ultrareines H <sub>2</sub> O	Biochrom AG
HCl 37%	Merck KGaA
HNO <sub>3</sub> 65%	Merck KGaA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Fluka Chemika
PVA	Sigma-Aldrich®
Seronorm™ Serum Level 2	SERO AS

#### 3.2 Untersuchung von Kindern mit konnataler Hypothyreose und mit Kleinwuchs

##### 3.2.1 Probanden und Material

Untersucht wurden zwei verschiedenen Patientengruppen, die in der Pädiatrischen Endokrinologie des Campus Virchow Klinikum der Charité behandelt wurden. In die erste Gruppe wurden 84 Kinder, im Alter von 3-17 Jahren mit konnataler Hypothyreose eingeschlossen. Während des Untersuchungszeitraums erfolgte eine Substitution mit Schilddrüsenhormon T4. Die Vergleichsgruppe bestand aus 66 Kindern im Alter von 3-

16 Jahren bei denen ein Kleinwuchs vorlag. Hierfür liegt der Ethikantrag „Untersuchung von Serumparametern bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen und Wachstumsstörung“ vor, welcher einzusehen ist unter der Ethikkommission-Antragsnummer EA2/132/11.

Die Blutentnahmen der Patienten mit konnataler Hypothyreose erfolgten im Zeitraum von August 1989 bis März 2011, die der Patienten mit Verdacht auf einen Wachstumsdefekt im Zeitraum von Juli 2007 bis Januar 2008 im Rahmen der medizinischen Betreuung im pädiatrischen Zentrum am Campus Virchow Klinikum der Charité. Jeweils zeitnah erfolgten die Bestimmungen von TSH, T4, fT4 und Gesamt T3 und bei der zweiten Gruppe zusätzlich IGF-1 aus dem Serum. Nicht für alle untersuchten Kinder lagen Werte für T4, fT4 und Gesamt T3 vor.

Patienten, die 18 Jahre oder älter waren, wurden ausgeschlossen. Aus der Vergleichsgruppe wurden Kinder mit auffälligen Schilddrüsenhormonparametern oder Kinder mit nachgewiesener Erkrankung der Schilddrüse ausgeschlossen, um den Einfluss von Se auf die Wachstumshormonachse auch bei normaler Schilddrüsenfunktion zu erarbeiten.

Die Spurenelementbestimmung (Se und Cu) im Serum erfolgte im Institut für Experimentelle Endokrinologie am Campus Virchow Klinikum im Zeitraum von Juni bis August 2011. Die zwischenzeitliche Lagerung des Serums erfolgte ununterbrochen bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 Methode und Probenvorbereitung**

Die Bestimmung von Se und Cu erfolgte mittels der TXRF. Zu allen Proben wurde ein Standard zur internen Kalibrierung der Messung hinzugegeben. In diesem Fall wurde das Element Gallium genutzt, da es zum einen in den untersuchten Proben selbst nicht enthalten ist und zum anderen keine Überlappung seines Emissionsspektrums mit den Spektren von Se oder Cu besteht. Darüber hinaus weist Gallium eine hohe Löslichkeit und eine gute Sensitivität bei der TXRF-Analyse auf.

Die Serumproben wurden 1:2 mit einem Galliumstandard der Konzentration  $1000\ \mu\text{g/l}$  verdünnt (zu  $20\ \mu\text{l}$  Serum bzw. Plasma wurden  $20\ \mu\text{l}$  Galliumstandard hinzugegeben). Anschließend wurde die Probe gründlich homogenisiert. Von dieser Probe wurden  $8\ \mu\text{l}$  blasenfrei auf eine unbeschichtete,  $30\ \text{mm}$  durchmessende und  $3,0\ \text{mm}$  ( $\pm 0,1\text{mm}$ ) dicke Quarzplatte gegeben und anschließend ca. eine halbe Stunde bei

Raumtemperatur getrocknet. Die Quarzplatten wurden aufgrund ihres sehr niedrigen Hintergrundspektrums bei der Messung gewählt. Zur Messung der Proben wurde das Auftisch-TXRF-Gerät S2 Picofox der Bruker AXS Microanalysis GmbH (Adlershof, Berlin) verwendet. In diesem Spektrometer werden die Proben in Doppelbestimmung jeweils für 1000 Sekunden gemessen. Zur Testung der Präzision der Messung von Se und Cu im Picofox wurden wiederholt die Spurenelemente einer genormten Serumlösung (Seronorm™ Serum Level 2 der Firma SERO AS, Norway) bestimmt. So können valide Messungen für Se und Cu sichergestellt und Variationskoeffizienten der Messgenauigkeit berechnet werden. Die Messung aller Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Bei den in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Werten handelt es sich daher um die Mittelwerte.

### **3.3 DBS-Untersuchung**

#### **3.3.1 Probanden und Material**

Zur Entwicklung der Methode „Selenbestimmung aus DBS“ wurden von insgesamt 10 freiwilligen, gesunden, erwachsenen Probanden (Frauen und Männer im Alter von 25 bis 45 Jahre) Blutproben entnommen. Hierfür liegt der Ethikantrag „Blutproben für die In-vitro-Diagnostik – Diagnostische Blutentnahme für wissenschaftliche Zwecke: Referenzbereich gesunder Probanden (Normalkollektiv)“ vor, welcher einzusehen ist unter der Ethikkommission-Antragsnummer EA1/057/07. Die Blutentnahme erfolgte durch geschultes und autorisiertes Personal mittels Einmal-Entnahme-Sets (BD Vacutainer® Safety-Lok™) nach Desinfektion aus der Cubitalvene. Für die Gewinnung des Serums wurden 5 ml BD Vacutainer® SST™ verwendet, welche ein Trenngel enthalten. Die Serumproben wurden bei Raumtemperatur für 30-60 Minuten gelagert, um die Gerinnung zu aktivieren. Anschließend wurden sie bei 21°C für 10 Minuten bei 2600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde à 100 µl in 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C für die weitere Verwendung aufbewahrt. Der restliche Blutkuchen wurde verworfen.

Zur Herstellung der DBS wurden Protein Saver™ 903® Cards der Firma Whatman® verwendet. Mittels einer Einmalspritze wurde ca. 1 ml Vollblut nach oben beschriebener Gewinnung einer Serumprobe abgenommen und ein Tropfen direkt ohne Kanüle frei auf der Mitte des Filterpapierkreises positioniert. Dieser Arbeitsschritt muss rasch erfolgen, um eine Gerinnung des Vollblutes zu verhindern. Wenn der Kreis mit einem Tropfen

noch nicht ausgefüllt war, wurde an den Rändern nachgetropft, ohne jedoch die schon benetzte Stelle erneut zu befeuchten. Anschließend wurden die Karten, ohne direktes Aufliegen der benetzten Kreise, für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Es erfolgte kein Aussetzen direkter Sonneneinstrahlung oder hoher Temperaturen. Das Filterpapier wurde weder vor noch nach dem Auftragen des Blutes mit bloßen Händen berührt. Die Herstellung der DBS erfolgte somit wie in der Leitlinie zum Neugeborenen-Screening vorgeschrieben, mit dem Unterschied, dass dort im Regelfall ein weniger invasives Vorgehen erfolgt, indem kapillares Blut aus der Ferse direkt auf die Karten getropft wird. Allerdings ist auch die venöse Blutentnahme laut Leitlinie zulässig (72).

### **3.3.2 Methode und Probenvorbereitung**

Die Bestimmung der Konzentration von Se im Serum erfolgte wie bereits bei den Patienten mit kongenitaler Hypothyreose und den Patienten mit Kleinwuchs beschrieben mittels TXRF.

Zur Entwicklung der Selenbestimmung aus DBS wurden insgesamt sieben verschiedene Methoden verglichen, um Se optimal aus den Filterpapierkarten zu lösen. Als Lösungsmittel wurden jeweils 65%ige Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ), ultrareines Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 37%ige Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) und ein Mix aus 65%iger Salpetersäure und 30%igem Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gewählt. Ferner erfolgte beim favorisierten Lösemittel  $\text{HCl}$  auch eine zusätzliche Behandlung mit Ultraschall, eine Zugabe von Polyvinylalkohol bzw. eine Kombination aus Ultraschall und Polyvinylalkoholzugabe.

Die Bestimmung von Se erfolgte, wie bei der Messung aus dem Serum, durch TXRF. Die Messung aller Proben erfolgte auch hier in Doppelbestimmung. Bei den in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Werten handelt es sich daher um die Mittelwerte.

Die Entwicklung der exakten Arbeitsschritte wird in einem gesonderten Abschnitt im Ergebnisteil der Arbeit vorgestellt. Statistisch wurde ermittelt, welche DBS-Aufbereitung als optimale Methode äquivalente Werte zu den Selenwerten im Serum liefert. Äquivalenz wird angenommen, wenn die Werte der neuen Methode um nicht mehr als 20% von den Messungen aus dem Serum abweichen.

### 3.4 Datenauswertung und Statistik

Für die Datenauswertung und statistische Analyse wurden die Software-Programme IBM SPSS Statistics 17 von IBM und Excel–Microsoft Office 2007 von Microsoft verwendet. Bei der Untersuchung der Gruppen der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose und der Patienten mit Kleinwuchs erfolgte die statistische Analyse je nach Datenart und Anzahl der zu vergleichenden Untergruppen in unterschiedlichen Schritten. Zunächst wurde eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels eines Kolmogorov-Smirnov-Tests und eines Shapiro-Wilk-Tests durchgeführt. Bei gegebener Normalverteilung wurde mit Hilfe der Levene-Statistik die Varianzhomogenität untersucht. Sollen nur zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde der Student's t-Test angewandt. Bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse mittels ANOVA. War keine Normalverteilung gegeben, erfolgte die Untersuchung bei zwei zu vergleichenden Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei mehreren Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test und als Post-Hoc-Test der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die Korrelationstests erfolgten bei allen Untersuchungen mit der Pearson-Korrelation. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 angesetzt. War der p-Wert unterhalb dieses Niveaus wurde das Ergebnis als signifikant angesehen und mit einem Stern (\*) versehen. Bei einem p-Wert unter 0,01, galt das Ergebnis als hochsignifikant und es erfolgte eine Beschriftung mit zwei Sternen (\*\*). Bei der Verwendung des Mann-Whitney-U-Test als Post-Hoc-Test musste jedoch aus formal rechnerischen Gründen ein Signifikanzniveau von kleiner 0,017 angenommen werden.

Bei der Entwicklung der Methode zur Selenbestimmung aus DBS erfolgte zunächst ein Nachweis der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und eines Shapiro-Wilk-Tests. Anschließend erfolgte ein Äquivalenztest mittels des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen aus Selenwerten im Serum und Selenwerten aus den DBS. Hierfür wurde zunächst folgender Äquivalenzbereich festgelegt: Eine Methode wurde als äquivalent zur Serummessung betrachtet, wenn die Selenwerte aus den DBS nicht mehr als 20% von den Serumwerten abwichen. Anschließend wurden die gepaarten Differenzen aus den Selenwerten im Serum (bisheriger Goldstandard) und den Selenwerten bei unterschiedlichen Löseverfahren aus den DBS für jeden Probanden bestimmt. Getrennt für jedes Verfahren wurde das 95%-Konfidenzintervall der gepaarten Differenzen gebildet. Anschließend wurde geprüft, ob die so errechneten 95%-Konfidenzintervalle vollständig im zuvor

festgelegten Äquivalenzbereich lagen. War dies gegeben, konnte eine praktische Äquivalenz von Serummessung und neu entwickelter DBS-Methoden angenommen werden (79).

## **4 Entwicklung der Methode zur Selenbestimmung aus DBS**

Im Folgenden wird die Entwicklung der Methode zur Selenbestimmung aus den DBS vorgestellt. Äquivalenz zur Serummessung wurde angenommen, wenn die Werte der neuen Methode um nicht mehr als 20% von den korrespondierenden Serumwerten abweichen.

### **4.1 Vorüberlegung**

#### **4.1.1 Wahl der verwendeten Lösemittel**

Die Herstellerfirma des Auftisch-TXRF-Gerätes S2 Picofox (Bruker AXS Microanalysis GmbH) sieht zur Probenvorbereitung von Gewebe eine Behandlung mit hochkonzentrierter erhitzter  $\text{HNO}_3$  vor (80). Laborintern konnten hiermit gute Ergebnisse bei der Zersetzung von Knochen und anderen Geweben von Mäusen erzielt werden. In einem Vorversuch sollte dieser Säureaufschluss mittels  $\text{HNO}_3$  für die Behandlung von DBS getestet werden. Hierfür wurde das Gewicht eines kompletten getrockneten Filterpapierkreises bestimmt und mit vier Teilen 65%iger  $\text{HNO}_3$  für eine Stunde bei  $70^\circ\text{C}$  und 1200 rpm im Thermomixer in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß erhitzt. Nach dem Abrauchen der Säure erhielt man jedoch eine zähe gelbe Masse, die zu einer Verstopfung der Pipettenspitze führte. So wurde der Entschluss gefasst, die Probe noch für 2 Minuten und 12.000 rpm bei Raumtemperatur zu zentrifugieren, um mit dem erhaltenen Überstand zu arbeiten. Jedoch entstand insgesamt zu wenig Überstand für eine Durchführung der Messung. Daher wurde diese Methode als ungeeignet für die Zersetzung von DBS befunden. Es wurde nach diesem Versuch die Überlegung angestellt, ob ein Auflösen der DBS auch ohne ein aufwendiges Erhitzen wie beim klassischen Säureaufschluss möglich ist. Hierfür wurden zwei verschiedene Säuren ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ) ausgewählt, die in der Lage sind Peptidbindungen zu spalten. Nach Rücksprache mit Dr. Hagen Stosnach von Bruker AXS Microanalysis GmbH, wurde weiterhin ein Mix aus  $\text{HNO}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  gewählt, der ebenfalls beim klassischen Säureaufschluss von Feststoffen Anwendung findet. Wegen

der Praktikabilität und der geringen Interferenz in der TXRF wurde ferner ultrareines H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel gewählt. In den nachfolgend erläuterten Versuchen konnte HCl als bestes Lösungsmittel identifiziert werden. Nach erneuter Rücksprache mit Dr. Hagen Stosnach wurden weitere Tests mit PVA und Ultraschall durchgeführt, um eine mögliche Verbesserung der HCl-Methode zu erreichen. PVA soll laut Stosnach zu einer homogeneren Verteilung der Probe auf der Quarzplatte für die Messung im Picofox führen. Ultraschallbehandlung hingegen soll zu einer besseren Zersetzung der Probe führen.

#### **4.1.2 Verwendetes Probematerial und Volumen der Lösungsmittel**

In den Leitlinien zum Neugeborenen-Screening ist eine venöse Blutgewinnung zwar erlaubt, jedoch muss auf den Zusatz von EDTA zur Gerinnungshemmung verzichtet werden, da EDTA die Befunde für das Screening auf androgenitales Syndrom verfälscht (72). So wurde auf einen gerinnungshemmenden Zusatz verzichtet und Blut in einer einfachen Spritze abgenommen. Zunächst sollte getestet werden, ob eine exakte Bestimmung des aufgetropften Blutvolumens für jede einzelne Messung möglich ist. Hierfür wurde, wie beschrieben, Vollblut in einer Spritze abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend auf den Filterkreis pipettiert. Bereits während dieser Prozedur wurde eine partielle Gerinnung des Blutes beobachtet. Diese Blutkoagel verhindern die gleichmäßige Durchtränkung des Filterpapierkreises und würden so zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. Folglich wurde der Entschluss gefasst, auf eine routinemäßige Bestimmung der Blutvolumina zu verzichten. Darüber hinaus ist im klinischen Alltag ebenfalls keine Aussage über die exakten Volumina möglich. Die Vorgaben für die Durchführung des Neugeborenen-Screenings sehen lediglich eine annähernd komplette Füllung der Filterkarten mit Blut direkt aus der Ferse des Neugeborenen vor. So erfolgte im Weiteren eine Orientierung an den Angaben der Herstellerfirma Whatman®. Laut Whatman® beträgt das Fassungsvermögen eines 0,5 Inches durchmessenden Filterpapierkreises 75-80 µl (81). Für die weitere Betrachtung wurden daher 75 µl Blut pro Filterkreis angenommen. Nach dem Trocknen der Karten wurde mit einem Locher ein voll mit Blut durchtränkter, Kreis von 5,5 mm Durchmesser und einer Fläche von 23,8 mm<sup>2</sup> aus einem großen Filterkreis gestanzt. Ausgehend von der Annahme, dass sich 75 µl Blut auf dem großen

Kreis mit einer Fläche von 126,7 mm<sup>2</sup> befinden, wurde ein Blutvolumen von rund 14,1 µl für die Stanze errechnet.

Die Wahl des Volumens des Lösungsmittels wurde unter folgenden Gesichtspunkten getroffen: Einerseits soll eine zu starke Verdünnung der Probe durch das Lösungsmittel vermieden werden, um nicht an das Detektionslimit des Geräts zu gelangen. Andererseits muss aber bedacht werden, dass bei zu kleinem Volumen die im nächsten Schritt folgende anteilige Zugabe von Galliumstandard zu gering für eine exakte interne Kalibrierung des Geräts wäre. So wurde der Entschluss gefasst, zu einer Stanze mit 14,1 µl getrocknetem Blut die zehnfache Menge, d.h. 141 µl eines Lösemittels zu geben.

## **4.2 Ergebnisse**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit den unterschiedlichen Lösungsmitteln zur Probenaufbereitung der DBS und die Optimierungsversuche der favorisierten HCl-basierten Methode vorgestellt. Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte der Probenaufbereitung der DBS mittels der neu entwickelten HCl-basierten Methode. Für alle im Folgenden erläuterten Versuche wurden die DBS, wie oben beschrieben, hergestellt und höchstens zwei Wochen gelagert, ohne sie hohen Temperaturen oder direkter Sonnenstrahlung auszusetzen. Anschließend wurden 5,5 mm durchmessende Kreise aus den getrockneten Blutproben gestanzt. Die weiteren Arbeitsschritte werden im Verlauf vorgestellt. Von jedem Probanden wurden korrespondierende Serumproben, wie im Methodikteil beschrieben, abgenommen und aufbereitet. Sowohl die Messungen der DBS als auch die der Serumproben erfolgten im Auftisch-TXRF-Gerät S2 Picofox in Doppelbestimmung.

### **4.2.1 Lösungsmittel zur Probenaufbereitung**

Von je fünf freiwilligen Probanden wurden parallel Serumproben gewonnen und DBS erstellt. Zum Ablösen der Proteine von der DBS-Oberfläche wurden folgende vier Lösungsmittel verwendet: HCl (37%), ultrareines H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub> (65%) und ein Mix aus HNO<sub>3</sub> (65%) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Bei der Herstellung der letztgenannten Mischung wurde eine 3+1 Mischung der Volumina gewählt: 3 ml HNO<sub>3</sub> (65%) und 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

Zu einer Stanze mit 14,1 µl getrocknetem Blut wurden 141µl Lösemittel in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Das Einwirken der Lösemittel auf die Stanzen



erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden die Proben für einige Sekunden in einem Vortex-Mixer geschüttelt. Keine der Methoden führte jedoch zu einer kompletten Zersetzung oder Auflösung der Filterstanzen. Da Fasern jedoch die TXRF stören könnten, wurden die Proben für zwei Minuten bei Raumtemperatur und 12.000 rpm zentrifugiert, um einen faserfreien Überstand zu erhalten. Von den Proben wurden dann anschließend 80 µl eines faserfreien Überstands abpipettiert. Dieser Überstand wurde in ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10% Galliumstandard der Konzentration 5000 µg/l (8 µl) hinzugegeben. Nach gründlichem Homogenisieren wurden 8 µl dieser Lösung auf eine Quarzplatte gegeben, bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden getrocknet und wie die Serumproben mittels TXRF in Doppelbestimmung gemessen. Die durch TXRF ermittelten Werte müssen aufgrund der Menge des zugegebenen Lösemittels mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

Für jede Methode wurden die gepaarten Differenzen aus den Selenwerten im Serum und in den DBS gebildet und das 95%-Konfidenzintervall für diese Differenzen errechnet. In Tabelle 6 sind die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und den DBS für jeden Probanden, getrennt nach den unterschiedlichen Methoden (HCl, H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aufgeführt. Ferner sind der Mittelwert der gepaarten Differenzen mit der Standardabweichung und der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen dargestellt. Vor der Durchführung der DBS-Messungen wurde für die Serumproben ein Mittelwert von rund 85 µg/l errechnet. Unter der Vorgabe, dass die Werte aus den DBS nicht mehr als 20% von den Serumwerten abweichen, ergab sich somit ein Bereich von ±17 µg/l in dem das 95%-Konfidenzintervall der gepaarten Differenzen vollständig liegen muss, damit eine Äquivalenz der neuen Methode zur Serummessung angenommen werden kann.

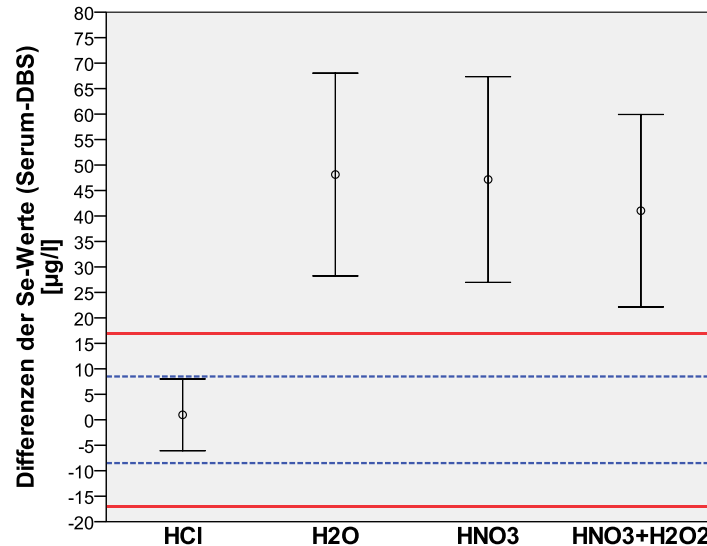
**Tabelle 6:** Unterschiede zwischen den Selenwerten aus dem Serum und DBS für die verschiedenen Lösungsmittel

Dargestellt sind die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und in den DBS für jeden Probanden (getrennt nach den verschiedenen Methoden), ferner der Mittelwert und die Standardabweichung der gepaarten Differenzen, sowie der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen.

	Probanden- nummer	Mittelwert Se im Serum [µg/l]	Mittelwert Se in DBS [µg/l]	Mittelwert der gepaarten Differenzen (Standardabweichung)	95%-Konfidenzintervall der Differenzen	
					unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
<b>HCl</b>	1	73,2	75,2			
	2	106,3	96,4			
	3	91,3	93,0	1,0 (±5,7)	-6,1	8,0
	4	81,0	85,3			
	5	74,8	72,0			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1	73,2	42,5			
	2	106,3	33,9			
	3	91,3	42,7	48,1 (±16,0)	28,2	68,0
	4	81,0	29,3			
	5	74,8	37,6			
<b>HNO<sub>3</sub></b>	1	73,2	25,6			
	2	106,3	38,6			
	3	91,3	64,9	47,2 (±16,3)	27,0	67,4
	4	81,0	23,9			
	5	74,8	38,0			
<b>HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1	73,2	38,0			
	2	106,3	57,6			
	3	91,3	45,4	41,0 (±15,2)	22,2	59,9
	4	81,0	23,6			
	5	74,8	57,0			

Die mittlere Differenz aus den Serumwerten und den DBS-Werten bei der HCl-basierten Methode fiel mit 1,0 (±5,7) µg/l relativ gering aus. Die H<sub>2</sub>O-basierte Methode lieferte hingegen für die DBS Selenwerte, die weit unter denen im Serum lagen. Die mittlere Differenz betrug hier 48,1 (±16,0) µg/l. Auch die HNO<sub>3</sub>- und die HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-basierten Methoden zeigten ähnlich hohe Differenzen: 47,2 (±16,3) µg/l bzw. 41,0 (±15,2) µg/l. Bei der Betrachtung der 95%-Konfidenzintervalle wurde deutlich, dass nur die HCl-basierte Methode Werte lieferte, die äquivalent zu denen der Serummessung waren

(siehe Abb. 2). Die Werte der DBS-Methode wichen durchschnittlich sogar um weniger als 10% (d.h. weniger als  $\pm 8,5 \mu\text{g/l}$ ) von den Serumwerten ab.



**Abb. 2:** Darstellung des Äquivalenzbereichs und des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen für die unterschiedlichen Lösungsmittel

Dargestellt sind der Äquivalenzbereich und die 95%-Konfidenzintervalle für die gepaarten Differenzen aus Serum und DBS, getrennt für die unterschiedlichen Methoden (jeweils  $n=5$ ). Die Enden der Balken kennzeichnen den oberen bzw. unteren Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen für die jeweilige Methode. Die Kreise kennzeichnen den jeweiligen Mittelwert der gepaarten Differenzen. Unter der Vorgabe, dass die Werte aus den DBS nicht mehr als 20% von den Serumwerten (Mittelwert:  $85 \mu\text{g/l}$ ) abweichen, ergab sich ein Äquivalenzbereich von  $-17 \mu\text{g/l}$  bis  $+17 \mu\text{g/l}$ . Der Äquivalenzbereich ist durch die zwei roten horizontalen Linien bei  $-17 \mu\text{g/l}$  und  $+17 \mu\text{g/l}$  gekennzeichnet. Die gestrichelten blauen Linien bei  $-8,5 \mu\text{g/l}$  und  $+8,5 \mu\text{g/l}$  markieren den Bereich, in dem die Abweichung von den Serumwerten  $\leq 10\%$  beträgt. Nur das 95%-Konfidenzintervall der HCl-basierten Methode lag vollständig im Äquivalenzbereich, damit lieferte nur die HCl-basierte Methode äquivalente Werte zu den korrespondierenden Serumproben. Die Abweichung von den Serumwerten bei der HCl-Methode betrug weniger als 10%.

#### **4.2.2 Optimierungsversuche der HCl-basierten Methode**

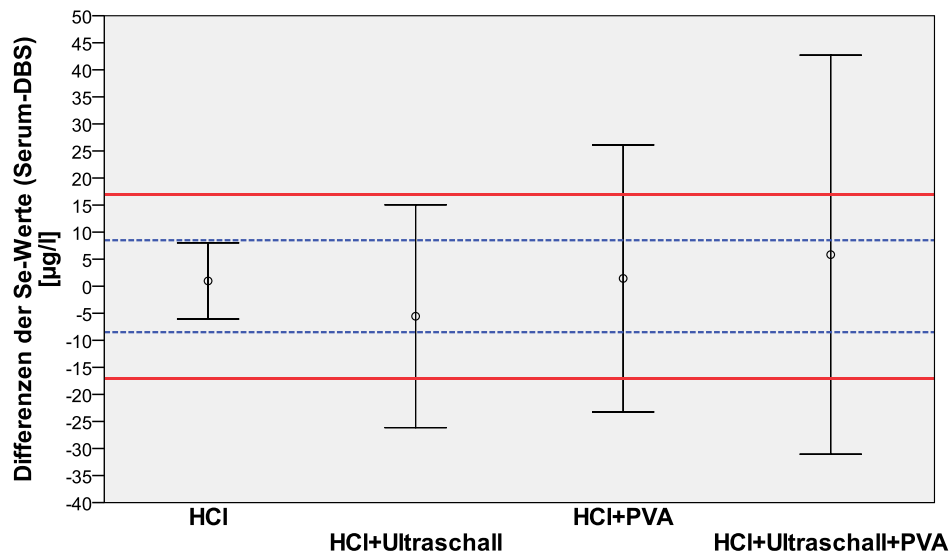
In weiteren Versuchen sollte getestet werden, ob sich die HCl-basierte Methode noch weiter verbessern lässt. Hierfür wurden drei verschiedenen Verfahren untersucht: die Zugabe von PVA, die Ultraschallbehandlung und eine Kombination aus beidem. Die Messungen erfolgten wiederum bei denselben fünf Probanden. Im ersten Versuch wurde zunächst wie üblich bei der HCl-Methode verfahren. Jedoch wurde dann zum erhaltenen Überstand von 80 µl neben 8,8 µl Galliumstandard der Konzentration 5000 µg/l auch 8 µl Polyvinylalkohol der Konzentration 1 g/l hinzugegeben. Wie gewöhnlich wurden dann 8 µl auf eine Quarzplatte aufgetragen und gemessen. Im zweiten Versuch wurde nach der Zugabe von HCl, der Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde und dem Mixen mit der Pipettenspitze eine Ultraschallbehandlung (2x10 Impulse) als Zwischenschritt eingefügt. Danach wurde wie bei der ursprünglichen Methode verfahren. Im letzten Versuch wurden die Ultraschallbehandlung und die Zugabe von PVA kombiniert. In Tabelle 7 sind die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und den DBS für jeden Probanden, getrennt nach den unterschiedlichen Methoden (HCl, HCl+Ultraschall, HCl+PVA, HCl+Ultraschall+PVA) angegeben. Ferner sind der Mittelwert der gepaarten Differenzen mit der Standardabweichung und der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen aufgeführt.

**Tabelle 7:** Unterschiede zwischen den Selenwerten aus dem Serum und DBS für die verschiedenen Optimierungsversuche der HCl-basierten Methode

Dargestellt sind die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und in den DBS für jeden Probanden (getrennt nach den verschiedenen Methoden), ferner der Mittelwert und die Standardabweichung der gepaarten Differenzen, sowie der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen.

	Probanden- nummer	Mittelwert Se im Serum [µg/l]	Mittelwert Se in DBS [µg/l]	Mittelwert der gepaarten Differenzen (Standardabweichung)	95%- Konfidenzintervall der Differenzen unterer oberer Grenzwert Grenzwert	
<b>HCl</b>	1	73,2	75,2			
	2	106,3	96,4			
	3	91,3	93,0	1,0 (±5,7)	-6,1	8,0
	4	81,0	85,3			
	5	74,8	72,0			
<b>HCl+ Ultraschall</b>	1	73,2	94,1			
	2	106,3	89,5			
	3	91,3	102,4	-5,6 (±16,6)	-26,2	15,0
	4	81,0	74,5			
	5	74,8	94,0			
<b>HCl+ PVA</b>	1	73,2	71,0			
	2	106,3	78,1			
	3	91,3	109,1	1,4 (±19,9)	-23,3	26,1
	4	81,0	68,7			
	5	74,8	92,7			
<b>HCl+ Ultraschall+ PVA</b>	1	73,2	112,8			
	2	106,3	71,3			
	3	91,3	67,0	5,8 (±29,7)	-31,1	42,7
	4	81,0	64,8			
	5	74,8	81,6			

In Tabelle 7 ist ersichtlich, dass die zusätzliche Behandlung mit Ultraschall, PVA oder einer Kombination aus beidem nicht zu einer Verringerung der mittleren Differenzen führte. Bei Betrachtung der 95%-Konfidenzintervalle wurde darüber hinaus deutlich, dass keine der drei untersuchten Erweiterungen der HCl-basierten Methode äquivalente Selenwerte zur Serumbestimmung lieferte (Abb.3).



**Abb. 3:** Darstellung des Äquivalenzbereichs und des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen für die unterschiedlichen Optimierungsversuche der HCl-basierte Methode

Dargestellt sind der Äquivalenzbereich und die 95%-Konfidenzintervalle für die gepaarten Differenzen aus Serum und DBS, getrennt für die unterschiedlichen Methoden (jeweils  $n=5$ ). Die Enden der Balken kennzeichnen den oberen bzw. unteren Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen für die jeweilige Methode. Die Kreise kennzeichnen den jeweiligen Mittelwert der gepaarten Differenzen. Unter der Vorgabe, dass die Werte aus den DBS nicht mehr als 20% von den Serumwerten (Mittelwert:  $85 \mu\text{g/l}$ ) abweichen, ergab sich ein Äquivalenzbereich von  $-17 \mu\text{g/l}$  bis  $+17 \mu\text{g/l}$ . Der Äquivalenzbereich ist durch die zwei roten horizontalen Linien bei  $-17 \mu\text{g/l}$  und  $+17 \mu\text{g/l}$  gekennzeichnet. Die gestrichelten blauen Linien bei  $-8,5 \mu\text{g/l}$  und  $+8,5 \mu\text{g/l}$  markieren den Bereich, in dem die Abweichung von den Serumwerten  $\leq 10\%$  beträgt. Nur das 95%-Konfidenzintervall der HCl-basierten Methode ohne weitere Zusätze oder Prozesse lag vollständig im Äquivalenzbereich, damit lieferte nur die HCl-basierte Methode äquivalente Werte zu den korrespondierenden Serumproben. Die Abweichung von den Serumwerten bei der HCl-basierten Methode betrug weniger als 10%.

### 4.3 Validierung der HCl-basierten Methode

Um eine Selenmessung aus den DBS vorzunehmen, wurde in den vorangegangenen Versuchen das Ablösen der Probe von den DBS mittels HCl als effizienteste Methode identifiziert. Die Methode wurde bei weiteren fünf Probanden durchgeführt, um diese Aussage zu validieren. Für die Serumwerte von insgesamt zehn Probanden wurde ein Mittelwert von  $87,2 \mu\text{g/l}$  errechnet. Unter der Vorgabe, dass die Werte aus den DBS

nicht mehr als 20% von den Serumwerten abweichen, ergab sich ein Äquivalenzbereich von -17,4 µg/l bis +17,4 µg/l.

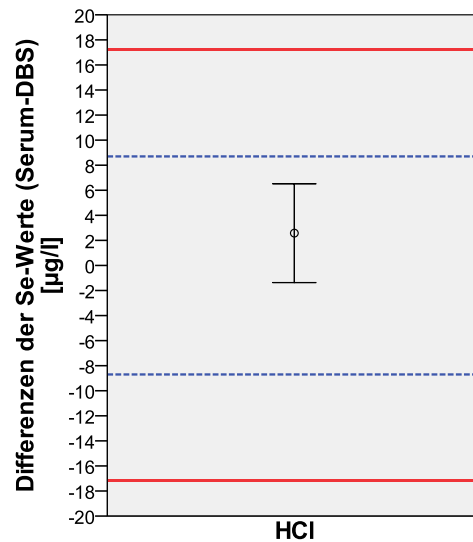
Die Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und den DBS (HCl-Methode) für insgesamt zehn Probanden. Ferner sind der Mittelwert mit der Standardabweichung der gepaarten Differenzen sowie der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen dargestellt.

**Tabelle 8:** Unterschiede zwischen den Selenwerten aus dem Serum und DBS für die favorisierte HCl-basierte Methode

Dargestellt sind die Mittelwerte der Selenkonzentration im Serum und in den DBS für jeden Probanden, ferner der Mittelwert und die Standardabweichung der gepaarten Differenzen, sowie der obere und untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls dieser Differenzen.

Probanden- nummer	Mittelwert Se im Serum [µg/l]	Mittelwert Se in DBS [µg/l]	Mittelwert der gepaarten Differenzen (Standardabweichung)	95%-Konfidenzintervall der Differenzen	
				unterer Grenzwert	oberer Grenzwert
1	73,2	75,2			
2	106,3	96,4			
3	91,3	93,0			
4	81,0	85,3			
HCl	74,8	72,0	2,6 (±5,5)	-1,4	6,5
6	88,5	79,4			
7	69,4	68,9			
8	83,7	73,7			
9	112,5	115,1			
10	91,2	87,3			

Im Mittel wichen die Selenwerte aus den DBS bei der HCl-basierten Methode um 2,6 (±5,5) µg/l von den Serumwerten ab. Das ermittelte 95%-Konfidenzintervall der Differenzen lag komplett im angenommenen Äquivalenzbereich von -17,4 bis +17,4 µg/l (siehe Abb. 4). Die Werte der DBS-Methode wichen sogar um weniger als 10% (d.h. weniger als ±8,7 µg/l) von den Serumwerten ab.



**Abb. 4:** Darstellung des Äquivalenzbereichs und des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen für die Validierung der HCl-basierten Methode

Dargestellt sind der Äquivalenzbereich und das 95%-Konfidenzintervall für die gepaarten Differenzen aus Serum und DBS (HCl-Methode) ( $n=10$ ). Die Enden des Balkens kennzeichnen den oberen bzw. unteren Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls der gepaarten Differenzen. Der Kreis kennzeichnet den Mittelwert der gepaarten Differenzen. Unter der Vorgabe, dass die Werte aus den DBS nicht mehr als 20% von den Serumwerten (Mittelwert: 87,2 µg/l) abweichen, ergab sich ein Äquivalenzbereich von -17,4 µg/l bis +17,4 µg/l. Der Äquivalenzbereich ist durch die zwei roten horizontalen Linien bei -17,4 µg/l und +17,4 µg/l gekennzeichnet. Die gestrichelten blauen Linien bei -8,7 µg/l und +8,7 µg/l markieren den Bereich, in dem die Abweichung von den Serumwerten  $\leq 10\%$  beträgt. Auch bei Durchführung der HCl-basierten Methode an Proben von 10 Probanden ergab sich eine Abweichung von weniger als 10% von den Serumwerten.

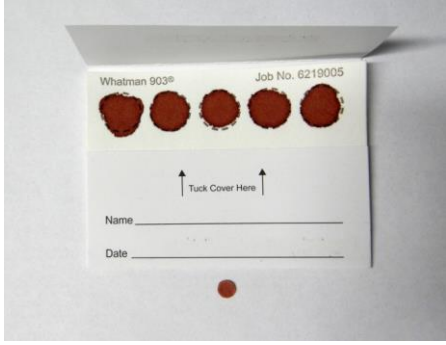

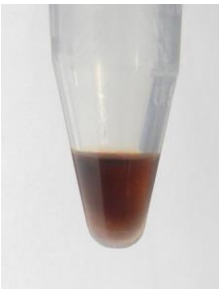
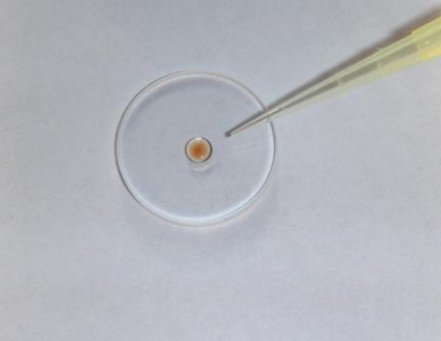
Es konnte festgestellt werden, dass die Selenmessung mittels TRXF aus DBS gleichwertig zur Selenbestimmung im Serum ist, wenn eine Auflösung der DBS-Stanzen nach dem hier entwickelten Protokoll durch HCl erfolgt.



#### 4.4 Zusammenfassung der Arbeitsschritte der HCl-basierten Methode

In Tabelle 9 sind die Arbeitsschritte der neu entwickelten HCl-basierten Methode noch einmal bebildert zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Arbeitsschritte der neu entwickelten HCl-basierten Methode

	<p>Vollblut auf Kreis einer Protein Saver™ 903® Card tropfen und mindestens zwei Stunden trocknen</p>
	<p>nach dem Trocknen der Karten einen mit Blut durchtränkten, 5,5 mm durchmessenden Kreis ausstanzen</p> <p>Zugabe von 141 µl 37%iger Salzsäure zu einer Stanze mit getrocknetem Blut in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß</p> <p>1 Stunde bei Raumtemperatur einwirken lassen</p>
	<p>Probe anschließend einige Sekunden im Vortex-Mixer schütteln</p> <p>Zentrifugieren bei Raumtemperatur für zwei Minuten und 12.000 rpm</p>
	<p>80 µl faserfreien Überstand abpipettieren und in ein 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen</p> <p>Zugabe von 8 µl Galliumstandard der Konzentration 5000µg/l; gründlich homogenisieren</p> <p>8 µl der Lösung auf eine Quarzplatte geben, bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden trocknen</p> <p>Messung im Auftisch-TXRF-Gerätes S2 Picofox; aufgrund des Mischungsverhältnisses von Probe und Galliumstandard Ergebnisse mit Faktor 10 multiplizieren</p>

## 5 Ergebnisse der Untersuchung von Kinder und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose und Kleinwuchs

Die Ergebnisse werden getrennt für die Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose und die Gruppe der Patienten mit Kleinwuchs vorgestellt.

Die beiden untersuchten Gruppen wurden zusätzlich entsprechend unterschiedlicher kindlicher Entwicklungsstufen (82) in drei verschiedene Altersgruppen unterteilt: Ende 1. bis Ende 5. Lebensjahr (Kleinkindalter), 6. Lebensjahr bis Ende 13. Lebensjahr (Schulalter), 14. bis Ende 18. Lebensjahr (Adoleszenz). Die zugrundeliegenden Referenzwerte für die Schilddrüsenhormone, die untersuchten Spurenelemente und IGF-1 sind in der Tabelle 10 dargestellt (63) (83) (17). Die Referenzwerte für die Schilddrüsenhormone entstammen dem Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie am Campus Virchow Klinikum der Charité.

**Tabelle 10:** Referenzwerte der untersuchten Parameter gemäß (63) (83) (17), Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie am Campus Virchow Klinikum der Charité

<b>Selen</b>	Kleinkinder	58-116 µg/l	<b>Kupfer</b>	1-5 Jahre	800-1500 µg/l
	Schulkinder	69-121 µg/l		6-9 Jahre	840-1360 µg/l
	Erwachsene	74-139 µg/l		10-13 Jahre	800-1210 µg/l
<b>TSH basal</b>	1-5 Jahre	0,4-3,8 mU/l		14-19 Jahre	640-1170 µg/l
	>5 Jahre	0,3-4 mU/l			
<b>T4</b>	1-5 Jahre	7-14 µg/dl	<b>IGF-1</b>	2 Monate-5 Jahre	20-250 ng/ml
	>5 Jahre	6,2-14 µg/dl		6-8 Jahre	100-476 ng/ml
<b>fT4</b>		0,7-1,9 ng/dl		9-10 Jahre	110-600 ng/ml
<b>T3</b>	1-5 Jahre	0,96-2,39 µg/l		11-15 Jahre	250-1100 ng/ml
	>5 Jahre	1-2,16 µg/l		16-55 Jahre	125-460 ng/ml

Im Folgenden wurde die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen bzw. dem Wachstumsfaktor IGF-1 auch getrennt für die Altersgruppen vorgenommen, falls sich zwischen diesen Altersgruppen Unterschiede in den untersuchten Parametern fanden. Gleiches galt für die Geschlechter.

## 5.1 Untersuchung der Gruppe mit konnataler Hypothyreose

Als Hauptziel dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Schilddrüsenhormonen und den essentiellen Spurenelementen Se und Cu sowie einem Quotienten aus Cu und Se besteht. Hierfür wurde eine Gruppe von Kindern mit konnataler Hypothyreose untersucht. Tabelle 11 gibt zunächst einen Überblick über die untersuchte Gruppe.

**Tabelle 11:** Übersicht der Patienten mit konnataler Hypothyreose

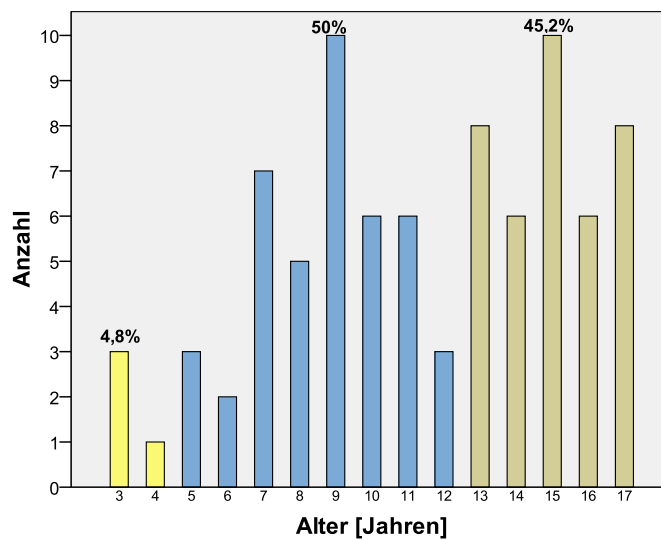
Angegeben sind die Anzahl der Patienten mit verfügbaren Werten (n), Minimum und Maximum der Werte sowie Mittelwert und in Klammern die Standardabweichung

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert (Standardabweichung)
<b>Alter [Jahre]</b>	84	3,0	17,0	11,3 (±3,9)
<b>Se [µg/l]</b>	84	33,0	148,0	69,2 (±17,4)
<b>Cu [µg/l]</b>	84	747,8	2587,8	1384,2 (±388,8)
<b>Cu/Se-Quotient</b>	84	8,3	46,4	21,0 (±7,5)
<b>TSH basal [mU/l]</b>	84	0,0	285,3	8,9 (±32,1)
<b>T4 [µg/dl]</b>	44	0,8	24,9	11,3 (±3,6)
<b>fT4 [ng/dl]</b>	44	0,4	2,3	1,4 (±0,4)
<b>T3 [µg/l]</b>	29	0,5	2,3	1,5 (±0,3)
<b>T4/T3-Quotient</b>	27	0,5	10,6	7,5 (±2,0)

Insgesamt wurden 84 Patienten in die Gruppe eingeschlossen. Es waren jedoch nur von 44 Patienten die Werte von T4 sowie von fT4, von 29 Patienten die T3-Werte und der T4/T3-Quotient von 27 Patienten verfügbar.

In der untersuchten Gruppe setzte sich die Geschlechterverteilung wie folgt zusammen: 60 Patienten (71%) waren weiblich und 24 (29%) waren männlich. Dies entspricht der bekannten Verteilung der Inzidenz der konnatalen Hypothyreose, in der Mädchen doppelt so häufig betroffen sind wie Jungen (35).

Ebenso waren nicht in allen Altersgruppen gleich viele Patienten vertreten, wie in Abbildung 5 ersichtlich. Das Durchschnittsalter betrug 11,3 ( $\pm 3,9$ ) Jahre. Die 5- bis 12-Jährigen bildeten die größte Gruppe (50%), gefolgt von den 13- bis 17-Jährigen (45,2%). Nur 4 Patienten (4,8%) der Gruppe waren im Kleinkindalter.

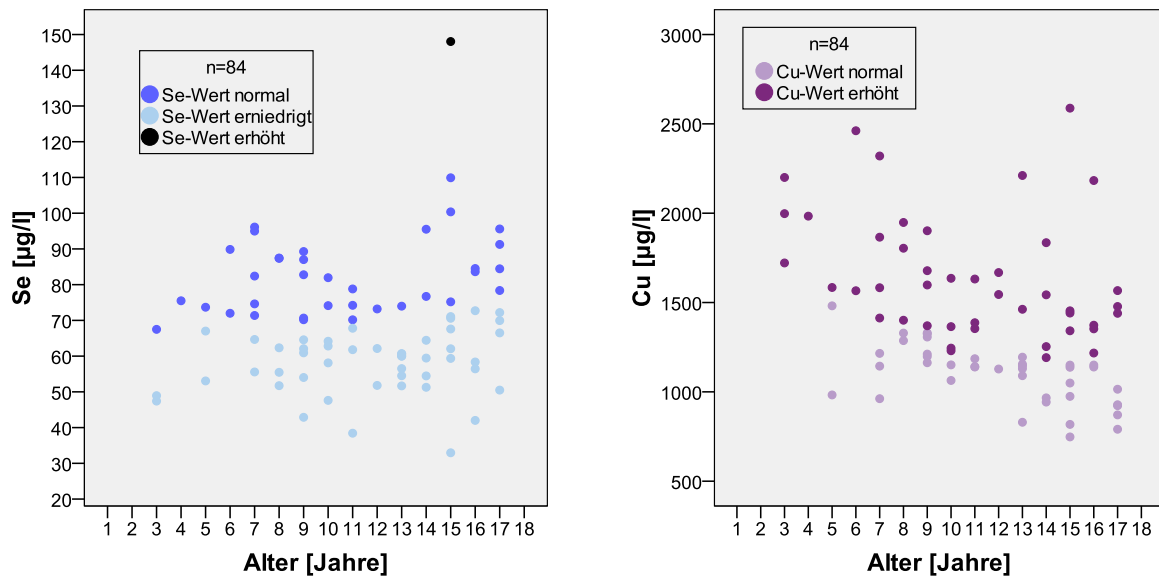


**Abb. 5:** Altersverteilung in der Hypothyreosegruppe

Dargestellt sind die Anzahl der Patienten eines bestimmten Alters sowie die prozentuale Verteilung der Patienten in den verschiedenen Alterskategorien in der Gruppe der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose. 1- bis 4-Jährige sind gelb gekennzeichnet, 5- bis 12-Jährige blau und 13- bis 17-Jährige beige; (n=84).

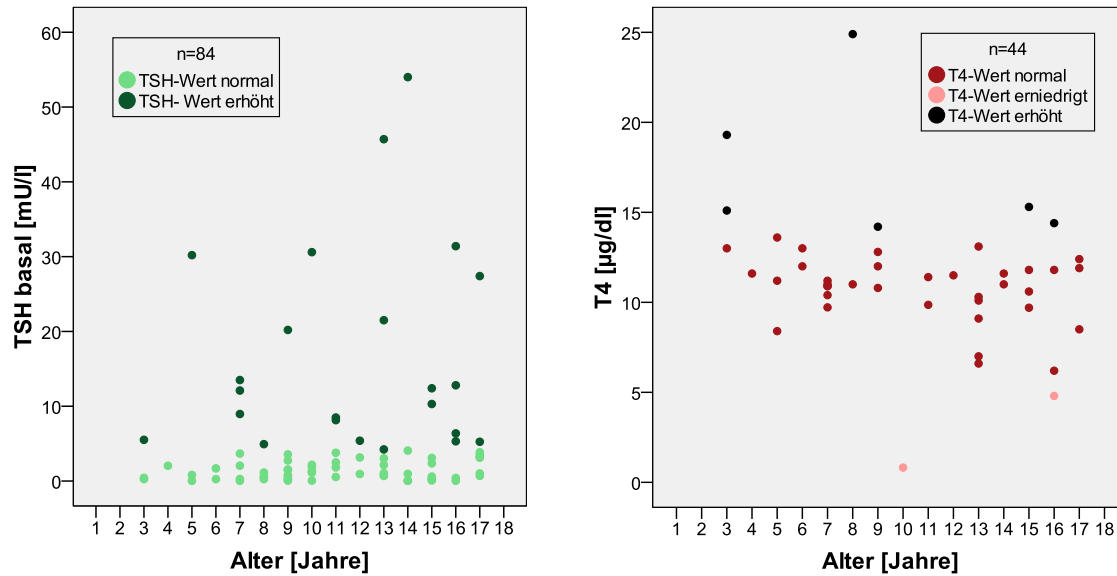
### 5.1.1 Auffälligkeiten der Spurenelemente und Schilddrüsenhormone

Im Folgenden werden die Auffälligkeiten der Spurenelement- und Schilddrüsenhormonversorgung dargestellt. Die Abbildungen 6 bis 8 zeigen die einzelnen Werte der Schilddrüsenhormone und der untersuchten Spurenelemente für jeden Patienten.



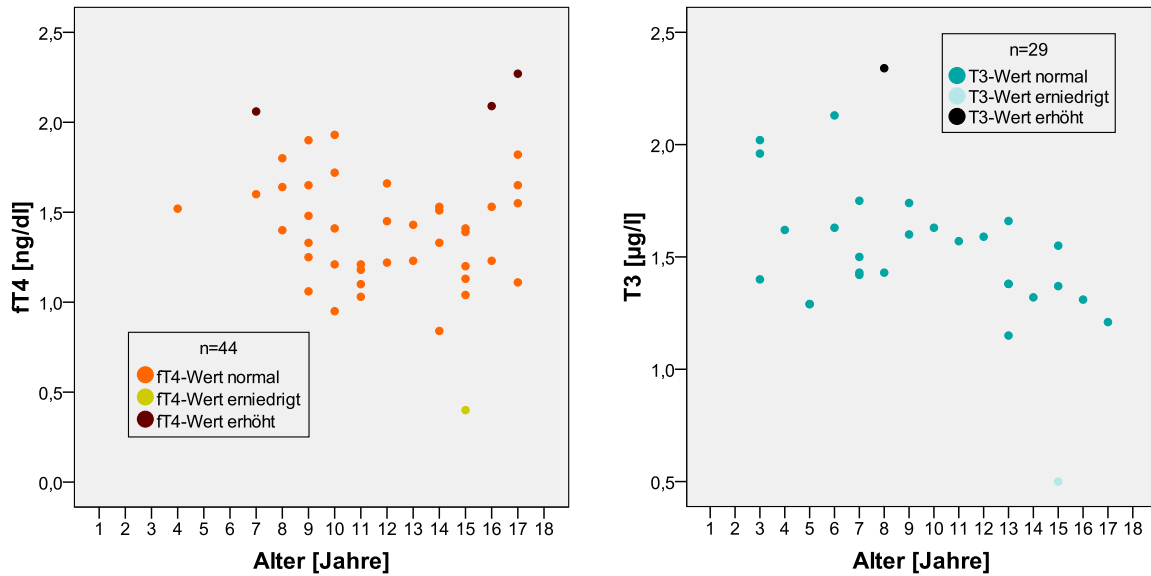
**Abb. 6:** Darstellung der Se- und Cu-Werte in der Gruppe der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose

Angegeben sind das Alter und der entsprechende Se- bzw. Cu-Wert für jeden einzelnen Patienten. Für alle 84 untersuchten Patienten waren die Se- und Cu-Werte verfügbar. Wie in der linken Graphik erkennbar, lagen viele der untersuchten Kinder unterhalb des Referenzwerts und sind damit als selenarm einzustufen. In der rechten Graphik zeigt sich eine eindeutige Tendenz hin zu eher erhöhten Kupferkonzentrationen bei den untersuchten Kindern.



**Abb. 7:** Darstellung der TSH- und T4-Werte in der Gruppe der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose

Angegeben sind das Alter und der entsprechende TSH- bzw. T4 Wert für jeden einzelnen Patienten. Ein Patient im Alter von 15 Jahren mit einem TSH-Wert von 285,3 mU/l ist in der linken Graphik nicht dargestellt. Für alle 84 untersuchten Patienten waren die TSH-Werte verfügbar. T4-Werte waren nur von 44 Patienten verfügbar. Wie erwartet für die Hypothyreosegruppe waren viele TSH-Werte deutlich erhöht im Vergleich zum Referenzintervall. Nur zwei Patienten der Hypothyreosegruppe wiesen einen T4-Wert unterhalb des Referenzwertes auf.



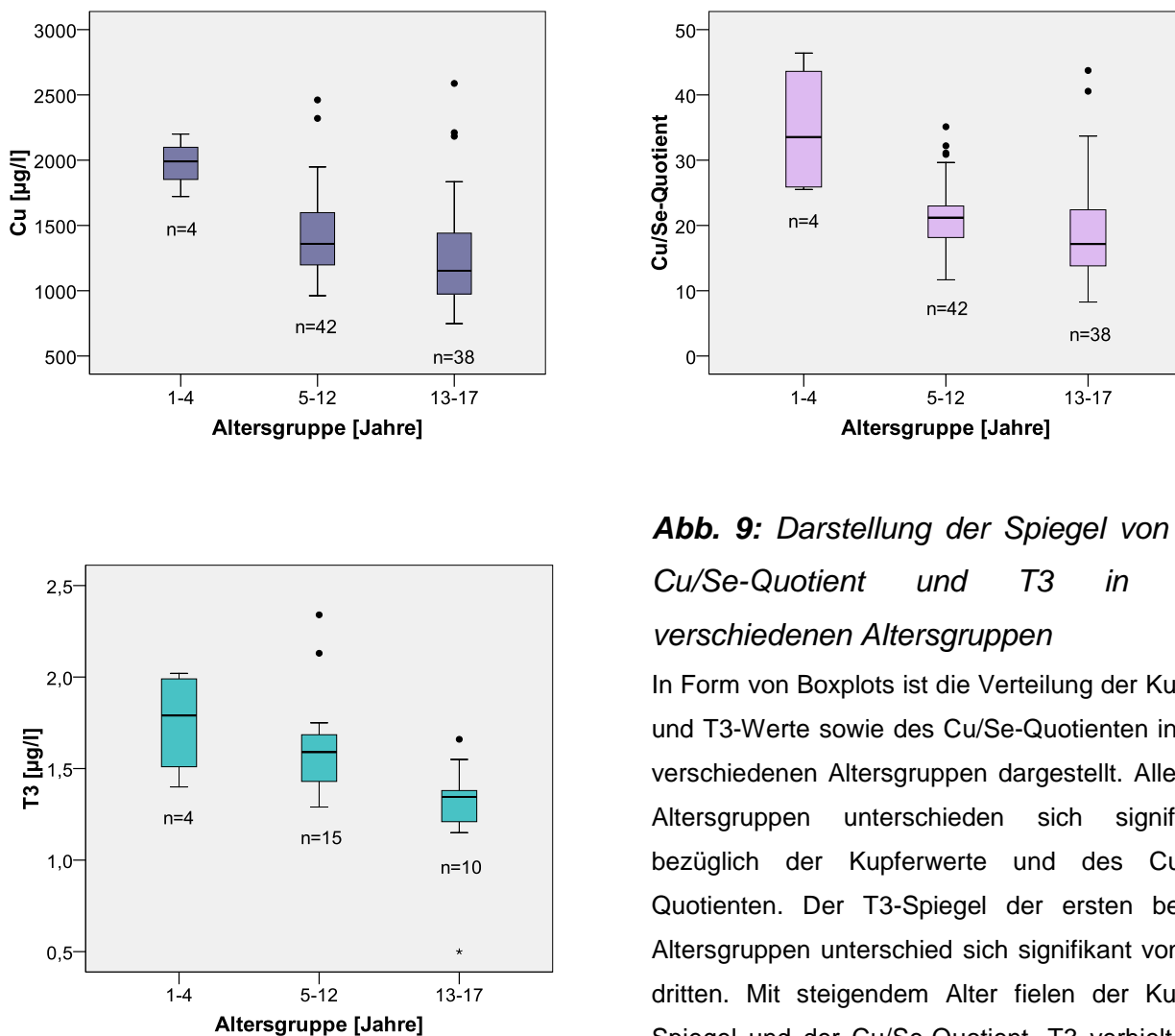
**Abb. 8:** Darstellung der fT4-Werte und T3-Werte in der Gruppe der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose

Angegeben sind das Alter und der entsprechende fT4- bzw. T3-Wert für jeden einzelnen Patienten. Für 44 der 84 untersuchten Patienten waren fT4-Werte verfügbar. T3-Werte waren nur von 29 der 84 untersuchten Patienten verfügbar. Die Graphiken zeigen, dass jeweils nur ein Patient der Hypothyreosegruppe einen Wert von fT4 bzw. T3 unterhalb des Referenzwertes aufwies.

Bei keinem der Patienten bestand eine Unterversorgung mit Cu. Bei 44 Patienten (52,4%) fanden sich sogar erhöhte Kupferwerte. Bezüglich der Selenversorgung waren 48 Patienten (57,1%) als unterversorgt einzustufen. Nur bei einem Patienten lag der Selenspiegel über dem Referenzwert. Die Versorgung der untersuchten Gruppe mit Schilddrüsenhormonen sah wie folgt aus: Drei Patienten zeigten eine manifeste Hypothyreose, die sich darstellt als eine Erhöhung des TSH-Werts in Kombination mit einer Erniedrigung von T4, fT4 oder T3. Bei zwei dieser Patienten lag außerdem ein Selenmangel vor. Bei einem von diesen zwei Patienten zeigte sich zusätzlich ein erhöhter Kupferspiegel. Eine isolierte Erhöhung der TSH-Werte fand sich bei 21 Patienten. Bei ihnen lag nach Definition eine Hyperthyreotropinämie vor (37). Von den Patienten mit Hyperthyreotropinämie hatten 14 (66,7%) einen Selenmangel, von diesen 14 Patienten hatten 50% gleichzeitig erhöhte Kupferwerte. 23,8% der Patienten mit Hyperthyreotropinämie zeigten eine isolierte Erhöhung der Kupferwerte. Inwieweit die ermittelten Werte von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen zusammenhängen, wurde im weiteren Verlauf untersucht.

### 5.1.2 Unterschiede zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Altersgruppen

Zwischen den Geschlechtern bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Schilddrüsenhormon- und Spurenelementversorgung, sowie hinsichtlich des Alters. Hingegen unterschieden sich alle drei Altersgruppen bezüglich der Kupferwerte und des Cu/Se-Quotienten. Ferner unterschied sich der T3-Spiegel der ersten beiden Altersgruppen von der dritten. Die Werte von Cu, dem Cu/Se-Quotienten und von T3 sind für die verschiedenen Altersgruppen in Abbildung 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Darstellung der Spiegel von Cu, Cu/Se-Quotient und T3 in den verschiedenen Altersgruppen

In Form von Boxplots ist die Verteilung der Kupfer- und T3-Werte sowie des Cu/Se-Quotienten in den verschiedenen Altersgruppen dargestellt. Alle drei Altersgruppen unterschieden sich signifikant bezüglich der Kupferwerte und des Cu/Se-Quotienten. Der T3-Spiegel der ersten beiden Altersgruppen unterschied sich signifikant von der dritten. Mit steigendem Alter fielen der Kupfer-Spiegel und der Cu/Se-Quotient. T3 verhielt sich gleichsinnig. Für Cu und den Cu/Se-Quotienten: n=84, für T3: n=29.



Man erkennt deutlich, dass mit steigendem Alter der Kupferspiegel und damit der Cu/Se-Quotient abnahm. Genauso verhielt es sich beim T3-Spiegel. Ob hier eine signifikante Verbindung vorliegt, sollte im Folgenden überprüft werden.

### 5.1.3 Zusammenhänge von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen

Tabelle 12 zeigt wie sich die Zusammenhänge zwischen den Spurenelementen und den Schilddrüsenhormonen in der gesamten Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose verhielten.

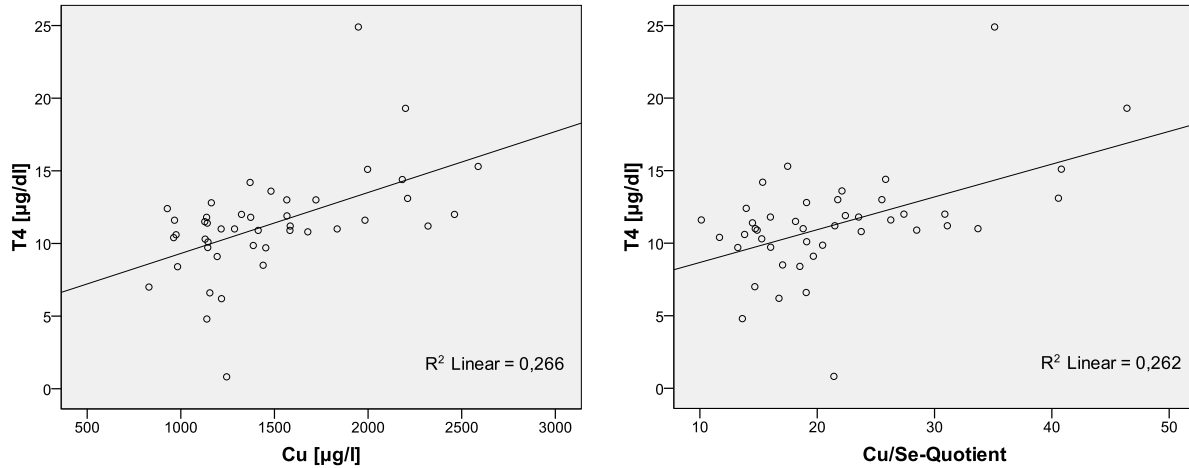
**Tabelle 12:** Korrelationen in der gesamten Gruppe

Die Korrelationstestung erfolgte mittels Korrelation nach Pearson. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  angenommen (\*), als hochsignifikant gelten Werte  $\leq 0,01$  (\*\*).

	TSH basal <i>n=84</i>	T4 <i>n=44</i>	ft4 <i>n=44</i>	T3 <i>n=29</i>	T4/T3-Quotient <i>n=27</i>
<b>Se</b>	-0,1 (p=0,45)	0,0 (p=0,97)	0,2 (p=0,32)	-0,1 (p=0,74)	0,2 (p=0,30)
<b>Cu</b>	-0,2 (p=0,06)	0,5** (p=0,00)	0,0 (p=0,85)	0,6** (p=0,00)	0,3 (p=0,11)
<b>Cu/Se-Quotient</b>	-0,1 (p=0,23)	0,5** (p=0,00)	-0,1 (p=0,52)	0,6** (p=0,00)	0,2 (p=0,27)

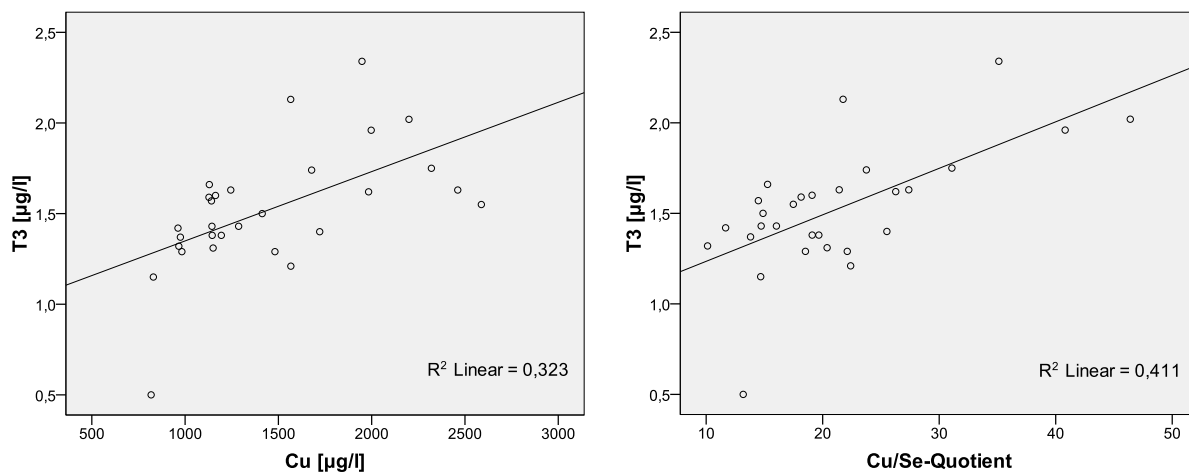
Es bestanden hochsignifikante positive Korrelationen zwischen Cu und T4, Cu und T3, dem Cu/Se-Quotienten und T4, sowie dem Cu/Se-Quotienten und T3. Für Se allein bestand hingegen keine signifikante Korrelation mit den untersuchten Schilddrüsenhormonen.

Für die ermittelten signifikanten Korrelationen ist der angenommene lineare Zusammenhang in den Abbildungen 10 und 11 graphisch dargestellt:



**Abb. 10:** Zusammenhang von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T4

Dargestellt sind der Zusammenhang von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T4, sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Sowohl Cu als auch der Cu/Se-Quotient korrelierten positiv mit T4:  $r=0,5^{**}$  ( $p=0,00$ ). Es wurde ein linearer Zusammenhang angenommen.



**Abb. 11:** Zusammenhang von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T3

Dargestellt sind der Zusammenhang von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T3, sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Sowohl Cu als auch der Cu/Se-Quotient korrelieren positiv mit T3:  $r=0,6^{**}$  ( $p=0,00$ ). Es wurde ein linearer Zusammenhang angenommen.

#### 5.1.4 Zusammenhänge von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen in den verschiedenen Altersgruppen

Da sich die Altersgruppen hinsichtlich des Spiegels von T3, Cu und des Cu/Se-Quotienten unterschieden, sollte im Folgenden getestet werden, ob die signifikanten Korrelationen jeweils auch innerhalb der einzelnen Altersgruppen zu finden sind. Für die Kinder von 1 bis 4 Jahren erfolgte jedoch aufgrund der geringen Gruppengröße keine Korrelationstestung. Nur vier Patienten waren in dieser Gruppe vertreten und nur für einen dieser Patienten lag ein Wert für fT4 vor. Für die anderen beiden Altersgruppen sind die Beziehungen in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13:** Korrelationstestung in den Altersgruppen

Die Korrelationstestung erfolgte mittels Korrelation nach Pearson. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  angenommen (\*), als hochsignifikant gelten Werte  $\leq 0,01$  (\*\*).

		TSH basal	T4	fT4	T3	T4/T3-Quotient
		n=42	n=21	n=23	n=15	n=15
5-12 Jahre	Se	-0,1 (p=0,53)	0,0 (p=0,97)	0,2 (p=0,47)	-0,2 (p=0,44)	0,1 (p=0,75)
	Cu	-0,1 (p=0,38)	0,4 (p=0,12)	0,0 (p=0,99)	0,5 (p=0,06)	0,2 (p=0,56)
	Cu/Se- Quotient	-0,1 (p=0,61)	0,4 (p=0,07)	-0,2 (p=0,44)	0,7** (p=0,01)	0,2 (p=0,55)
		n=38	n=19	n=20	n=10	n=8
13-17 Jahre	Se	-0,1 (p=0,50)	0,3 (p=0,19)	0,1 (p=0,55)	0,4 (p=0,29)	0,7 (p=0,07)
	Cu	-0,2 (p=0,20)	0,6** (p=0,00)	-0,1 (p=0,58)	0,4 (p=0,21)	0,7 (p=0,06)
	Cu/Se- Quotient	-0,1 (p=0,47)	0,4 (p=0,13)	-0,1 (p=0,67)	0,2 (p=0,53)	0,2 (p=0,65)

Es wird deutlich, dass die zuvor gefundenen Korrelationen nicht für alle Altersgruppen gleichermaßen zutrafen. Bei den Kindern zwischen 5 und 12 Jahren bestand lediglich eine hochsignifikante Verbindung zwischen dem Cu/Se-Quotienten und T3.

Bei Kindern zwischen 13 und 16 Jahren bestand hingegen ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Cu und T4. Die zuvor in der gesamten untersuchten Gruppe gefundenen signifikanten Verbindungen des Cu/Se-Quotienten mit T4 und von Cu mit T3 fanden sich in keiner der untersuchten Altersgruppen. Hier ist allerdings einschränkend anzumerken, dass in dieser Altersbetrachtung die Gruppengrößen deutlich reduziert sind im Vergleich zur zuvor präsentierten statistischen Analyse.

## 5.2 Untersuchung der Gruppe mit Kleinwuchs

Auch in dieser Gruppe sollte untersucht werden, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Schilddrüsenhormonen und den essentiellen Spurenelementen Se und Cu sowie einem Quotienten aus Cu und Se besteht. Ferner sollte die Beziehung zwischen den genannten Spurenelementen und dem Wachstumsfaktor IGF 1 untersucht werden. Tabelle 14 gibt zunächst einen Überblick über die untersuchte Gruppe.

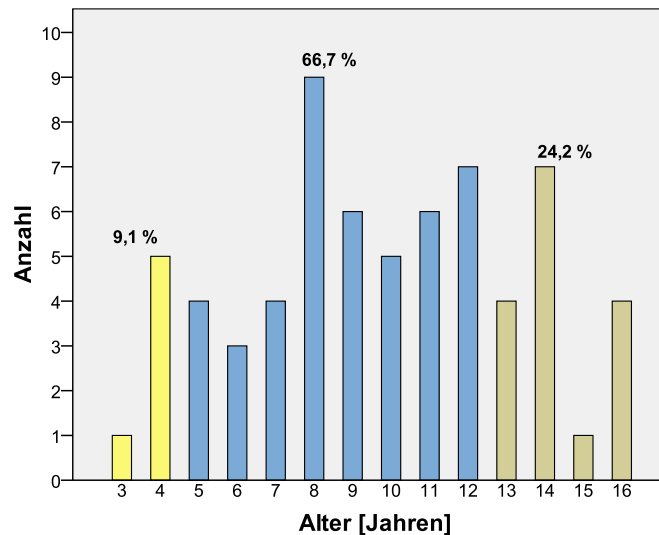
**Tabelle 14:** Übersicht der Patienten in der Gruppe mit Kleinwuchs

Angegeben sind die Anzahl der Patienten mit verfügbaren Werten (n), Minimum und Maximum der Werte sowie Mittelwert und in Klammern die Standardabweichung.

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert (Standardabweichung)
<b>Alter [Jahre]</b>	66	3,0	16,0	9,8 (±3,5)
<b>Se [µg/l]</b>	66	38,9	122,6	78,8 (±16,9)
<b>Cu [µg/l]</b>	66	1049,3	6093,7	1903,7 (±1083,5)
<b>Cu/Se-Quotient</b>	66	12,7	95,0	25,0 (±15,7)
<b>TSH basal [mU/l]</b>	66	0,3	3,6	2,2 (±0,8)
<b>T4 [µg/dl]</b>	20	5,8	13,2	9,7 (±1,9)
<b>fT4 [ng/dl]</b>	29	0,7	1,5	1,0 (±0,2)
<b>T3 [µg/l]</b>	14	1,2	1,9	1,5 (±0,2)
<b>T4/T3-Quotient</b>	9	4,3	8,3	6,3 (±1,4)
<b>IGF-1 [ng/ml]</b>	66	25,0	614,0	222,9 (±157,1)

Insgesamt wurden 66 Patienten in die Gruppe eingeschlossen. Verfügbar waren jedoch nur die T4-Werte von 20 Patienten, die Werte von fT4 von 29 Patienten und die T3-Werte von 14 Patienten, sowie von neun Patienten der T4/T3-Quotient. Die Geschlechterverteilung war auch in dieser Gruppe nicht gleich. 29 Patienten (43,9%) waren weiblich und 37 (56,1%) waren männlich.

Ebenso findet sich keine homogene Altersverteilung wie in Abbildung 12 ersichtlich. Die 5- bis 12-Jährigen bildeten auch hier die größte Gruppe (66,7%), gefolgt von den 13- bis 17-Jährigen (24,2%). Nur sechs Patienten (9,1%) der Gruppe waren im Kleinkindalter. Das durchschnittliche Alter lag bei 9,8 ( $\pm 3,5$ ) Jahren.

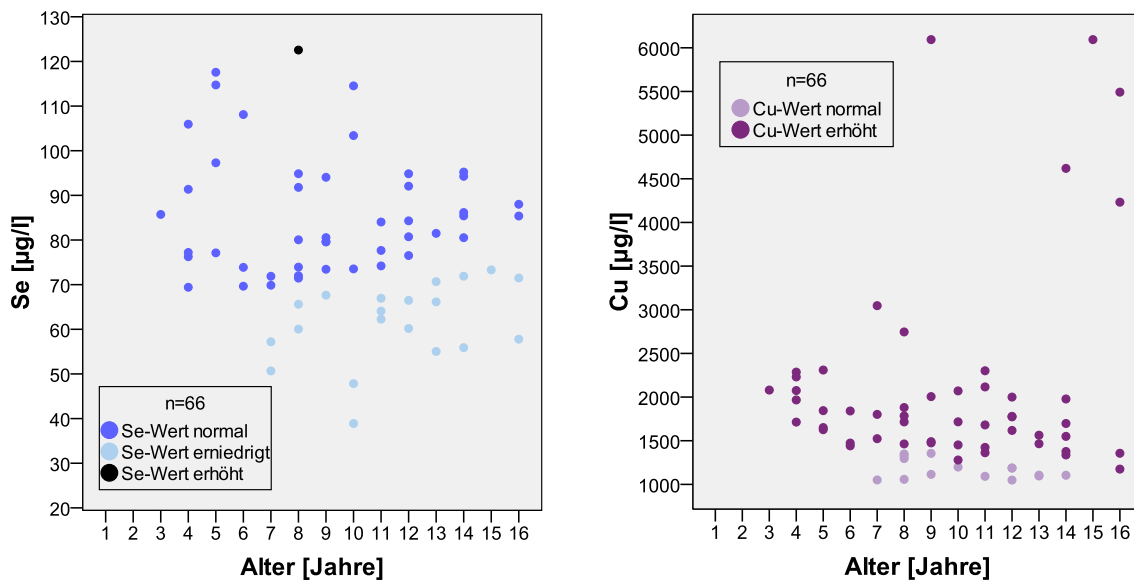


**Abb. 12:** Altersverteilung in der Gruppe mit Kleinwuchs

Dargestellt sind die Anzahl der Patienten eines bestimmten Alters sowie die prozentuale Verteilung der Patienten in den verschiedenen Alterskategorien in der Gruppe der Patienten mit Kleinwuchs. 1- bis 4-Jährige sind gelb gekennzeichnet, 5- bis 12-Jährige blau und 13- bis 17-Jährige beige; (n= 66).

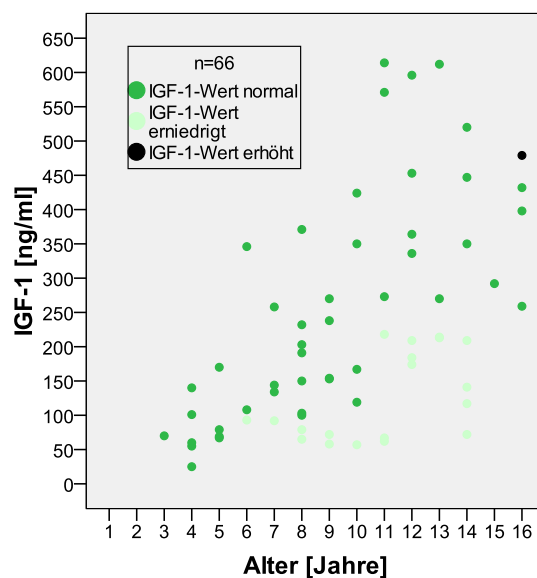
### 5.2.1 Auffälligkeiten der Spurenelemente und des IGF-1-Spiegels

Im Folgenden soll auch hier gezeigt werden, welche Auffälligkeiten in der Gruppe bestehen. Die Spurenelementversorgung und der IGF-1-Spiegel sind für jeden Patienten in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Auf eine Darstellung der Schilddrüsenhormone wurde verzichtet, da Patienten mit auffälligen Schilddrüsenwerten in dieser Gruppe ausgeschlossen wurden.



**Abb. 13:** Darstellung der Se- und Cu-Werte in der Gruppe mit Kleinwuchs

Angegeben sind das Alter und der entsprechende Se- bzw. Cu-Wert für jeden einzelnen Patienten. Für alle 66 untersuchten Patienten waren Selen- und Kupfer-Werte verfügbar. Wie die linke Graphik zeigt, lagen viele der untersuchten Kinder unterhalb des Referenzwerts und sind damit als selenarm einzustufen. In der rechten Graphik zeigt sich eine eindeutige Tendenz hin zu eher erhöhten Kupferkonzentrationen bei den untersuchten Kindern.



**Abb. 14:** Darstellung der IGF-1-Werte in der Gruppe mit Kleinwuchs

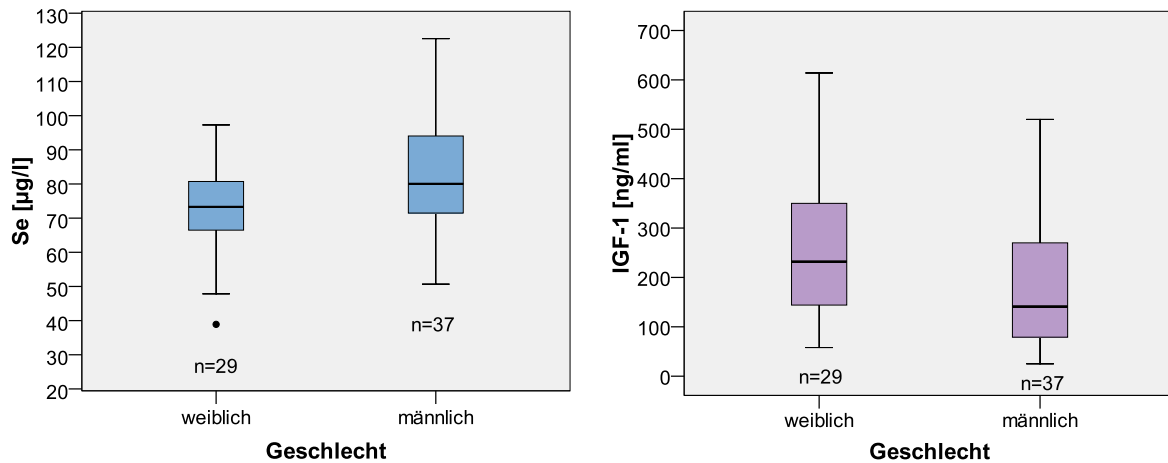
Angegeben sind das Alter und der entsprechende IGF-1-Wert für jeden einzelnen Patienten. Für alle 66 untersuchten Patienten waren IGF-1-Werte verfügbar. Einige der untersuchten Patienten zeigten IGF-1-Werte unterhalb des Referenzbereiches.

Die Versorgung mit den untersuchten Spurenelementen stellte sich ähnlich dar wie in der Gruppe der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose. Ein Kupfermangel war auch in dieser Gruppe nicht festzustellen. Hier zeigten sogar 77,3% Kupferwerte oberhalb des Referenzwertes. Eine Unterversorgung mit Se zeigten 20 Patienten (30,3%). Nur ein Patient zeigte einen Selen Spiegel oberhalb des Referenzbereichs. Betrachtet man den IGF-1-Spiegel der untersuchten Gruppe finden sich bei 19 Patienten (28,8%) Werte unterhalb des Referenzbereichs. Von diesen Patienten zeigten fünf gleichzeitig einen Selenmangel und 16 Patienten eine Kupfererhöhung. Ein Patient zeigte sogar einen IGF-1-Wert oberhalb des Referenzbereiches, zeitgleich mit einem Selenmangel und einer Kupfererhöhung.

### **5.2.2 Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern**

Bevor der Frage nachgegangen wurde, ob signifikante Beziehungen zu beobachten sind, sollte auch hier zunächst getestet werden, ob ein Unterschied zwischen den verschiedenen Altersgruppen und Geschlechtern bezüglich der Konzentrationen von Spurenelementen, Schilddrüsen- und Wachstumshormonen besteht.

Es zeigte sich zwischen den Geschlechtern und den verschiedenen Altersgruppen ein signifikanter Unterschied im IGF1-Spiegel. Ferner unterschieden sich männliche und weibliche Patienten hinsichtlich der Selenversorgung. Die Werte von Selen und IGF-1 sind in der Abbildung 15 getrennt für weibliche und männliche Patienten dargestellt.

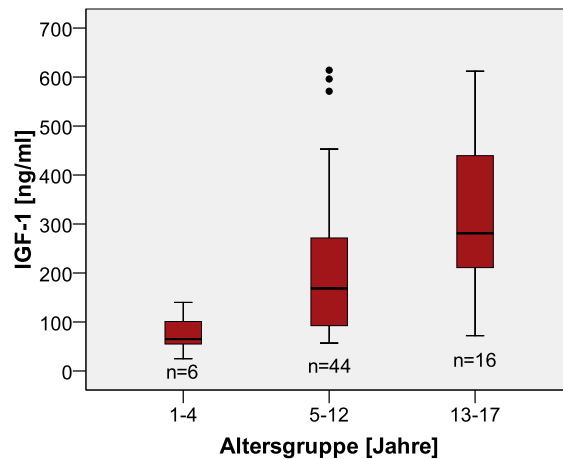


**Abb. 15:** Darstellung der Se- und IGF-1-Werte bei weiblichen und männlichen Patienten

In Form von Boxplots ist die Verteilung der Se- und IGF-1-Werte bei den weiblichen und männlichen Patienten dargestellt (n=66). Die weiblichen Patienten wiesen signifikant niedrigere Selen- und höhere IGF-1-Werte als die männlichen Patienten auf.

Die männlichen Patienten (Mittelwert: 83,5 µg/l ( $\pm 17,9$ )) waren besser mit Se versorgt als die weiblichen (Mittelwert: 72,8 µg/l ( $\pm 13,7$ )). Wohingegen die IGF-1- Spiegel bei den weiblichen Patienten höher lagen. Die Werte von IGF-1 sind in der Abbildung 16 getrennt für die drei Altersgruppen dargestellt. Man erkennt deutlich, dass mit steigendem Alter höhere IGF-1-Spiegel auftraten.





**Abb. 16:** Darstellung der IGF-1-Werte in den verschiedenen Altersgruppen

In Form von Boxplots ist die Verteilung der IGF-1-Werte in den verschiedenen Altersgruppen dargestellt (n=66). Alle Altersgruppen unterschieden sich signifikant hinsichtlich dieses Parameters. Mit steigendem Alter traten höhere IGF-1-Spiegel auf.

### 5.2.3 Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen

Tabelle 15 zeigt nun die Zusammenhänge von den untersuchten Spurenelementen und den Schilddrüsenhormonen sowie dem Wachstumsfaktor IGF-1 in der gesamten Gruppe.

**Tabelle 15:** Korrelationstestung in der gesamten Gruppe

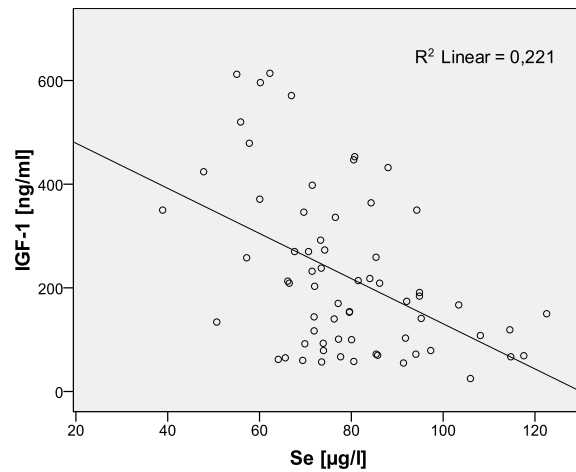
Die Korrelationstestung erfolgte mittels Korrelation nach Pearson. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  angenommen (\*), als hochsignifikant gelten Werte  $\leq 0,01$  (\*\*).

	TSH basal n=66	T4 n=20	fT4 n=29	T3 n=14	T4/T3-Quotient n=9	IGF-1 n=66
<b>Se</b>	0,1 (p=0,28)	0,0 (p=1,00)	0,3 (p=0,12)	-0,2 (p=0,43)	0,3 (p=0,36)	-0,5** (p=0,00)
<b>Cu</b>	0,0 (p=0,73)	0,0 (p=0,88)	0,2 (p=0,31)	-0,1 (p=0,85)	0,3 (p=0,48)	-0,1 (p=0,32)
<b>Cu/Se- Quotient</b>	0,0 (p=0,90)	-0,1 (p=0,65)	0,1 (p=0,62)	0,0 (p=0,95)	0,2 (p=0,57)	0,0 (p=0,75)

Von den untersuchten Spurenelementen bzw. ihrem Quotienten zeigte nur Se eine negative hochsignifikante Korrelation mit dem Wachstumsfaktor IGF-1. Zwischen den

Schilddrüsenhormonen und den Spurenelementen konnte bei den kleinwüchsigen Kindern keine signifikante Verbindung nachgewiesen werden.

Die Abbildung 17 stellt diese Beziehung zwischen Se und IGF-1 graphisch dar.



**Abb. 17:** Zusammenhang von Se und IGF-1

Dargestellt sind der Zusammenhang von Se und IGF-1, sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Se korreliert negativ mit IGF-1:  $r=-0,5^{**}$  ( $p=0,00$ ). Es wurde ein linearer Zusammenhang angenommen.

## 5.2.4 Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen in den verschiedenen Altersgruppen

Da sich gezeigt hatte, dass sich die Altersgruppen hinsichtlich des IGF-1-Spiegels unterschieden, wurde getestet, ob die signifikante Korrelation jeweils auch in den verschiedenen Altersgruppen zu finden ist. Jedoch stellte sich auch hier das Problem der geringen Gruppengröße dar. Für Kinder von 1-4 Jahre konnte keine differenzierte Betrachtung erfolgen, da die Gruppe lediglich sechs Patienten umfasste, von denen nur für zwei bzw. drei Patienten Werte für T4, T4/T3-Quotient, fT4 und T3 vorlagen. Zwar umfasste die Gruppe der Adoleszenten 16 Patienten, jedoch waren auch hier nur für zwei Patienten ein T3-Wert und der T4/T3-Quotient verfügbar. Daher erfolgte eine gesonderte Korrelationstestung nur für Kinder von 5-12 Jahre welche in Tabelle 16 dargestellt ist.

**Tabelle 16:** Korrelationstestung in den Altersgruppen

Die Korrelationstestung erfolgte mittels Korrelation nach Pearson. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  angenommen (\*), als hochsignifikant gelten Werte  $\leq 0,01$  (\*\*).

		TSH basal	T4	fT4	T3	T4/T3- Quotient	IGF-1
		<i>n=44</i>	<i>n=13</i>	<i>n=19</i>	<i>n=10</i>	<i>n=5</i>	<i>n=44</i>
5-12 Jahre	Se	0,1 (p=0,36)	-0,2 (p=0,54)	0,2 (p=0,53)	-0,3 (p=0,34)	0,3 (p=0,65)	-0,5** (p=0,00)
	Cu	-0,1 (p=0,73)	0,3 (p=0,26)	0,1 (p=0,59)	0,0 (p=0,98)	0,8 (p=0,12)	-0,3* (p=0,05)
	Cu/Se- Quotient	-0,1 (p=0,47)	0,6 (p=0,05)	0,1 (p=0,75)	0,1 (p=0,73)	0,8 (p=0,08)	-0,1 (p=0,51)

Die signifikante Beziehung zwischen Se und dem Wachstumsfaktor IGF-1 war auch bei den 5- bis 12-Jährigen nachzuweisen. Ferner fand sich bei den 5- bis 12-Jährigen eine schwache, negative signifikante Korrelation von Kupfer und IGF-1.

## 5.2.5 Zusammenhänge von Spurenelementen mit IGF-1 und den Schilddrüsenhormonen getrennt nach Geschlechtern

Da sich die männlichen und weiblichen Probanden hinsichtlich des Selenspiegels unterschieden, wurden die Korrelationen auch getrennt nach Geschlechtern betrachtet und in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Korrelationstestung aufgeteilt nach Geschlechtern

Die Korrelationstestung erfolgte mittels Korrelation nach Pearson. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  angenommen (\*), als hochsignifikant gelten Werte  $\leq 0,01$  (\*\*). ♀=weiblich, ♂=männlich

		TSH basal	T4	fT4	T3	T4/T3-Quotient	IGF-1
		n=29	n=8	n=13	n=8	n=4	n=29
♀	<b>Se</b>	0,1 (p=0,55)	0,0 (p=0,95)	0,5 (p=0,10)	-0,5 (p=0,19)	0,8 (p=0,17)	-0,6** (p=0,00)
	<b>Cu</b>	0,0 (p=0,82)	0,2 (p=0,60)	0,3 (p=0,38)	-0,2 (p=0,64)	0,4 (p=0,60)	-0,2 (p=0,23)
	<b>Cu/Se-Quotient</b>	0,0 (p=0,99)	0,2 (p=0,63)	0,1 (p=0,86)	-0,1 (p=0,79)	0,3 (p=0,71)	-0,1 (p=0,70)
		n=37	n=12	n=16	n=6	n=5	n=37
♂	<b>Se</b>	0,12 (p=0,48)	-0,01 (p=0,97)	0,1 (p=0,71)	0,1 (p=0,86)	-0,2 (p=0,71)	-0,3* (p=0,05)
	<b>Cu</b>	0,04 (p=0,84)	-0,18 (p=0,58)	0,2 (p=0,52)	0,5 (p=0,30)	0,2 (p=0,74)	0,0 (p=1,00)
	<b>Cu/Se-Quotient</b>	0,02 (p=0,89)	-0,24 (p=0,46)	0,2 (p=0,46)	0,4 (p=0,46)	0,3 (p=0,65)	0,1 (p=0,44)

Sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Patienten fand sich eine signifikante negative Korrelation von Se und IGF-1. Diese Verbindung war bei den weiblichen Patienten jedoch stärker ausgeprägt. Eine signifikante Verbindung der anderen Spurenelemente mit IGF-1 fand sich bei beiden Geschlechtern nicht. Auch eine signifikante Beziehung zwischen den untersuchten Spurenelementen und der Schilddrüsenhormonachse war nicht nachzuweisen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Untersuchung der Kinder mit konnataler Hypothyreose und Kleinwuchs**

Die Ergebnisse der Untersuchung der beiden Gruppen von Kindern und Adoleszenten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Bei den Kindern und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose bestand eine hochsignifikante positive Verbindung von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten mit der Schilddrüsenhormonachse in Form von T3 und T4. Bei den Kindern mit Kleinwuchs zeigte sich dieser Zusammenhang nicht. Allerdings war hier eine hochsignifikante inverse Verbindung von Se mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 zu verzeichnen.

Im weiteren Verlauf wird umfassend auf diese Aussagen eingegangen und es erfolgt eine Diskussion auf Basis des aktuellen Forschungsstandes.

#### **6.1.1 Se, Cu, Cu/Se-Quotient und die Schilddrüsenhormonachse**

Zentrales Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Verbindung der essentiellen Spurenelemente Se und Cu sowie eines Quotienten aus Cu und Se mit den Schilddrüsenhormonen.

Bei der Untersuchung der Kinder und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose konnten so hochsignifikante positive Korrelationen zwischen Cu und T4, Cu und T3, dem Cu/Se-Quotienten und T4, sowie dem Cu/Se-Quotienten und T3 nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen sich gut vereinbaren mit den Untersuchungen von Aihara et al. aus dem Jahre 1984. Sie konnten ebenfalls eine Korrelation des Kupferspiegels mit T3 und T4 zeigen (67). Liu et al. wiesen bei Patienten mit Hypothyreose eine signifikante Korrelation des Kupfergehalts von Erythrozyten mit dem T3/T4-Quotienten und dem TSH-Level im Serum nach. Ferner fanden sie bei der euthyreoten Vergleichsgruppe eine signifikante Assoziation des Kupfergehalts der Erythrozyten mit dem fT4-Spiegel im Serum (68).

Wie sind diese Assoziationen von Kupfer- und Schilddrüsenmetabolismus zu erklären? Das Kupfer-Transport-Protein Ceruloplasmin scheint das entscheidende Verbindungsglied zu sein. So zeigten Fitch et al. 1999 den Einfluss der Schilddrüsenhormone auf die Aktivität des Kupfer-Transportproteins Ceruloplasmin in

der frühen neonatalen Entwicklung. In ihren Untersuchungen führte die Gabe von T4 an Neonaten zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität von Ceruloplasmin. Während bei Kindern mit Hypothyreose eine Abnahme der Ceruloplasmin-Aktivität auftrat (84). Mittag et al. konnten 2012 anhand eines Mausmodell den zugrundeliegenden Mechanismus näher beleuchten. Die Behandlung mit dem Schilddrüsenhormon T3 führte in ihren Untersuchungen zu einer Steigerung der hepatischen Ceruloplasmin-Synthese und einem Export dieses Proteins in das Serum. Während die Synthese von kupferbindenden intrazellulären Proteinen, wie der Superoxid-Dismutase herunterreguliert wird. Wobei der Schilddrüsenhormonrezeptor TR $\beta$  eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Ceruloplasmin und damit der Steigerung des Kupferspiegels im Serum spielt (85). Klinisch bedeutsam ist aber nicht nur, dass die Schilddrüsenhormone den Kupferstatus im Serum positiv beeinflussen, sondern auch dass der Kupferspiegel sogar je nach Art der Schilddrüsenerkrankung zu variieren scheint. So stellt der Se/Cu-Quotient laut Mittag et al. einen potentiellen neuen Biomarker dar, um Patienten mit einer Resistenz gegen Schilddrüsenhormone von Patienten mit einem TSH-produzierenden Adenom des Hypophysen-Vorderlappens abgrenzen zu können. Da bei Patienten mit einer Schilddrüsenhormonresistenz, aufgrund des fehlenden bzw. mutierten Schilddrüsenhormonrezeptor TR $\beta$  kein Anstieg von Cu zu verzeichnen ist, steigt der Se/Cu-Quotient durch die parallele Induktion des hepatischen Selenoprotein P im Serum mit dem Schilddrüsenhormonstatus an. Dieser selektive Effekt steht im Gegensatz zu einem TSH-produzierenden Hypophysenadenom, da hier über die gleichzeitige Induktion von hepatischem Ceruloplasmin und Selenoprotein P ein paralleler Anstieg von Se und Cu erfolgt, wodurch der Quotient kaum verändert wird (85). Aihara et al. beobachteten signifikant höhere Werte von Cu bei Patienten mit Hyperthyreose im Vergleich zu Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen und gesunden Patienten (67). Kucharzweski et al. untersuchten 2003 die Spiegel von Cu, Zn und Se im Blut und Schilddrüsengewebe von Patienten mit unterschiedlichen Schilddrüsenerkrankungen. Sie berichteten, dass Patienten mit einem Malignom der Schilddrüse, einem Morbus Basedow oder einer knotigen Struma signifikant höhere Kupfer- und Zink-Spiegel, sowie höhere Quotienten von Cu/Zn, Cu/Se und Zn/Se und niedrigere Selenspiegel im Blut aufweisen als gesunde Patienten. Unter diesen Patienten zeigten, diejenigen mit Schilddrüsenkrebs die höchsten Werte von Cu, Zn und des erwähnten Quotienten (66). Przybylik-Mazurek

et al. wiesen bei Patienten mit Schilddrüsenkrebs höhere Kupferwerte als bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis und der gesunden Vergleichsgruppen nach (65).

Insgesamt legen die vorgestellten Studien nahe, dass verschiedene wechselseitige Verbindungen zwischen dem essentiellen Spurenelement Cu und der Schilddrüse bestehen: Zum einen beeinflussen die Schilddrüsenhormone den Kupferspiegel über eine Induktion der Ceruloplasminsynthese (85). Zum anderen fällt auf, dass die Kupferspiegel bei Erkrankungen der Schilddrüse, die mit entzündlichen, autoimmunen oder proliferativen Prozessen einhergehen, wie beispielsweise Malignome der Schilddrüse oder Morbus Basedow, im Vergleich zu Gesunden erhöht sind. Eine Störung der antioxidativen Abwehr wird bei diesen Erkrankungen als Einflussfaktor auf die Pathogenese diskutiert (65). Kupferhaltige Enzyme wie die Superoxiddismutase und Metallothionin als Teil dieser antioxidativen Abwehr (59) sind hier möglicherweise involviert und führen zu den beobachteten Veränderungen des Kupferspiegels in den vorgestellten Studien.

Im Falle der hier untersuchten Kinder mit konnataler Hypothyreose ist die Ursache der Störung der Schilddrüsenfunktion auf eine Schilddrüsendysgenese, und nicht auf immunologische oder proliferative Prozesse im Erwachsenen zurückzuführen. Sodass für den beobachteten Zusammenhang zwischen Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und den Spiegeln von T3 und T4 am ehesten die direkte molekulare Beeinflussung der hepatischen Ceruloplasminsynthese über die Schilddrüsenhormone verantwortlich ist.

Die in dieser Arbeit gezeigten signifikanten Verbindungen von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten mit den Schilddrüsenhormonen T3 und T4 liefern nicht nur einen Beitrag zu einem besseren theoretischen Verständnis der Interaktion von Cu und Se mit der Schilddrüsenhormonachse. Sie könnten in Zukunft auch eine Rolle in der klinischen Betreuung von Patienten mit konnataler Hypothyreose spielen, indem die Bestimmung des Cu-Status bzw. Cu/Se-Quotienten dazu genutzt wird, eine möglichst physiologische Dosisanpassung der Substitution mit T4 bei hypothyreoten Patienten zu erreichen. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten weitere Experimente erfolgen, in denen untersucht wird, ob sich die Dosis von T4, welche zum Erreichen normaler TSH-Werte notwendig ist, bei Patienten mit niedrigen oder hohem Cu-Spiegel bzw. Cu/Se-Quotienten unterscheidet.

Aufgrund der gezeigten positiven Verbindung von Cu und der Schilddrüsenhormonachse lässt sich annehmen, dass Kinder mit einer schweren

Hypothyreose auch einen Kupfermangel ausbilden können. Dieser Kupfermangel stellt wiederum ein zusätzliches Risiko für ein Entwicklungsdefizit oder eine Wachstumsretardierung dar. In diesem Kontext ist eine zukünftige routinemäßige Bestimmung des Kupferspiegels bei Kindern mit Hypothyreose zweckmäßig und wünschenswert.

Weiterhin ist denkbar, dass die Steigerung des Kupferspiegels durch die Beeinflussung der hepatischen Coeruloplasminsynthese unter Therapie mit L-Thyroxin auch eine Rolle beim generellen Erfolg der Hormonsubstitution spielt.

Ziel dieser Arbeit war es auch, die Zusammenhänge von Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen in unterschiedlichen kindlichen Entwicklungsstufen zu untersuchen. Die für die gesamte Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose nachgewiesenen signifikanten Korrelationen von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T4 sowie T3 konnten jedoch nicht in allen Altersgruppen gezeigt werden. Bei den Kindern zwischen 5 und 12 Jahren bestand lediglich eine hochsignifikante Verbindung zwischen dem Cu/Se-Quotienten und T3. Während bei den Kindern zwischen 13 und 16 Jahren ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Cu und T4 auftrat. Insgesamt zeigte sich jedoch ein deutlicher Trend für einen Zusammenhang von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten und T3 bzw. T4. Daher sollten die nachgewiesenen signifikanten Zusammenhänge aus der gesamten Gruppe der Kinder und Adoleszenten gezielt in größeren altersspezifischen Gruppen untersucht werden. Die altersabhängigen Betrachtungen haben hierbei aufgrund der kleinen Probandenanzahlen keine bedeutsamen Zusatzerkenntnisse liefern können.

Im Gegensatz zu Cu und dem Cu/Se-Quotienten konnte für Se allein keine signifikante Verbindung mit den Schilddrüsenhormonen gefunden werden. Zahlreiche Studien haben hingegen über eine Verbindung des Selen- und Schilddrüsenhormonspiegels berichtet: Olivieri et al. fanden bei 109 gesunden euthyreoten Probanden eine schwache inverse signifikante Verbindung von Se und T4 sowie eine schwache signifikante Verbindung von Se mit einem Quotienten aus T3 und T4 (48). Bei einem Kollektiv von über 90-Jährigen konnte eine signifikante Korrelationen von Se und fT4 aufgezeigt werden (49). Napolita et al. wiesen bei Hämodialyse-Patienten mit chronischer Anämie unter Supplementation mit Se einen signifikanten Anstieg von fT3 und eine Abnahme von TSH nach. Ferner deckten sie eine inverse Korrelation von Se



mit TSH auf (47). Auch bei Patienten mit Phenylketonurie führte eine Selensupplementation zu einem Anstieg von T4, fT4 und rT3 (46). Bei einer Gruppe von schwerkranken Patienten fand sich hingegen kein Effekt von Selensupplementation auf den Schilddrüsenhormonspiegel (86). Auch bei einer Gruppe von Kindern mit kongenitaler Hypothyreose konnte solch ein Effekt nicht beobachtet werden (40). Die Studienlage zur Korrelation des Selenpiegels mit den Schilddrüsenhormonen ist demnach uneinheitlich.

Doch wie könnten diese unterschiedlichen Beobachtungen zustande kommen? Es wird angenommen, dass die verschiedenen Selenoproteine unterschiedlich gut mit Selen versorgt werden, wobei eine Bevorzugung der DIO Enzyme erfolgt und dadurch der Metabolismus der Schilddrüsenhormone auch im Selenmangel aufrecht erhalten bleibt. Was dazu führe, dass bei mildem Selenmangel noch kein Absinken des Schilddrüsenhormonspiegels auftreten müsse (87). Denkbar ist also, dass bei den hier untersuchten Kindern und Adoleszenten der Selenpiegel noch ausreichend für die normale Expression der DIO ist, wodurch keine Korrelation von Se und den Schilddrüsenhormonen zu beobachten war. Insbesondere fand sich keine Korrelation von Se mit dem T4/T3-Quotienten, welcher indirekt die Aktivität der DIO widerspiegelt. Interessant wäre für die Zukunft demnach ein Studiendesign, das prüft, ab welchem Grad der Selenunterversorgung eine Abnahme der DIO-Aktivität eintritt und eine Korrelation von Se mit den Schilddrüsenhormonen zu beobachten ist.

Trotz fehlendem Nachweis einer Korrelation des Selen- mit dem Schilddrüsenhormonspiegel in dieser Arbeit, ist die Verbindung dieses essentiellen Spurenelements mit der Schilddrüsenhormonachse nicht von der Hand zu weisen und gegebenenfalls nur unter pathologischen Bedingungen zu beobachten.

Neuere Untersuchungen zeigen sogar, dass die Beziehung von Se zur Schilddrüsenhormonachse nicht einseitig ist. Die Schilddrüsenhormone haben ebenso einen positiven Einfluss auf die Bildung von Selenoproteinen und den Selenstatus, wie 2010 von Mittag et al. anhand eines Mausmodells gezeigt werden konnte. Wobei dem Schilddrüsenhormonrezeptor TR $\alpha$ 1 eine neue Rolle im Selenmetabolismus als direkt verantwortlicher Transkriptionsfaktor für die hepatische Selenoprotein P Biosynthese zugeschrieben werden kann (88).

### 6.1.2 Se, Cu, Cu/Se-Quotient und die Wachstumshormonachse

Ferner wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, dass der Selen Spiegel mit der Wachstumsachse, und hier im Besonderen mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 zusammenhängt. Tatsächlich konnte bei den Kindern mit Kleinwuchs eine inverse signifikante Verbindung des Selen- mit dem IGF-1-Spiegel gezeigt werden. Auch in Tierexperimenten hat sich gezeigt, dass Se einen negativen Einfluss auf den Wachstumsfaktor IGF-1 haben kann. So führte die Verabreichung hoher Selendosen an junge Ratten zu einer Reduktion des IGF-1-Spiegels und damit zu einer Wachstumsverzögerung (89). Nach dem Grundsatz von Paracelsus: „Allein die Dosis macht das Gift“ ist denkbar, dass die verabreichten Selendosen in der erwähnten Nagerstudie schon im toxischen Bereich lagen, wodurch die Wachstumsretardierung zu erklären wäre. Im Falle der hier untersuchten Kinder mit Kleinwuchs ist allerdings anzunehmen, dass die inverse Verbindung zwischen Se und IGF-1 nicht auf eine toxische Wirkung des Se zurückzuführen ist, da nur eines der Kinder einen Selenwert oberhalb des Referenzbereiches aufwies, der allerdings unterhalb des toxischen Bereichs von  $>400 \mu\text{g/l}$  (15) lag, während der Rest der Gruppe normale bzw. erniedrigte Selenwerte aufwies.

Andere Nagerstudien zeigen hingegen einen positiven Zusammenhang von Se und der Wachstumshormonachse. So ist bei selenarm ernährten Mäusen eine Wachstumsretardierung zu beobachten (54) (53). Dies ist auf die Abnahme des Wachstumshormon- bzw. IGF-1-Spiegels unter Selenmangel zurückzuführen (54).

Die aktuelle Studienlage im humanmedizinischen Bereich stellt sich wie folgt dar: Bei gesunden norwegischen Frauen führte eine gesteigerte orale Selenaufnahme nicht zu einer Veränderung des Wachstumshormon- und IGF-1-Spiegels (90). Karl et al. fanden hingegen eine Korrelation zwischen der von den Probanden gewöhnlich aufgenommenen Selenmenge und der bioaktiven Form des IGF-1 im Serum. Allerdings zeigte sich keine Korrelation mit dem freien oder totalen IGF-1-Spiegel (91). Anzumerken ist jedoch, dass der Selengehalt der Nahrung bei dieser Studie nur annähernd berechnet und nicht direkt gemessen wurde. Die CHIANTI-Studie hingegen konnte bei älteren Probanden sogar eine sehr schwache positive Korrelation von Se und IGF-1 im Plasma zeigen (57).

In der aktuellen Literatur wird insgesamt eher von einer positiven Beeinflussung der Wachstumshormone und -faktoren durch Se ausgegangen, ausgenommen von Selenspiegeln im toxischen Bereich. Es ist jedoch zu bedenken, dass die bisherige

Datenlage gerade für Kinder äußerst dünn ist. Somit sollte der in dieser Arbeit aufgezeigte neuartige inverse Zusammenhang von Se- und IGF-1 bei kleinwüchsigen Kindern und Adoleszenten in weiteren Experimenten überprüft werden.

In der hier durchgeführten Untersuchung fand sich bei den weiblichen Patienten eine stärkere Verbindung zwischen Se und IGF-1 als bei den männlichen Patienten. Zwar besteht hinsichtlich des Selenmetabolismus ein sexueller Dimorphismus (11), da die Gruppe mit Kleinwuchs jedoch größtenteils aus Kleinkindern und Kindern im Schulalter bestand und sich die Sexualhormone bei kleinen Kindern vor der Pubertät nicht auffallend unterscheiden, kann die stärkere Verbindung von Se und IGF-1 bei den weiblichen Patienten folglich nicht durch die Sexualhormone erklärt werden.

Eine signifikante Verbindung des Kupfer- mit dem IGF-1-Spiegel fand sich in dieser Arbeit nicht. Bei wachsenden Ratten konnte allerdings beobachtet werden, dass erniedrigte Kupferaufnahme zu einer Reduktion des IGF-1-Spiegels und auch der Knochenstärke führt (92). Andere Studien beschäftigten sich mit dem Zusammenhang von Cu und dem Wachstumshormon (Somatotropin, GH), welches letztlich zur Expression von IGF-1 führt. So beobachteten Brandão-Neto et al. eine positive Korrelation von Cu und dem Wachstumshormon nach Gabe von Cu an gesunde Erwachsene. Allerdings ließ sich dieser Effekt nur an der Hälfte der 12 untersuchten Probanden feststellen (71). Im Tierexperiment führte die Kupferstimulation von Hypophysenzellen von Schweinen zu einer vermehrten Sekretion des Wachstumshormons (93). Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die bisher veröffentlichten Tierstudien eine Verbindung von Cu mit der Wachstumshormonachse nahe legen. Die einzige humane Studie konnte dagegen keine eindeutige Verbindung aufzeigen (71). In Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit, lässt sich bei Menschen bisher also keine direkte Verbindung von Cu mit der Wachstumshormonachse nachweisen. Weitere Studien zur Klärung der komplexen Verbindungen von essentiellen Spurenelementen mit der Wachstumshormonachse sind daher notwendig.

### **6.1.3 Limitation der Untersuchungen**

Folgende Limitationen bei der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Spurenelementen und Schilddrüsenhormonen in dieser Arbeit sind anzumerken: Die untersuchten Proben in der Gruppe der Kinder mit konnataler Hypothyreose stammten teilweise aus den achtziger Jahren. Jedoch wurden die Proben nicht mehrmaligen Auftau- und Einfrierprozesse unterzogen. Überdies sind Spurenelementkonzentrationen sehr robust gegenüber unsachgemäßer Lagerung von Proben, sodass es nicht zu einer präanalytischen Verfälschung der Ergebnisse gekommen sein dürfte (85).

Darüber hinaus erlaubt die hier durchgeführte Untersuchung keine Aussage über kausale Zusammenhänge.

Ferner ist anzumerken, dass die Werte von T4, fT4 und T3 nicht für alle eingeschlossenen Patienten verfügbar waren. Darüber hinaus lag eine inhomogene Altersstruktur vor. So war die Stichprobe der Patienten mit konnataler Hypothyreose im Kleinkindalter zu gering, um statistisch gut abgesicherte Aussagen über die Verbindung von Spurenelementen und der Schilddrüsenhormonachse in diesem Alter treffen zu können. Auch durch die geringe Stichprobengröße der Gruppe der kleinwüchsigen Kleinkinder und Adoleszenten war keine Aussage darüber möglich, ob die inverse Verbindung von Se und IGF-1 auch in diesen Altersgruppen auftritt.

Daher sollten gezielt weitere Untersuchungen in größeren altersspezifischen Gruppen erfolgen. Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass trotz der niedrigen Inzidenz der konnatalen Hypothyreose und des Kleinwuchses ein hoher Stichprobeumfang erzielt werden konnte, der neue physiologische beachtenswerte Korrelationen offenbarte.

### **6.1.4 Spurenelementversorgung der pädiatrischen Patienten**

Generell existieren nur wenige epidemiologische Daten zur Selenaufnahme und Selenversorgung der Kinder in Deutschland.

Anhand der hier erhobenen Daten lässt sich feststellen, dass die Selenversorgung der untersuchten Berliner Kinder eher als unzureichend einzustufen ist. In der Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose wiesen 57,1% der Kinder eine Selenunterversorgung auf, bei den schlecht wachsenden Kindern waren es immerhin 30,3%. Dies ist sicherlich durch die Tatsache zu erklären, dass Deutschland zu den selenarmen Gebieten der Welt zählt (5). Aufgrund fehlender Daten ist allerdings keine Aussage darüber möglich, ob die pädiatrischen Patienten im Vergleich zu gesunden

Kindern im Berliner Raum schlechter versorgt sind. In einer epidemiologischen Studie auf der norddeutschen Insel Amrum wurde festgestellt, dass 16,3% der untersuchten gesunden 1- bis 4-Jährigen nicht die von der deutschen Ernährungsgesellschaft vorgeschlagene Mindestmenge der Selenaufnahme (16) erreichen, obwohl die Nähe zur Nordsee eine gute Selenversorgung nahelegt. Bei den 4- bis 7- Jährigen waren es sogar 31,3%, die eine unzureichende Selenaufnahme zeigten (96). Diese Daten lassen sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen Bodentypen, Ernährungsprofile und der Regenverhältnisse nicht einfach auf den Berliner Raum übertragen. So sollte eine größere epidemiologische Studie an gesunden Kindern in Berlin erfolgen, um zu untersuchen, ob tatsächlich solch eine gravierende Selenunterversorgung im Berliner Raum besteht, wie die Daten der hier untersuchten Patienten suggerieren.

Indes wies keines der Kinder eine Unterversorgung mit Cu auf. Vielmehr zeigte eine hohe Anzahl der Kinder Kupferwerte oberhalb des Referenzwertes: in der Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose waren es 52,4%, bei den Kindern mit Kleinwuchs sogar 77,3%. Denkbare Ursache dieser Befunde könnte ein erhöhter Kupfergehalt des Berliner Trinkwassers im Vergleich zu anderen Regionen sein (62). Jedoch fand man bei einer epidemiologischen Untersuchung an Berliner Neugeborenen keine Korrelation zwischen der Kupferexposition und der Kupfer- und Ceruloplasminkonzentration im Serum. Auch Kinder mit erhöhter Exposition wiesen demnach keine höheren Kupferwerte im Blut auf als niedrig Exponierte (62). Demzufolge kann die Trinkwasserexposition als Ursache für die erhöhten Kupferspiegel ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung des Kupferspiegels ist generell relativ unspezifisch und kann u.a. bei akuten und chronischen Infekten, Eisenmangelanämie und bei Tumorerkrankungen auftreten (97) (98). Sie spielt allerdings keine Rolle bei der Diagnostik dieser Erkrankungen (98). Bei den untersuchten Kindern lagen keine zusätzlichen Informationen über evtl. vorliegende Infektionskrankheiten oder ähnliches zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor, sodass hier keine abschließende Erklärung für die erhöhten Kupferspiegel gegeben werden kann. Denkbar ist auch, dass aufgrund der nur geringen Datenlage zum Kupferstatus deutscher Kinder hier der Referenzbereich für einen zu hohen Kupferstatus zu eng gewählt ist. Auch diese Unsicherheit könnte durch eine größere Studie im Bereich Berlin-Brandenburg behoben werden.

Worin könnte jedoch der Grund für die Tatsache liegen, dass die schlecht wachsenden Kinder insgesamt besser mit den untersuchten Spurenelementen versorgt waren als die Kinder mit konnataler Hypothyreose? In der Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose konnte eine Korrelation zwischen Cu sowie dem Cu/Se-Quotienten mit der Schilddrüsenhormonachse gezeigt werden. Möglicherweise ist die Hypothyreose, die Ursache bzw. die Folge der im Vergleich bestehenden niedrigeren Spurenelementversorgung.

Unter Umständen neigen Eltern schlecht wachsender Kinder auch eher dazu, ihren Kindern Nahrungsergänzungsmittel zu geben. Abgesehen von der Thyroxineinnahme, lagen in den untersuchten Gruppen jedoch keine Daten zur Medikamenten- oder Supplementeinnahme vor.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die Geschlechter und die verschiedenen Altersgruppen hinsichtlich der Spurenelementversorgung unterscheiden. Bei der Gruppe mit Kleinwuchs war ein signifikanter Unterschied des Selenpiegels zwischen den Geschlechtern zu verzeichnen. Wobei die männlichen Patienten höhere Selenwerte aufwiesen. Ein Grund hierfür könnte eine höhere Nahrungs- und damit Selenaufnahme der männlichen Patienten sein, gerade in Bezug auf relativ selenreiche tierische Nahrungsbestandteile wie Fleisch, Fisch, Eier oder Milch (99). In der Gruppe der Patienten mit konnataler Hypothyreose war eine Abnahme des Kupferspiegels mit dem Alter zu verzeichnen. Parallel dazu fiel der T3-Spiegel. Da eine Korrelation von Cu und T3 für diese Gruppe nachgewiesen wurde, lässt sich dieser Befund so möglicherweise durch die verminderte Ceruloplasminsynthese bei sinkenden T3-Werten erklären (85).

### **6.1.5 Selensupplementation**

Die gesammelten Daten verdeutlichen, dass die untersuchten Kinder und Adoleszenten eher schlecht mit Se versorgt sind. Sollte bei ihnen also schon eine Selensupplementation erfolgen? Von Biesalski et al. wird empfohlen, bei Heranwachsenden mit Selenwerten unter 25 µg/l in jedem Fall eine Selensupplementation vorzunehmen (100) (101). Keines der untersuchten Kinder zeigte jedoch Selenwerte unter 25 µg/l, sodass von einer generellen Empfehlung zur Selensupplementation zunächst Abstand zu nehmen ist. Im Einzelfall sollte jedoch

geklärt werden, ob weitere Risiken wie etwa eine Mangelernährung vorliegen, bei denen eine Substitution schon bei Werte von unter 45 µg/l erfolgen kann (100). In jedem Fall ist die Aufklärung von Eltern und Kindern über eine ausgewogene und spurenelementreiche Ernährung ratsam.

Welche allgemeinen Empfehlungen können abgesehen von den untersuchten Kindern zur Selensupplementation gegeben werden? Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen ganz klar die enge Verzahnung von Se mit der Schilddrüsen- und auch der Wachstumshormonachse. Daher sollte eine Supplementation mit Se nicht ohne vorherige Betrachtung der Schilddrüsenhormone, der Iodversorgung und insbesondere bei Heranwachsenden auch der Wachstumshormone erfolgen. Ein Fallreport von 1997 verdeutlicht diese Problematik: Es wurde berichtet, dass ein Mann mit mutmaßlicher Sepsis unter supportiver Therapie mit hohen intravenösen Dosen von Se eine Hypothyreose entwickelte. Es wird angenommen, dass dieser Mann zuvor unter einem leichten Ioddefizit gelitten hat. Die Selengabe führte wahrscheinlich über die DIO zu einer gesteigerten Konversion von T4 zu T3 und unter dem Ioddefizit so zu einer Begrenzung der Schilddrüsenhormon-Synthese (102).

## **6.2 Selenbestimmung aus DBS**

Ziel dieser Arbeit war es weiterhin, eine preisgünstige und praktikable Methode der Selenbestimmung aus DBS zu entwickeln. Es sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, eine Selenmessung aus den DBS mittels TXRF vorzunehmen, deren Werte möglichst nah an der der Selenmessung im Serum liegen. Eine solche Methode hätte große Vorteile, da hierdurch bei Verdacht einer Erkrankung einfache Analysen im Neugeborenen-Screening möglich wären, ohne den Neugeborenen Kindern erneut Blut abnehmen zu müssen. Überdies eröffnet eine solche Methode die Möglichkeit, auch in Gebieten, die abseits von Laboren, Krankenhäusern und gewährleisteten Kühlketten liegen, eine Erhebung zum Spurenelementstatus vorzunehmen.

Im Folgenden wird die favorisierte Methode diskutiert und ein Ausblick für die zukünftige Nutzung gegeben. Vor Durchführung der verschiedenen Versuche wurde festgelegt, dass eine Äquivalenz der DBS-Messung zum Goldstandard der Serummessung angenommen werden kann, wenn die Werte aus den DBS nicht mehr als 20% von den

Serumwerten abweichen. Mit der favorisierten Methode des Auflörens der Filterkarten durch HCl ist es sogar gelungen, dass die Selenwerte aus den Filterkarten um weniger als 10% von den Serumwerten abweichen.

Jedoch ist anzumerken, dass die favorisierte Methode bisher nur an 10 erwachsenen Probanden durchgeführt wurde. Insgesamt waren die Probanden relativ gut mit Se versorgt. Acht von ihnen lagen innerhalb und zwei nur leicht unterhalb des Referenzbereichs der Selenkonzentration im Serum (17). So können bisher keine Aussagen darüber gemacht werden, ob die Methode auch bei einem ausgeprägten Selenmangel äquivalente Werte zur Serummessung liefert. Daher sollten weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv, sowie an Probanden mit einem Selenmangel erfolgen. Zu erwähnen ist ferner, dass die bisherige Testung der Methode nur mit dem Filterpapier der Firma Whatman® erfolgte. Möglicherweise liefert eine andere Papiergrundlage abweichende Selenwerte. Aus diesem Grund erfolgen bereits Untersuchungen mit anderen Filterpapiersorten. Schließlich erfolgten die Abnahmen für meine Studien unter sehr gut kontrollierten Bedingungen durch sorgfältig arbeitendes Fachpersonal. Auch hier liegt eine mögliche Fehlerquelle, wenn die Methode weitreichender eingesetzt werden soll.

Mit der Selenbestimmung aus DBS eröffnet sich die Möglichkeit, wenig invasiv, d.h. ohne venöse Blutentnahme eine Bestimmung des Selenstatus vorzunehmen. Dies spielt besonders bei der Untersuchung von Neugeborenen und Kindern eine Rolle, da schmerzhafteste medizinische Prozeduren bei ihnen im besonderen Maße vermieden werden sollten. Bisher wurde die Methode allerdings nur an Erwachsenen getestet. Für die Zukunft sollte deshalb eine Untersuchung von Neugeborenen geplant werden. Erweist sich die entwickelte Methode auch hier als äquivalent zur Serummessung, bestünde die Möglichkeit auf einfachem Weg umfangreiche Daten zur Selenversorgung, sowohl von gesunden als auch von kranken Neugeborenen zu erheben. Die Proben müssten hierfür nicht extra abgenommen werden, da sie im Rahmen des Neugeborenen-Screening bereits für jedes in Deutschland geborene Kind vorliegen. Sind umfangreichere Daten zur Selenversorgung von Neugeborenen vorhanden, könnte dann der vermutete Einfluss von Se bei der bronchopulmonalen Dysplasie, der Frühgeborenen-Retinopathie oder der Neugeborenenensepsis besser untersucht werden. Wodurch unter Umständen neue Indikationen für eine supportive adjuvante Selensupplementation identifiziert werden. Laut aktueller Leitlinie kann für septische



Erwachsene bereits eine adjuvante Therapie mit Se erwogen werden (7). Allerdings gelten die aktuellen Leitlinien zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis nicht für neonatale und pädiatrische Patienten. Eine separate Leitlinie soll hier erst erarbeitet werden (25).

Kinder werden häufig bereits bei Verdacht auf ein septisches Geschehen mit einer Antibiotikakombination aus einem Aminopenicillin beispielsweise Ampicillin und einem Aminoglykosid wie Gentamicin behandelt (103). Aminoglykoside können allerdings schwerwiegende Nebenwirkungen wie Oto- und Nephrotoxizität aufweisen (104). Kann Selen als adjuvante Therapie bei der Neugeborenenensepsis eingesetzt werden, könnte sich unter Umständen die Zeit der Antibiotikatherapie verkürzen und so Nebenwirkungen vermieden werden. Möglicherweise vermittelt eine Selengabe auch eine bessere Resistenz und stellt damit eine sinnvolle Präventionsmaßnahme dar. Diese Hypothese wird durch die vielen Studien zur Bedeutung von Selen für die Funktionalität und Reaktivität des Immunsystems unterstützt. Weitere Studien zur Überprüfung dieser Hypothesen sollten erfolgen.

Ein großer Vorteil bei der Selenmessung aus DBS ist die wenig invasive Probengewinnung. Tsukahara et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Untersuchung von Urin ebenfalls eine geeignete, nicht invasive Methode ist, um Aussagen über den Selenstatus und ein mögliches Selendefizit von Kindern treffen zu können (105). Dieses Vorgehen wäre analog zur Iodversorgungsanalyse, sodass beide Analysen parallel durchgeführt werden könnten (106). Der Vorteil der Selenbestimmung in DBS ist allerdings, dass hier nur winzige Probenmengen benötigt werden und DBS problemlos auch über längere Zeiträume gelagert werden können.

Die Selenbestimmung in DBS bietet nicht nur die Möglichkeit der wenig invasiven Untersuchung von Neugeborenen, sondern ist hinaus auch eine praktikable Methode für die Durchführung größerer epidemiologischer Studien zur Selenversorgung von Kindern und Erwachsenen. Denn besonders in ländlichen, medizinisch unterversorgten Gebieten findet sich häufig das Problem, dass Blutproben über weite Strecken transportiert werden müssen, um im Labor analysiert zu werden. Bei fehlenden Möglichkeiten zur zwischenzeitlichen Kühlung, ist dies jedoch nicht durchführbar. Wie bereits Studien zur Ferritinbestimmung aus DBS gezeigt haben, stellen die DBS hier eine gute Alternative dar (74) (75). So bietet die Selenbestimmung aus DBS in Zukunft

die Möglichkeit in endemischen Selenmangelgebieten wie beispielsweise in einigen ländliche Regionen in China oder Tibet (3), die medizinisch eher unterversorgt sind, einen Selenmangel frühzeitig aufzudecken. Die Methode könnte so möglicherweise zu einem Rückgang der Inzidenz von Selenmangelkrankungen beitragen.

## 7 Zusammenfassung

Über die Jahre rückte die Untersuchung der Rolle der Spurenelemente für den Hormonmetabolismus immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. So haben die essentiellen Spurenelemente Se und Cu Einfluss auf die Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse und damit auf Reifungs- und Wachstumsprozesse des menschlichen Körpers.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher als zentrales Ziel die Hypothese untersucht werden, dass die Serumkonzentration von Se oder Cu mit der Schilddrüsenhormon- und Wachstumsachse korrelieren. Hierfür erfolgten die Untersuchungen von zwei pädiatrischen Patientenkohorten mit konnataler Hypothyreose bzw. Kleinwuchs.

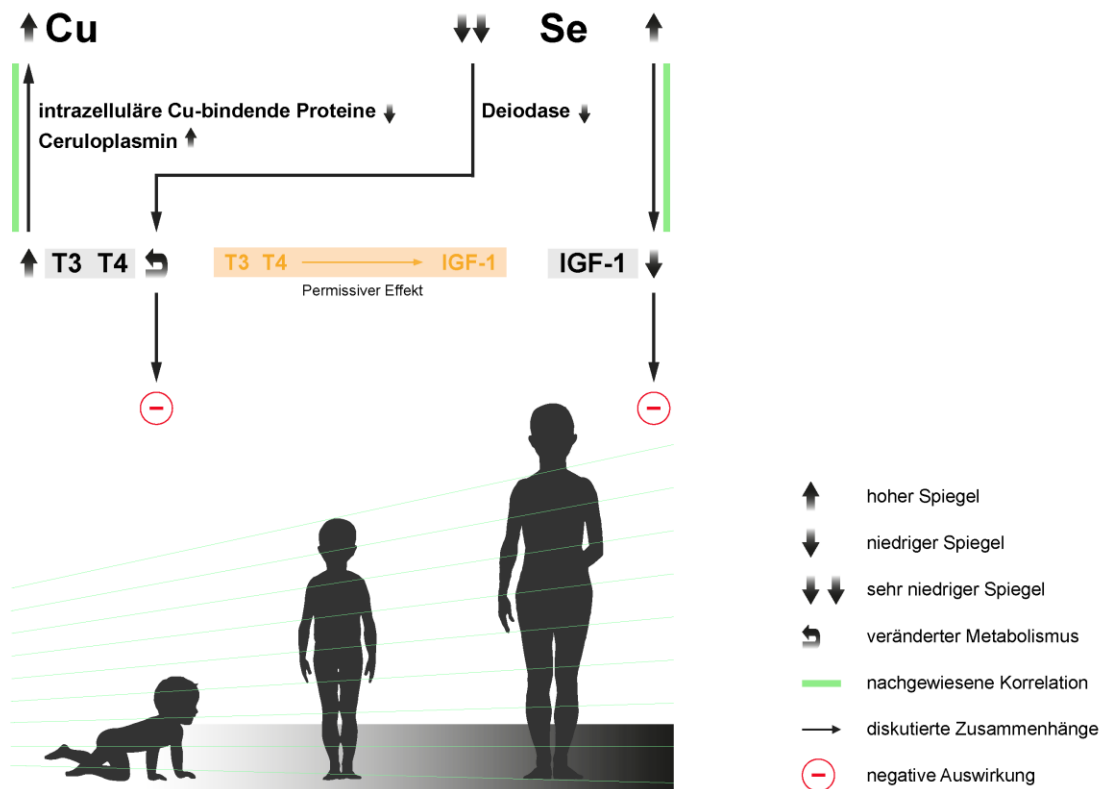
Bei den Kindern und Adoleszenten mit konnataler Hypothyreose konnte eine signifikante positive Verbindung von Cu bzw. dem Cu/Se-Quotienten mit der Schilddrüsenhormonachse in Form von T3 und T4 gezeigt werden. Es wird vermutet, dass dieser Zusammenhang vor allem durch die Induktion des Kupfer-Transport-Proteins Ceruloplasmin durch die Schilddrüsenhormone zustande kommt. Die Bestimmungen des Cu-Status bzw. des Cu/Se-Quotienten könnte in Zukunft klinische Anwendung finden, indem sie genutzt werden, um eine möglichst physiologische Dosisanpassung der L-Thyroxinsubstitution bei Patienten mit konnataler Hypothyreose zu erreichen. Hierfür sollten gezielt weitere Experimente erfolgen. Zum Anderen legt die hier gezeigte positive Verbindung von Cu und der Schilddrüsenhormonachse nahe, dass Kinder mit einer ausgeprägten hypothyreoten Stoffwechsellaage gleichzeitig einen Kupfermangel ausbilden können, welcher einen zusätzlichen Risikofaktor für eine Entwicklungsverzögerung oder Wachstumsretardierung darstellt. Eine routinemäßige Bestimmung des Kupferspiegels bei Kindern mit Hypothyreose wäre demnach wünschenswert.

Bei der zweiten pädiatrischen Patientenkohorte - den Kindern mit Kleinwuchs - zeigte sich eine signifikante inverse Verbindung von Se mit dem Wachstumsfaktor IGF-1. Dieser hochsignifikante inverse Zusammenhang wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Bisherige Studien gingen von einem positiven Zusammenhang von Se und Wachstumshormonen aus. Im Gegensatz zu den angeführten Studien liegt bei dieser Untersuchung jedoch eine besonders gut charakterisierte Gruppe sowohl weiblicher als auch männlicher Patienten vor. Ferner wurden hier erstmals Kinder untersucht, während die bisher durchgeführten Studien größtenteils Nager und

Erwachsene betrachteten. Somit stellt dieser neu gezeigte Zusammenhang einen Ausgangspunkt für weitere intensive Forschung zur Verbindung von Se mit der Wachstumshormonachse dar.

Die durchgeführte Spurenelementanalytik erlaubte auch Aussagen über die Spurenelementversorgung der untersuchten pädiatrischen Patienten. Demnach sind viele Patienten als selenarm einzustufen. Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf gesunde Kinder im Berliner Raum übertragen lassen, sollte in größeren epidemiologischen Studien getestet werden.

Die Abbildung 18 fasst die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit sowie aktuell diskutierte Zusammenhänge der Spurenelemente Se und Cu mit den Schilddrüsenhormonen T3, T4 sowie dem Wachstumsfaktor IGF-1 und deren Einfluss auf die kindliche Entwicklung zusammen.



**Abb. 18:** Rolle von Se und Cu bei Wachstum und Entwicklung des Menschen

Nachgewiesen wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Korrelation von Cu und den Schilddrüsenhormonen T3 und T4. Auf Basis des aktuellen Forschungsstandes wird angenommen, dass dieser Effekt durch eine Steigerung der hepatischen Ceruloplasmin-Synthese und einen Export dieses Proteins in das Serum sowie Hemmung der Synthese von kupferbindenden intrazellulären Proteinen bedingt ist (85). Zwischen Selen und den Schilddrüsenhormonen konnte in dieser Arbeit hingegen keine Korrelation nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass dies auf die hierarchische Versorgung der verschiedenen Selenoproteine mit Selen zurückzuführen ist. Diskutiert wird, dass die Enzyme der Deiodase-Familie (DIO), welche T4 in die biologisch aktive Form T3 umwandeln bzw. deren Abbau katalysieren, bevorzugt mit Selen versorgt werden. Demnach ist verständlich, dass bei geringem Selenmangel noch keine messbaren Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels auftreten (87). Starkes Absinken des Selenspiegels könnte jedoch zu einer Verminderung der Deiodierung in den Zielzellen führen und sich so nachteilig auf die kindliche Entwicklung und das Wachstum auswirken. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante inverse Verbindung von Selen und dem Wachstumsfaktor IGF-1 nachgewiesen werden. Unter Umständen könnten erhöhte Selenspiegel somit auch einen negativen Effekt auf Wachstum und Entwicklung von Kindern haben. Neben einem direkten Einfluss der Schilddrüsenhormone auf das Wachstum und die Skelettentwicklung konnte in tierexperimentellen Studien auch ein permissiver Effekt von T4 auf die Wirkung von GH und IGF-1 nachgewiesen werden (94) (95). Für den Menschen kann dies postuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war außerdem die Entwicklung einer Methode zur Selenbestimmung aus Trockenblut. Erstmals wurde hierfür der Selengehalt korrespondierender DBS- und Serumproben unter verschiedenen Methoden der Probenextraktion aus den DBS mittels TXRF-Analyse bestimmt. Mit der hier entwickelten HCl-basierten Methode zur Ablösung der Proben von den DBS wurde so die Möglichkeit geschaffen, Messungen des Selengehalts vorzunehmen, die weniger als 10% von den korrespondierenden Serumproben abweichen. Dieses Verfahren soll in Zukunft unter anderem für das Neugeborenen-Screening auf Anwendung getestet werden, da es die Möglichkeit bietet, wenig invasiv und in kleinsten Probenmengen den Selenstatus zu bestimmen. Dadurch kann der vermutete Einfluss von Se bei verschiedenen Erkrankungen des Neugeborenen wie der Sepsis und der bronchopulmonalen Dysplasie besser untersucht werden und unter Umständen neue Indikationen für eine supportive adjuvante Selensupplementation identifiziert werden. Ferner bietet die Selenbestimmung aus DBS aufgrund der guten Lagerbarkeit der Proben und der fehlenden Notwendigkeit der Kühlung während des Transports, die Möglichkeit, in endemischen Selenmangelgebieten, die medizinisch eher unterversorgt sind, einen Selenmangel frühzeitig aufzudecken. So kann die entwickelte Methode möglicherweise zu einem Rückgang der Inzidenz von Selenmangelerkrankungen beitragen. Weitere Testungen der neu entwickelten HCl-basierten Methode in größerem Umfang, insbesondere auch mit Blutproben von Neugeborenen und einer anderer Filterpapiergrundlage, sollten erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen so letztlich zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Spurenelementen mit der Schilddrüsen- und Wachstumshormonachse bei. Außerdem wurde die Möglichkeit geschaffen, eine wenig invasive Bestimmung des Selenstatus aus winzigen, gut lagerbaren Trockenblutproben vorzunehmen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Beuth J, Drebing V. *Selen gegen Krebs*. Stuttgart : TRIAS Verlag, 2006.
2. Pedrero Z, Madrid Y. *Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review*. *Anal Chim Acta* 2009; 634 (2): 135-52.
3. Schomburg L, Köhrle J. *Selen*. In: Gebel T, Hartwig A, Dunkelberg H [Hrsg]. *Vitamine und Spurenelemente*. Weinheim : Wiley-VCH, 2012: 243-286.
4. Gromer S, Urig S, Becker K. *The thioredoxin system-from science to clinic*. *Med Res Rev* 2004; 24 (1): 40-89.
5. Schrauzer GN. *Selen: neuere Entwicklungen aus Biologie, Biochemie und Medizin*. Heidelberg; Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag, 1997.
6. Heyland DK. *Selenium supplementation in critically ill patients: can too much of a good thing be a bad thing?* *Crit Care* 2007; 11 (4): 153.
7. Reinhart K, Brunkhorst F M, Bone H G, et al. *Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis*. 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI).
8. Angstwurm MWA, Engelmann L, Zimmermann T, et al. *Selenium in Intensive Care (SIC): Results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis and septic shock*. *Crit Care Med* 2007; 35 (1): 118-26.
9. <http://www.kompetenznetz-sepsis.de> (abgerufen am 12. März 2013)
10. Hoeflich J, Hollenbach B, Behrends T, Hoeg A, Stosnach H, Schomburg L. *The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians*. *Br J Nutr* 2010; 104 (11): 1601-4.
11. Schomburg L, Schweizer U. *Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium*. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790 (11): 1453-62.
12. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. *Selenium in food and the human body: A review*. *Sci Total Environ* 2008; 400 (1-3): 115-41.
13. Beck MA, Levander OA, Handy J. *Selenium deficiency and viral infection*. *J Nutr* 2003; 133 (5 Suppl 1): 1463S-7S.
14. Vanderpas JB, Contempré B, Duale NL, et al. *Iodine and selenium deficiency associated with cretinism in northern Zaire*. *Am J Clin Nutr* 1990; 52 (6), 1087-93.
15. Umweltbundesamt. *Selen und Human-Biomonitoring*. *Bundesgesundhbl - Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 2002; 45 (2): 190-5.
16. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.: *Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*.  
<http://www.dge.de/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=4&page=9>  
[abgerufen am 19. Dezember 2013]
17. Laborlexikon e-Journal für Labormedizin: *Selen*  
<http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotexte/s/Selen.htm> (abgerufen am 23. Januar 2013)
18. Hauser K. *Spurenelemente*. In: Rassow J, Netzker R, Deutzmann R [Hrsg]. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart : Gerorg Thieme Verlag, 2006: 306-318.
19. Kamble P, Mohsin N, Jha A, et al. *Selenium Intoxication with Selenite Broth Resulting in Acute Renal Failure and Severe Gastritis*. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20 (1): 106-11.
20. Darlow BA, Inder TE, Graham PJ, et al. *The relationship of selenium status to respiratory outcome in the very low birth weight infant*. *Pediatrics* 1995; 96 (2 Pt 1): 314-9.

21. Mostafa-Gharehbaghi M, Mostafa-Gharabaghi P, Ghanbari F, Abdolmohammad-Zadeh H, Sadeghi GH, Jouyban A. *Determination of Selenium in Serum Samples of Preterm Newborn Infants with Bronchopulmonary Dysplasia Using a Validated Hydride Generation System.* Biol Trace Elem Res 2012; 147 (1-3): 1-7.
22. Bartmann P, Roos R. *Erkrankungen in der Neugeborenenperiode.* In: Sitzmann C. Duale Reihe Pädiatrie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003: 71-126.
23. Darlow BA, Winterbourn CC, Inder TE, et al. *The effect of selenium supplementation on outcome in very low birth weights infants: a randomized controlled trial. The New Zealand neonatal study group.* J Pediatr 2000; 136 (4): 473-80.
24. Puchta I, Georgi E. *Pädiatrie.* In: Schaps K P, Kessler O, Fetzner U. Das Zweite-kompakt Gynäkologie Pädiatrie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.
25. Deutsche Sepsisgesellschaft und Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin: *Leitlinienreport - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis.* [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/079-001m\\_S2k\\_Sepsis\\_Leitlinienreport\\_01.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001m_S2k_Sepsis_Leitlinienreport_01.pdf) (abgerufen am 19. Februar 2013)
26. Gathwala G, Yadav OP. *Selenium in the neonate.* Indian J Pediatr 2002; 69 (5): 443-6.
27. Yang H, Ding Y, Chen L. *Effect of trace elements on retinopathy of prematurity.* J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2007; 27 (5): 590-2.
28. Ruprecht KW. *Kinderophthalmologie.* In: Sitzmann C [Hrsg]. Duale Reihe Pädiatrie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003: 933-944.
29. Daniels LA, Gibson RA, Simmer K. *Gluthathione peroxidase is not a functional marker of selenium status in the neonatal period.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 26 (3): 263-8.
30. Loui A, Raab A, Braetter P, Obladen M, de Braetter VN. *Selenium status in term and preterm infants during the first months of life.* Eur J Clin Nutr; 62 (3): 349-55.
31. Makhoul IR, Sammour RN, Diamond E, Shohat I, Tamir A, Shamir R. *Selenium concentrations in maternal and umbilical cord blood at 24–42 weeks of gestation: basis for optimization of selenium supplementation to premature infants.* Clin Nutr 2004; 23 (3): 373-381.
32. Gathwala G, Yadav OP, Singh I, Sangwan K. *Maternal and cord plasma selenium levels in full-term neonates.* Indian J Pediatr 2000; 67 (10): 729-31.
33. Ijima K, Takamitsu O, Yoshinaga J, et al. *Cadmium, Lead, and Selenium in Cord Blood and Thyroid Hormone Status of Newborns.* Biol Trace Elem Res 2007; 119 (1): 10-8.
34. Dison PJ, Lockitch G, Halstead AC, Pendray MR, Macnab A, Wittmann BK. *Influence of maternal factors on cord and neonatal plasma micronutrient levels.* Am J Perinatol 1993; 10 (1): 30-5.
35. American Academy of Pediatrics, American Thyroid Association, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism.* Pediatrics 2006; 117 (6): 2290-303.
36. Zabransky, S. *Krankheiten der innersekretorischen Drüsen und Wachstumsstörungen.* In: Sitzmann C [Hrsg]. Duale Reihe Pädiatrie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003: 197-228.
37. Herold, G. *Innere Medizin.* Köln: Gerd Herold, 2012.
38. Grüters A, Krude H. *Update on the management of congenital hypothyroidism.* Horm Res 2007; 68 (Suppl 5): 107-11.
39. Köhrle J, Gärtner R. *Selenium and thyroid.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2009; 23 (6): 815-27.



- 40.** Chanoine JP, Nève J, Wu S, Vanderpas J, Bourdoux P. *Selenium Decreases Thyroglobulin Concentrations But Does Not Affect the Increased Thyroxine-to-Triiodothyronine Ratio in Children with Congenital Hypothyroidism.* J Clin Endocrinol Metab 2001; 86 (3): 1160-3.
- 41.** Chanoine JP, Safran M, Farwell AP, et al. *Selenium deficiency and type II 5'-deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat: evidence of a direct effect of thyroxine.* Endocrinology 1992; 131 (1): 479-84.
- 42.** Deutsche Ärztezeitschrift: *Selen lindert Entzündung bei Hashimoto-Thyreoiditis.* <http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/hormonstoerungen/schilddruesen-erkrankungen/article/492795/selen-lindert-entzuendung-hashimoto-thyreoiditis.html> (abgerufen am 22. Februar 2013)
- 43.** Kato AM, Finley DJ, Lubitz CC, et al. *Selenium Decreases Thyroid Cancer Cell Growth by Increasing Expression of GADD153 and GADD34.* Nutr Cancer 2010; 62 (1): 66-73.
- 44.** Schilling JU, Zimmermann T, Albrecht S, Zwipp H, Saeger HD. *Low-T3-Syndrom bei Polytraumapatienten — Phänomen oder wichtiger pathogenetischer Faktor?* Med Klin (Munich) 1999; 94 (Suppl3): 66-69.
- 45.** Berger MM, Lemarchand-Béraud T, Cavadini C, Chioleró R. *Relations between the selenium status and the low T3 syndrome after major trauma.* Intensive Care Med 1996; 22 (6): 575-81.
- 46.** Calomme MR, Vanderpas JB, Francois B, et al. *Thyroid function parameters during a selenium repletion/depletion study in phenylketonuric subjects.* Experientia 1995; 51 (12): 1208-15.
- 47.** Napolitano G, Bonomini M, Bomba G, et al. *Thyroid Function and Plasma Selenium in Chronic Uremic Patients on Hemodialysis Treatment.* Biol Trace Elem Res 1996; 55 (3): 221-30.
- 48.** Olivieri O, Girelli D, Azzini M, et al. *Low selenium status in elderly influences thyroid hormones.* Clin Sci (Lond) 1995; 89 (6): 637-42.
- 49.** Ravaglia G, Forti P, Maioli F, et al. *Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old.* J Clin Endocrinol Metab 2008; 85 (6): 2260-5.
- 50.** Pizzulli A, Ranjbar A. *Selenium Deficiency and Hypothyroidism: a new etiology in the differential diagnosis of hypothyroidism in children.* Biol Trace Elem Res 2000; 77 (3): 199-208.
- 51.** Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, et al. *Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism.* Nat Genet 2005; 37 (11): 1247-52.
- 52.** *Wachstumshormonstörung-Zwergwuchs Minderwuchs Wachstumshormonmangel* <http://www.endo-bochum.de/schilddruese/tag/somatomedin-c/> (abgerufen am 12. März 2014)
- 53.** Ewan, RC. *Effect of selenium on rat growth, growth hormone and diet utilization.* J Nutr 1976; 106 (5): 702-9.
- 54.** Moreno-Reyes R, Egrise D, Nève J, Pasteels JL, Schoutens A. *Selenium deficiency- induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia.* J Bone Miner Res 2001; 16 (8): 1556-63.
- 55.** Ramajayam G, Vignesh RC, Karthikeyan S, et al. *Regulation of insulin-like growth factors and their binding proteins by thyroid stimulating hormone in human osteoblast-like (SaOS2) cells.* Mol Cell Biochem 2012; 368 (1-2): 77-88.
- 56.** Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J. *Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues.* Biochem J 2003; 370: 397-402.

57. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, et al. *Association of plasma selenium concentrations with total IGF-1 among older community-dwelling adults: The InCHIANTI study.* Clin Nutr 2010; 29 (5): 674-7.
58. Schümann, K. *Kupfer.* In: Köhrle J, Schümann K, Biesalski HK [Hrsg]. Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe - Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2002: 147-51.
59. Zietz, B. *Kupfer.* In: Gebel T, Hartwig A Dunkelberg H [Hrsg]. Vitamine und Spurenelemente. Weinheim : Wiley-VCH, 2012: 129-168.
60. Gabreyes AA, Abbasi HN, Forbes KP, McQuaker G, Duncan A, Morrison I. *Hypocupremia associated cytopenia and myelopathy: a national retrospective review.* Eur J Haematol 2013; 90 (1): 1-9.
61. Cordano, A. *Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children.* Am J Clin Nutr 1998; 67 (5 Suppl): 1012S-1016S.
62. Zietz BP, Dunkelberg H. *Epidemiologische Untersuchung zum Risiko frükindlicher Lebererkrankungen durch Aufnahme kupferhaltigen Trinkwassers mit der Säuglingsnahrung.* Umweltbundesamt [Hrsg]. [UBA Texte] 2003.
63. Laborlexikon e-Journal für Labormedizin: *Kupfer.*  
<http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/k/Kupfer.htm> (abgerufen am 23. Januar 2013)
64. Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V.: *Trinkwasserverordnung Anlage 2.* <http://www.dvgw.de/wasser/recht-trinkwasserverordnung/trinkwasserverordnung/anlage-2/> (abgerufen am 27. Februar 2013)
65. Przybylik-Mazurek E, Zagrodzki P, Kuźniarz-Rymarz S, Hubalewska-Dydejczyk A. *Thyroid Disorders—Assessments of Trace Elements, Clinical, and Laboratory Parameters.* Biol Trace Elem Res 2011; 141 (1-3): 65-75.
66. Kucharzewski M, Braziewicz J, Majewska U, Gózdź S. *Copper, Zinc, and Selenium in Whole Blood and Thyroid Tissue of People with Various Thyroid Diseases.* Biol Trace Elem Res 2003; 93 (1-3): 9-18.
67. Aihara K, Nishi Y, Hatano S, et al. *Zinc, copper, manganese, and selenium metabolism in thyroid disease.* Am J Clin Nutr 1984; 40(1): 26-35.
68. Liu N, Liu P, Xu Q, et al. *Elements in erythrocytes of population with different thyroid hormone status.* Biol Trace Elem Res 2001; 84 (1-3): 37-43.
69. Jonas J, Burns J, Abel EW, Cresswell MJ, Strain JJ, Paterson CR. *Impaired mechanical strength of bone in experimental copper deficiency.* Ann Nutr Metab 1993; 37 (5): 245-52.
70. Roughead ZK, Lukaski HC. *Inadequate Copper Intake Reduces Serum Insulin-Like Growth Factor-I and Bone Strength in Growing Rats Fed Graded Amounts of Copper and Zinc.* J Nutr 2003; 133 (2): 442-8.
71. Brandão-Neto J, Vieira JG, Nonaka KO, et al. *Effect of copper on the secretion of human growth hormone.* Braz J Med Biol Res 1988; 21 (2): 259-61.
72. Nennstiel-Ratzel U, Genzel-Boroviczény O, Böhles H, et al.: *Leitlinie Neugeborenencreening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien*  
[http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/024-012l\\_S2k\\_Neugeborenencreening\\_2011-12.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-012l_S2k_Neugeborenencreening_2011-12.pdf) (abgerufen am 8. Januar 2013)
73. Harms E, Olgemöller B. *Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders.* Dtsch Arztebl Int 2011; 108 (1-2): 11-22.
74. Flowers CH, Cook JD. *Dried Plasma Spot Measurements of Ferritin and Transferrin Receptor for Assessing Iron Status.* Clin Chem 1999; 45 (10): 1826-32.

75. Ahluwalia N, Lönnerdal B, Lorenz SG, Allen LH. *Spot ferritin assay for serum samples dried on filter paper*. Am J Clin Nutr 1998; 67 (1): 88-92.
76. Shlosberg A, Rumberia WK, Lublin A, Kannan K. *A database of avian blood spot examinations for exposure of wild birds to environmental toxicants: The DABSE biomonitoring project*. J Environ Monit 2011; 13 (6): 1547-58.
77. Stove CP, Ingels AS, De Kesel PM, Lambert WE. *Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave?* Crit Rev Toxicol 2012; 42 (3): 230-243.
78. Stosnach H, Hoeflich J, Behrens T, Schomburg L. *Mit der TRFA den Spurenelementen auf der Spur*. BIOSpektrum 2008; 6: 626-7.
79. Rowe, P. Statistik für Mediziner und Pharmazeuten. Weinheim : Wiley-VCH, 2012.
80. Bruker S2 Picofox. <http://www.bruker.com/de/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-spectrometry/s2-picofox/applications/sample-preparation-of-tissue.html> (abgerufen am 1. November 2012)
81. GE Healthcare Life Sciences: *Sample Collection Cards & Kits*. <http://www.whatman.com/903ProteinSaverCards.aspx> (abgerufen am 4. April 2011)
82. Neuhäuser, G. *Entwicklung und Wachstum*. In: Sitzmann C [Hrsg.]. Duale Reihe Pädiatrie. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2003: 1-14.
83. Laborlexikon e-Journal für Labormedizin: *Somatomedin C*. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/s/Somatomedin-C.htm> (abgerufen am 23. Januar 2013)
84. Fitch CA, Song Y, Levenson CW. *Developmental regulation of hepatic ceruloplasmin mRNA and serum activity by exogenous thyroxine and dexamethasone*. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 221 (1): 27-31.
85. Mittag J, Behrends T, Nordström K, Anselmo J, Vennström B, Schomburg L. *Serum copper as a novel biomarker for resistance to thyroid hormone*. Biochem J 2012; 443 (1): 103-9.
86. Angstwurm MWA, Schopohl J, Gaertner R. *Selenium substitution has no direct effect on thyroid hormone metabolism in critically ill patients*. Eur J Endocrinol 2004; 151 (1): 47-54.
87. Gross M, Oertel M, Köhrle J. *Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1*. Biochem J 1995; 306 (Pt3): 851-6.
88. Mittag J, Behrends T, Hoefig CS, Vennström B, Schomburg L. *Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice*. PLoS One 2010; 5 (9): 1-8.
89. Thorlacius-Ussing O, Flyvbjerg A, Jørgensen KD, Orskov H. *Growth hormone restores normal growth in selenium-treated rats without increase in circulating somatomedin C*. Acta Endocrinol (Copenh) 1988; 117 (1): 65-72.
90. Meltzer HM, Haug E. *Oral intake of selenium has no effect on the serum concentrations of growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-binding proteins 1 and 3 in healthy women*. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33 (7): 411-5.
91. Karl JP, Alemany JA, Koenig C, et al. *Diet, body composition, and physical fitness influences on IGF-I bioactivity in women*. Growth Horm IGF Res 2009; 19 (6): 491-6.
92. Roughead ZK, Lukaski HC. *Inadequate Copper Intake Reduces Serum Insulin-Like Growth Factor-I and Bone Strength in Growing Rats Fed Graded Amounts of Copper and Zinc*. J Nutr 2003; 133: 442-448.
93. Yu B, Fu WL, Liu PX. *Effects of Cu<sup>2+</sup> on growth hormone secretion of pig pituitary cells in culture*. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi 2008; 24 (1): 10-3.

- 94.** Lewinson D, Bialik GM, Hochberg Z. *Differential effects of hypothyroidism on the cartilage and the osteogenic process in the mandibular condyle: recovery by growth hormone and thyroxine.* Endocrinology 1994; 135(4): 1504-10.
- 95.** Gutch M, Philip R, Philip R, Toms A, Saran S, Gupta KK. *Skeletal manifestations of juvenile hypothyroidism and the impact of treatment on skeletal system.* Indian J Endocr Meta 2013; 17: 181-3.
- 96.** Wilhelm M, Wittsiepe J, Schrey P, Lajoie-Junge L, Busch V. *Dietary intake of arsenic, mercury and selenium by children from a German North Sea island using duplicate portion sampling.* J Trace Elem Med Biol 2003; 17 (2): 123-32.
- 97.** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin : de Gruyter, 2001.
- 98.** Dörner, K. Klinische Chemie und Hämatologie. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2006.
- 99.** Chakar A, Mokni R, Chappuis P, et al. *Selenium Status of Healthy Immigrant Parisian preschool children.* Biol Trace Elem Res 1993; 36 (1): 25-33.
- 100.** Piechotowski I, Weidner U, Zöllner I, Gabrio T, Link B, Schwenk M. *Serumselenkonzentrationen bei Schulkindern in Baden-Württemberg und ihre gesundheitliche Bewertung.* Gesundheitswesen 2002; 64 (11): 602-7.
- 101.** Biesalski HK, Berger MM, Brätter P, et al. *Kenntnisstand Selen – Ergebnisse des Hohenheimer Konsensusmeetings.* Akt Ernähr-Med 1997; 22: 224-231.
- 102.** Hofbauer LC, Spitzweg C, Magerstädt RA, Heufelder AE. *Selenium-induced thyroid dysfunction.* Postgrad Med J 1997; 73 (856): 103-4.
- 103.** National Neonatology Forum of India: *Neonatal sepsis.*  
<http://www.newbornwhocc.org/pdf/teaching-aids/neonatalesepsis.pdf> (abgerufen am 27.März 2013)
- 104.** Drewelow B, Reisinger EC. Therapie mit Antibiotika und Chemotherapeutika (Infektionen). In: Lemmer B, Brune K [Hrsg]. Pharmakotherapie Klinische Pharmakologie 14. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2010: 122-152.
- 105.** Tsukahara H, Deguchi Y, Hiraoka M, et al. *Urinary selenium excretion in infancy: comparison between term and preterm infants.* Biol Neonate 1996; 70 (1): 35-40.
- 106.** Meng W, Scriba PC. *Jodversorgung in Deutschland: Probleme und erforderliche Maßnahmen - Update 2002.* Dtsch Arztebl 2002; 99 (39): A 2560–64.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Blasig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zur Bestimmung von Selen aus Trockenblut und Zusammenhang von Selenstatus und Wachstumsregulation bei Kindern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **11 Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Lutz Schomburg für die Unterstützung, Geduld und die geweckte Begeisterung am experimentellen Arbeiten bedanken. Dr. Peter Kühnen möchte ich nicht nur für die Koordination bei der Überlassung der Serumproben aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie sondern auch für Anregungen und Kritik danken. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Hagen Stosnach von Bruker für die Unterstützung. Daneben möchte ich Magda Czuban, Dr. Eddy Rijntjes, Niels-Peter Becker, Antonia Hög und Nicole Pietschmann für die Hilfestellungen im Laboralltag und die nette Zusammenarbeit danken. Dank auch an Paulina Elzbieta Aleksander aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie. Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den freiwilligen Blutspendern.

Darüber hinaus danke ich meinem Freund Julius, meiner Schwester Anna und meinen Eltern für die stetige Motivation und Unterstützung.