

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

DISSERTATION

Die Bedeutung von Selen in der vegetarischen Ernährung und
in der Muttermilch

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Höflich

aus Ostercappeln

Gutachter: 1. Prof. Dr. L. Schomburg

2. Prof. Dr. Ch. J. Strasburger

3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Al-Hasani

Datum der Promotion: 03.09.2010

Danksagung

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Lutz Schomburg, der mich während der gesamten Zusammenarbeit immer wieder motiviert und es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde zu finden. Darüber hinaus stand er mir zuverlässig mit Rat und Wissen zur Seite.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Antonia Hög, Mette Stoedter und Kostja Renko, außerdem Birgit Hollenbach, Carolin Höfig und Thomas Behrends für die vielen konstruktiven Ideen und Hilfestellungen im Laboralltag, ohne die ich so manches Mal verzweifelt wäre. Ich möchte mich bedanken bei Jennifer Merz, Anita Kinne und Katrin Huhne, ohne deren Hilfe ich viele Methoden nie gelernt hätte und die mich immer mit guter Laune unterstützt haben.

Meiner Mutter Ingrid Höflich danke ich für die vielen kleinen Kraftpäckchen und die stetige Bestärkung, dass ich meinen Weg finden werde.

Einen herzlichen Dank an meine Freundinnen Fritzi Titzmann, Nina Peter und Andrea Vetter, die mit mir durch Auf und Ab gegangen sind, mir immer wieder Kraft geschenkt und sich tapfer beim Korrekturlesen geschlagen haben. Besonderer Dank gilt auch Matthias Schmelzer, der so oft ein offenes Ohr für meine Erfolge und Niederlagen hatte und für seine nützliche Kritik.

Allen Probandinnen und Probanden, die mir für die Ergebnisse Zeit, Milch und Blut zur Verfügung gestellt haben, ein herzliches Dankeschön.

Auch danke ich der Firma Bruker, insbesondere Hagen Stosnach für die Unterstützung bei der Vermessung meiner Proben im Picofox.

Nicht vergessen werden soll auch die Studienstiftung des deutschen Volkes, dank derer finanzieller Unterstützung ich überhaupt nur die Freiheit hatte, eine Doktorarbeit anzufertigen. Außerdem ein Dankeschön an den Institutsdirektor Prof. Dr. Josef Köhrle, der mit Interesse meinen Arbeitsprozess begleitet und mir freundlicherweise den Laborplatz zur Verfügung gestellt hat.

Und zu guter letzt danke ich Peter Hofmann, der mir die Freude an Perfektion und an wissenschaftlichen Laborstandards näher gebracht hat und Tonka Djekic, die das Herz unseres Labors ist.

Abkürzungsverzeichnis

BMD	Bone Mineral Density (Knochendichte)
BMI	Body Mass Index (Körpermasse [kg/m ²])
Ca	Calcium
CRP	C-Reaktives Protein
CTs	Coated Tubes (mit Antikörper beschichtete Reaktionsgefäße)
Cu	Kupfer
DAN	Diaminonaphthalin
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DIO	Jod-Thyronin-Dejodase(n)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eM	entrahmte Milch
ETA-AAS	Atomabsorptionsspektroskopie mit elektrothermischer Aufheizung
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Eisen
FM	Fluoreszenz-basierte Messmethode (Fluorimetrie)
GC	Gaschromatographie
GSH	reduziertes Glutathion
GPx	Glutathion-Peroxidase(n)
HRP	Horse Radish Peroxidase
IDMS	Isotop-Massenspektrometrie
Mn	Mangan
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, Boten-RNS
NGO	Non-Governmental Organization (Nichtregierungsorganisation)
pGPx	plasmatische Glutathion-Peroxidase(n), GPX-3
RLU	Relative Light Units (relative Lichtsignalstärke)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SBP2	SECIS-Bindendes Protein 2
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz
SeCys	Selenocystein
SeMet	Selenomethionin
SePP	Selenoprotein P

SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Einzelnukleotidpolymorphismen)
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TrxR	Thioredoxin-Reduktase(n)
VM	Vollmilch
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
zM	zellfreie Milch
Zn	Zink

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Selen	8
1.1.1 Selen und Gesundheit	10
1.1.2 Selenversorgung	13
1.1.3 Selenoproteine	16
1.1.4 Selenbestimmung: Selenoprotein P versus Gesamtselen	19
1.2 Vegetarische Ernährung	20
1.3 Muttermilch	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Materialien und Methoden	29
2.1 Probanden und Probenvorbereitung	29
2.1.1 Vegetarismus-Studie	29
2.1.2 Muttermilch	30
2.2 Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.1 Quantitativer Nachweis von Selenoprotein P	30
2.2.2 Qualitativer Nachweis (Western-Blot)	32
2.3 Enzymatische Bestimmung der Glutathion-Peroxidase	35
2.4 Zytokinbestimmung	37
2.5 Bestimmung von Spurenelementen	37
2.6 Datenauswertung und Statistik	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Vegetarismus-Studie	39
3.1.1 Selenoprotein P und Gesamtselen	40
3.1.2 pGPx	43
3.1.3 Zytokine	44
3.1.4 Spurenelemente und Elektrolyte	47
3.2 Muttermilch	51
3.2.1 Etablierung der SePP-Messung in humaner Muttermilch	53
3.2.3 GPx Messung	62
3.2.3 Spurenelemente und Elektrolyte	65
4. Diskussion	68
4.1. Vegetarismus-Studie	68
4.2 Selen	76

4.3 Selen in der Muttermilch	77
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	84
7. Selbständigkeitserklärung	92
8. Lebenslauf	93
9. Publikationsliste	94

Aufgrund meiner Überzeugung, dass Sprache – gelesen, gedacht und geschrieben – Bewusstsein und Einstellung prägt, habe ich mich in dieser Arbeit bewusst für eine gleichberechtigte Schreibweise entschieden. Wenn immer möglich habe ich Formen gewählt, die beide Geschlechter einschließen. War mir dies aus unumgänglichen Gründen nicht möglich, habe ich die Geschlechter in ihrer Nennung abgewechselt und schließe jeweils weibliche und männliche Personen mit ein. Ist aufgrund des Inhalts nur ein Geschlecht gemeint, habe ich dies ausdrücklich gekennzeichnet.

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Spurenelement Selen, den Selenoproteinen und der Versorgungssituation mit diesem essentiellen Spurenelement. Im Besonderen geht sie auf die Bedeutung dieses Mikronährstoffes in der vegetarischen bzw. veganen Ernährung ein und schenkt den Selenvorkommen in der Muttermilch gesondert Beachtung.

Es handelt sich bei der vorliegenden Dissertation um eine experimentell-wissenschaftliche Arbeit, die im Zeitraum vom Oktober 2006 bis Juni 2009 am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin erstellt wurde.

1.1 Selen

1817 entdeckte der schwedische Chemiker Jöns Jakob Berzelius ein neues Element, das er aufgrund seines silbrigen Glanzes nach der Mondgöttin Selene benannte. In den folgenden 150 Jahren wandelte sich die Bedeutung dieser neuen Substanz immer wieder. Nach der anfänglichen Besorgnis bezüglich der toxischen Eigenschaften von Selen galt es Anfang der 1940er Jahre als gesichertes Karzinogen und gewann erst in den späten 1950ern positive Anerkennung. Seit nunmehr 60 Jahren ist die Essentialität dieses Spurenelements gesichert und in den 1960er Jahren wurde Selen zusätzlich erstmals eine protektive Wirkung im Bezug auf die Gesundheitserhaltung zugeschrieben.¹

Wenn heute die Notwendigkeit von Selen nicht mehr von der Hand zu weisen ist, bleibt doch trotz allem die Frage, warum der tägliche Bedarf an Selen so lange unerkannt geblieben ist. Die Antwort darauf ist nicht ganz einfach, da sich konkrete selenabhängige Mangelerscheinungen nur schwerlich beschreiben lassen und nur bei extremer Unterversorgung deutlich sichtbar werden. Beim Menschen ist lediglich bei

drei seltenen Erkrankungen ein sicherer Zusammenhang mit einer Selenmangelversorgung nachgewiesen.² Die Keshan-Krankheit, als Erkrankung des Herzmuskels (Kardiomyopathie), kann entstehen, wenn es unter einem extremen Selenmangel zu einer zusätzlichen Infektion mit einem Coxsackie-Virus kommt. Dabei gilt der Selenmangel als zwingende Voraussetzung und die Virusinfektion als Kofaktor.² Tritt während der Schwangerschaft massiver Jodmangel auf, kann dies aufgrund der kongenitalen Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion) zu schweren körperlichen und geistigen Entwicklungsstörungen des Kindes führen, früher bezeichnet als Kretinismus (französisch: crétin = Idiot). Besteht während der Schwangerschaft zusätzlich eine Selenunterversorgung, kann dies eine angeborene Hypothyreose vom myxödematösen Typ zur Folge haben.²

Wahrscheinlich ebenfalls durch eine Kombination von Selen- und Jodmangel bei zusätzlicher Schimmelpilzbelastung kann es zur Kaschin-Beck-Krankheit kommen, was zu schweren Deformierungen der Extremitätengelenke führt, die in der Regel symmetrisch, aber an mehreren Gelenken gleichzeitig auftreten. Auch wenn die Ursachen für die Kaschin-Beck-Krankheit noch nicht ganz abschließend geklärt werden konnten, zeigen die endemische Verbreitung in Selenmangelgebieten und das gute Ansprechen auf therapeutische und präventive Selen-Jod-Kombipräparate einen klaren kausalen Zusammenhang auf.³

Darüber hinaus aber ist eine subklinische Selenunterversorgung schwer greifbar und es erfordert einen Blick auf den Wirkungsmechanismus von Selen, um zu verstehen, warum dieses Spurenelement auf der einen Seite essentiell, auf der anderen Seite aber ohne Mangelausprägungen zu sein scheint. Nach heutigem Stand der Wissenschaft erfolgt der Großteil des Seleneinflusses über die Wirkung der Selenoproteine, für die Selen ein essentieller Baustein ist. Diese Eiweiße sind wichtige enzymatische Bestandteile in Prozessen des Energiehaushaltes, da ihnen die wesentliche Kontrolle des Metabolismus der Schilddrüsenhormone unterliegt. Darüber hinaus unterstützen sie das Immunsystem und bilden Teile des Schutzprogramms vor schädlichen freien Radikalen, sog. reaktiven Sauerstoffspezies. Abgesehen davon kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Selenverbindungen nicht auch unabhängig von der enzymatischen Wirkung einen eigenständigen Einfluss auf bestimmte physiologische Prozesse haben.

Selen ist also daran beteiligt, dass die oben beschriebenen Abläufe reibungslos vonstatten gehen und unterstützt somit die Entwicklung des Nervensystems, sowie das

antikanzerogene und kardiovaskulär protektive Potenzial. Diese Unterstützung braucht der Organismus vor allem dann, wenn aufgrund von äußerlichen oder innerlichen Erschwernissen ein erhöhter Schutzbedarf erforderlich ist. In diesen Situationen kann eine Selenunterversorgung zum Tragen kommen, da ein reibungsloser Ablauf der physiologischen Prozesse verlangsamt oder gestört und der Körper somit anfälliger für schädigende Einflüsse wird. Da die Möglichkeiten für „erschwerte Bedingungen“ aber sehr vielfältig sind und jeder Mensch individuell reagiert, sind auch die Auswirkungen einer Selenunterversorgung höchstwahrscheinlich sehr unterschiedlich und nur in ihren Extremen zu verallgemeinern. Eine entscheidende Rolle wird dabei auch der individuelle Genotyp spielen, besonders im Hinblick auf Einzelnukleotidpolymorphismen (sog. single nucleotide polymorphisms, SNP) in selenabhängigen Enzymen und Biosynthesefaktoren.⁴ Darüber hinaus liegen bereits einige gesicherte experimentelle Daten und epidemiologische Korrelationen zur unterschiedlichen Wirkung eines Selenmangels bzw. einer Selensupplementation bei Frauen und Männern vor.⁵

In Anbetracht dieser indirekten Wirkung von Selen wird verständlich, dass eine Selenunterversorgung nicht zu offensichtlichen Mangelsymptomen im herkömmlichen Sinne führt. Vielmehr trägt Selen dazu bei, das grundsätzliche Gesundheitspotenzial des Menschen zu verstärken und einem Milieu für krankhafte Zustände entgegen zu wirken. Dies zeigt sich in einer reduzierten Suszeptibilität für eine Reihe altersabhängiger Erkrankungen und in einer wahrscheinlich verbesserten Konvaleszenz (nach erfolgter Erkrankung), auch wenn es für letztere Aussage zurzeit erst wenig konkrete Daten gibt.

1.1.1 Selen und Gesundheit

Wie auf die Wirkung von Selen zugeschnitten scheint der Ausspruch von Paracelsus (* 1493 – † 1541), wenn er sagte: „*Dosis sola venenum facit*“ – Allein die Menge macht das Gift, denn neben den vielfältigen positiven Auswirkungen von Selen führt eine Überdosis zur Selenvergiftung. Die akuten Symptome einer solchen Vergiftung äußern sich als gastrointestinale Beschwerden, akutem Nierenversagen, nach Knoblauch oder faulem Rettich riechende Atemluft – oft einhergehend mit Atemproblemen – Brady- oder Tachykardien (zu langsamer oder zu schneller Herzschlag) und Blutdruckabfall mit möglichem tödlichen Ausgang sowie Rotpigmentierung der Haut.^{6,7} Aufgrund einer relativ hohen therapeutischen Breite (im Vergleich zu anderen handelsüblichen Medikamenten) ist die Gefahr einer Überdosierung aber verhältnismäßig gering, da die

für eine Vergiftung erforderliche Konzentration fast zehnfach über der liegt, die zu prophylaktischen oder therapeutischen Zwecken angestrebt wird.⁸

1987 publizierten Salonen et al. einen allgemeinen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Krebsrisiko und niedrigen Selenspiegeln.⁹ Mittlerweile weisen immer mehr Studien darauf hin, dass vor allem Männer mit geringen Selenausgangswerten von einer Selensupplementation profitieren, wenn es darum geht, die Inzidenz für bösartigen Lungen-, Dickdarm- und Prostatakrebs zu verringern.¹⁰⁻¹⁶

Bis heute sind die genauen molekularen Zusammenhänge unklar, die dazu führen, dass Selen zur Prävention bestimmter Krebsarten beiträgt. Diskussionsgrundlage ist nach wie vor eine zufuhrabhängige Optimierung der Expression der Selenoproteine Glutathion-Peroxidase (GPx) und Thioredoxin-Reduktase (TrxR), die am Abbau von aktivierten und reaktiven Sauerstoffspezies bzw. deren Oxidationsprodukten beteiligt sind.¹⁷

Wie vielversprechend die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen sind, zeigt die Tatsache, dass immer mehr groß angelegte Studien die Selenversorgung zum Kernpunkt ihrer Fragestellung machen. Mit der SELECT-Studie (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) wurde in den USA eine der größten klinischen randomisierten Doppelblindstudien gestartet, die über einen Zeitraum von sieben bis zwölf Jahren mehr als 35.000 Männer in Bezug auf die Inzidenz von Prostatakrebs untersuchen und mögliche protektive Effekte von Selen und Vitamin E als Monotherapie oder in Kombination aufzeigen wollte.¹⁸ Ende Oktober 2008 wurde die SELECT-Studie vorzeitig abgebrochen, da keine Anzeichen für eine Prostatakrebsreduktion abzusehen waren.¹⁹ Es bleibt zu diskutieren, ob das Studiendesign für das Scheitern der Studie verantwortlich war, ob die gewählte Selenform (Selenomethionin) verantwortlich ist, und in wie weit ältere US-amerikanische Männer mit exzellentem Selenstatus als ausgewählte Stichprobe repräsentativ für eine generelle Aussage bezüglich der Selenwirksamkeit in der Tumorprävention zulässig sind.²⁰

Aber nicht nur in der Krebsprävention wird der Selenstatus zusehends als wichtiger Parameter erkannt. 2007 konnten Nawrot et al. zeigen, dass ein Anstieg der Serumselenkonzentration um 20 µg/l mit einem Abfall des systolischen Blutdrucks um 2 mmHg korreliert. Eine Senkung des systolischen Blutdrucks um 2 mmHg verspricht wiederum eine Minderung der Schlaganfallhäufigkeit um 10% und eine Reduktion der koronaren Herzerkrankung um 7%. Interessanterweise konnte dieser Zusammenhang

zwischen Gesamtselenkonzentration im Blut und systolischem wie diastolischem Blutdruck nur bei Männern nachgewiesen werden.²¹ Diese Ergebnisse werden durch eine epidemiologische Auswertung aus dem Jahre 1982 unterstützt, die die Daten von 11.000 Menschen im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie auswertete. Am Ende konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedrigeren Selenkonzentrationen und dem Risiko für koronare Herzerkrankungen (KHK) und Myokardinfarkte aufgezeigt werden. Bezogen auf die Herzinfarkte war darüber hinaus noch ein negativer Zusammenhang mit der Mortalitätsrate feststellbar.²²

Neben dem viel diskutierten antikanzerogenen und kardioprotektiven Potential gibt es mittlerweile auch mehrere interessante Untersuchungen, die einen positiven Zusammenhang zwischen hoch dosierten Selengaben und besserer Überlebenschance bei Sepsis und septischem Schock aufzeigen.²³ Weitere Studien wären wünschenswert, um die Ergebnisse zu sichern und zu spezifizieren.

Erfreulicherweise gibt es zusätzlich zu den bisher besprochenen positiven Auswirkungen auf Erkrankungen, die vor allem die westlichen Industrienationen betreffen, auch Untersuchungen, die sich mit Infektionskrankheiten befassen und sich damit auch mit den Belangen der Länder des Südens auseinandersetzen. Eine These besagt, dass die chronische Selenunterversorgung in weiten Teilen Chinas für die dort immer neu entstehenden Influenza-Mutationen mitverantwortlich ist und die dauerhafte Mangelversorgung von Selen in Zaire den dort erstmalig beschriebenen Übertritt des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) auf den Menschen erklären könnte.²⁴ Diese auf den ersten Blick zusammenhangslos erscheinenden Thesen können durch die Bedeutung von Selen auf die Umwandlung von apathogenen zu neu pathogenen Viren verständlicher werden. Besonders eindrücklich konnte dieser Einfluss am Beispiel eines in der Regel für den Menschen harmlosen Cocksackie-Virus-Stammes gezeigt werden. In absoluten Selenmangelgebieten Chinas erzeugt eine mutierte Variante dieser Virusfamilie die oben bereits erwähnte Keshan-Krankheit. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die mutierten Viren auch in Tieren, die ausreichend mit Selen versorgt waren, zur Keshan-Krankheit führen, was auf die Irreversibilität der Virulenz hinweist. Interessanterweise scheint das Fehlen der körpereigenen GPx – die zusätzlich zu den Wirtszellen auch das Virusgenom vor Mutation schützen würde – für die entstehende Virulenz verantwortlich zu sein.²⁵ Sollte sich dieses Prinzip auch auf andere Virusfamilien übertragen lassen, könnte sich daraus eine grundlegend neue Form der Infektionsprophylaxe entwickeln, die auch in finanzieller Hinsicht für die

Länder des Südens sehr erfreulich wäre. Dabei wäre aber vor allem auch die grundlegende Verbesserung der Ernährungssituation wünschenswert und den positiven Wirkungen des Selen zuträglich. Im schlimmsten Fall könnten sonst solche Supplementationsansätze durch unerwartete Interaktionen zwar die Verbesserung des Selenstatus schaffen, gleichzeitig aber durch mögliche Störungen der anderen Mineralstoffwechselwege neue Gesundheitsrisiken hervorrufen.

Führt man sich all die positiven Auswirkungen von Selen vor Augen, so verwundert es nicht, dass immer mehr Menschen von diesen Eigenschaften des Spurenelements profitieren wollen und daher zunehmend Nahrungsergänzungsmittel konsumiert werden. Dieser Trend spiegelt sich auch in der Auswertung der Nationalen Verzehrstudie II wider, derzufolge insgesamt 28% der Befragten (31% der Frauen und 24% der Männer) regelmäßig Nahrungsergänzungsmittel einnehmen.²⁶ Es ist daher von großer Bedeutung, die Auswirkungen der einzelnen Spurenelemente näher zu untersuchen. Einerseits um positive Effekte besser verstehen und gezielter einsetzen zu können, aber andererseits auch, um einer unreflektierten Selbstmedikation fundiertes Wissen entgegen zu setzen.

1.1.2 Selenversorgung

Unsere tägliche Aufnahme von Selen erfolgt über die Nahrung, die wir zu uns nehmen. Dabei variiert die Selenkonzentration der unterschiedlichen Nahrungsmittel erheblich. Doch nicht nur zwischen verschiedenen Lebensmitteln gibt es große Unterschiede, sondern auch innerhalb eines Nahrungsmitteltyps ist die enthaltene Selenmenge keineswegs konstant. So enthält 1 kg Weizen ca. 2 mg Selen, wenn er in den USA angebaut wurde, ca. 0,11 mg Selen, wenn er auf Neuseeland gewachsen ist und nur 0,005 mg Selen, wenn er aus der Provinz Shaanxi in China stammt.²⁷ Dies hat zur Folge, dass Aussagen über selenreiche bzw. selenarme Nahrungsmittel keineswegs trivial sind und Angaben über zu erwartende Selenkonzentrationen nur schwer zu treffen, mit Sicherheit aber nicht ohne weiteres von einem Land auf ein anders zu übertragen sind. Allein in den USA liegt der mittlere Variationskoeffizient der Selenkonzentration eines Nahrungsmittels bei 32% und ist damit viermal so hoch wie für jedes andere Spurenelement (siehe auch Tab. 1).¹ Die Ursache dieser – auf den ersten Blick chaotischen – Verteilung liegt in den geographisch unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Boden.²⁸ Der Großteil des Selen gelangt über die Pflanzen in

den Nahrungskreislauf von Tieren und Menschen. Dabei nehmen Pflanzen Selen in Abhängigkeit von der im Boden vorhandenen Konzentration auf (Abb. 1).

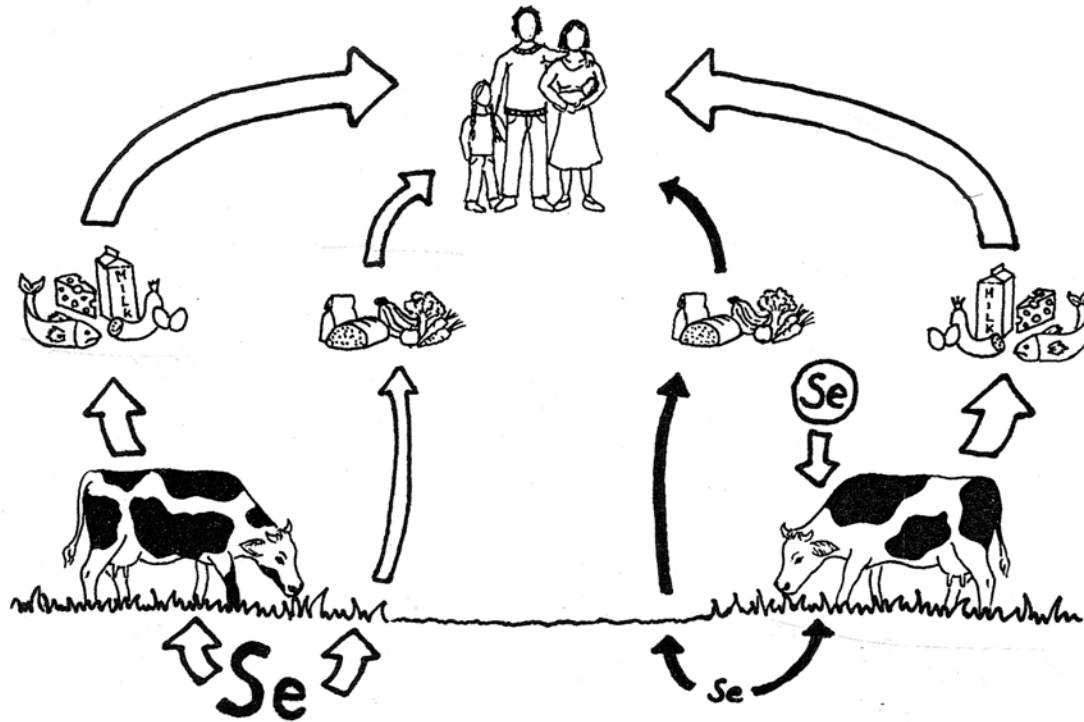


Abb. 1

Selenkreislauf: Boden – Pflanze – (Tier) – Mensch. In Abhängigkeit von der im Boden vorkommenden Konzentration und bioverfügbaren Form wird Selen von den Pflanzen aufgenommen. In selenreichen Gegenden (linke Bildhälfte) kann der alleinige Verzehr pflanzlicher Produkte daher ausreichen, um den täglichen Bedarf an Selen zu decken, auch wenn tierische Produkte deutlich höhere Konzentrationen aufweisen. Im Gegensatz dazu birgt eine vegetarische oder sogar vegane Ernährung in selenarmen Regionen (rechte Bildhälfte) die Gefahr einer Selenunterversorgung, wohingegen tierische Produkte aufgrund des mit Selen angereicherten Tierfutters weiterhin eine sichere Quelle darstellen.

Zusätzlich wird die Fähigkeit zur Selenaufnahme von der Feuchtigkeit und dem pH-Wert des Bodens beeinflusst.²⁹ Nur sehr wenige Pflanzen sind in der Lage, Selen unabhängig von der vorherrschenden Bodenkonzentration anzureichern.³⁰ Um für die Bevölkerung trotzdem eine höhere Selenzufuhr über die Nahrung zu ermöglichen, stellt die konsequente Erhöhung der Selenbodenkonzentration mittels Düngemittel eine umsetzbare Möglichkeit dar. Angelehnt an das Prinzip, durch Speisesalzjodierung

einem endemischen Jodmangel vorzubeugen, hat Finnland als einziges Land durch Düngemittelvorschriften eine flächendeckende Erhöhung der Selenkonzentration erreichen können.³¹

In der Regel stellen Getreide, Fleisch und Fisch die Hauptquellen für Selen dar, wobei entweder eine hohe Selenkonzentration (wie in Fleisch und Fisch) oder der Verzehr großer Mengen (im Falle von Getreide) Voraussetzungen sind.¹ Getreide unterliegt dabei den größten Schwankungen, was den prozentualen Beitrag für die Selenversorgung betrifft, während die relativ konstanten Konzentrationen durch tierische Produkte über selenangereichertes Futter der Tiere gewährleistet wird.²⁹ Tab. 1 gibt einen Überblick über die Variation der Selenkonzentration in den verschiedenen Nahrungsmittelgruppen unterschiedlicher Regionen der Erde.

Tab. 1
Selenkonzentrationen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in Nahrungsmittel verschiedener Länder

Nahrungsmittel	GB	Irland	USA	Thailand	Australien	Neuseeland
Brot	43-92	15-158	282-366	-	92,6-125	31,6-59,4
Reis	4-13	10-17	75	29-65	25	0
Rind	30-76	61-105	134-190	72-226	72-121	22,3-83
Schwein	140	82-129	144-450	142-250	94-205	19,3-150
Huhn	60-70	86-147	190-276	156-271	116-280	137-145
Eier	90-120	56-282	225-308	145-420	190-414	157-161
Fisch	200-500	268-298	126-502	196-1137	20-632	195-512
Milch	10-15	14-22	20-21	19-36	2,5-25,9	1-14
Käse	7,4-12	9,5-11,5	13,9	-	70-78,9	23
Gemüse/Obst	3-22	10-38	2-19	1-127	0,5-32	0-2,5
Pilze	90	25-38	88	8-15	255	76,6
Erdnüsse	30	-	75	32-186	140	46-105

Reilly C, *Selenium in Food and Health*, 2006

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Boden, der unterschiedlichen Ernährungsweisen und spezifischen Verfügbarkeiten von organischen bzw. anorganischen Selenformen, ist eine pauschale Empfehlung für die Höhe der täglichen Selenaufnahme sehr schwierig. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt für Erwachsene eine tägliche Aufnahme von 30 – 70 μg Selen.³² Je nach Land und Situation des Individuums variiert der Bedarf aber erheblich,

sodass dieser Wert nur als annähernde Orientierung für gesunde Menschen angesehen werden sollten. Derzeit gelten 200 µg Selen pro Tag als Richtwert für eine mögliche Krebsprophylaxe.^{33,34} Als Obergrenze werden von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) ca. 850 µg pro Tag angegeben.³⁵ Datenauswertungen der Selenversorgung in China kommen zu ähnlichen Ergebnissen.^{36,37} Die letzten Daten zur mittleren täglichen Selenaufnahme in Deutschland stammen von Oster et al., und belegen, dass unsere Selenversorgung mit ca. 50 µg Selen/Tag suboptimal ist.²⁴

1.1.3 Selenoproteine

Selenoproteine stellen aufgrund ihrer Katalyseeigenschaften eine besondere Gruppe von Eiweißen dar, in der sich die evolutionäre Bedeutung der Selenoproteine widerspiegelt. Selen kann über die zwei Aminosäuren Selenomethionin (SeMet) und Selenocystein (SeCys) konstituierender Teil der Polypeptidketten werden. Dabei wird SeMet äquivalent zum schwefelhaltigen Methionin in Proteine eingebaut und verleiht den entsprechenden Proteinen keine gesonderte eigenständige Funktion. Die so entstandenen Proteine sind sehr selten, und durch die nicht festgelegte Position des SeMet-Einbaus erfüllen sie generell in gleicher Art und Weise ihre Aufgaben wie üblich. Im Gegensatz dazu wird SeCys über einen spezifischen Mechanismus gezielt in die laufende Proteinsynthese eingefügt und bildet damit die essentielle Grundlage für die Entstehung von Selenoproteinen. Bisher sind 25 humane Gene identifiziert worden, die für Selenoproteine kodieren (siehe Tab. 2), wobei die spezifischen Funktionen der einzelnen Proteine noch nicht vollständig geklärt werden konnte.³⁸

Elf der 25 Proteine zeigen strukturelle Verwandtschaft und können in drei Familien zusammengefasst werden: GPx, TrxR und Jod-Thyronin-Dejodasen (DIO). Drei weitere Selenoproteine (SPS2, MsrB und SePP) konnten zwar nicht in eine der drei Familien eingeordnet, in ihrer Funktion aber zumindest teilweise bestimmt werden. Trotz der noch ungeklärten Aufgaben der übrigen elf besteht die Annahme, dass Selenocystein in der Regel einen zentralen Bestandteil der aktiven Zentren darstellt³⁹, sodass die biologische Funktion aller 25 Selenoproteine auf den Einbau von SeCys angewiesen sein dürfte.

Tab. 2

Selenoproteom des Menschen³⁸Familie der Glutathion-Peroxidasen (GPx)

zelluläre GPx	cGPx, GPx-1	Abbau von Peroxiden im Zytosol der Zelle aller Organe
gastrointestinale GPx	GI-GPx, GPx-2	Abbau von Peroxiden im Magen-Darm-Trakt
plasma GPx	pGPx, GPx-3	Abbau von Peroxiden im Blut
Phospholipid-		
Hydroperoxid GPx	PH-GPx, GPx-4	Abbau von Membran-Peroxiden, Arachidonsäurestoffwechsel
Riechepithel-GPx	GPx-6	Abbau von Peroxiden im Embryo und im Riechepithel

Familie der Thioredoxin-Reduktasen (TrxR)

zytosolische TrxR	TrxR1	Bestandteil des zytosolischen Redoxsystems
mitochondriale TrxR	TrxR2	Bestandteil des mitochondrialen Redoxsystems
hodenspezifische TrxR	TrxR3	Bestandteil des testikulären Redoxsystems

Familie der Jod-Thyronin-Dejodasen (DIO)

5'-DIO, Typ 1	DIO1, 5'D1	In- und Aktivierung von Thyroxin und T3 in Leber, Niere, usw.
5'-DIO, Typ 2	DIO2, 5'D2	Aktivierung von Thyroxin zu T3, besonders im Gehirn
5-DIO, Typ 3	DIO3, 5D3	Inaktivierung von Thyroxin und T3 zu rT3 bzw. T2

Selenophosphat-

Synthetase 2	SPS2	Aktivierung von Selen durch ATP zu Seleno-Phosphat
--------------	------	--

Methionin-Sulfoxid-

Reduktase B	MsrB	Reduktion von Methionin-Sulfoxid zu Methionin
Selenoprotein P	SePP	Plasma-Transport und Speicherung von Selen

Selenoprotein 15, H, I, K, M,
N, O, S, T, V und W

biologische Funktion bisher noch unbekannt

Schon 1990 konnte gezeigt werden⁴⁰, dass für die Synthese von Selenoproteinen im Säugerorganismus dem bekannten Stopp-Codon UGA die zusätzliche Bedeutung zur Einfügung von SeCys zukommt. Damit stellt Selen das einzige derzeit bekannte Spurenelement dar, das über eine eigene Codierung im genetischen Code verfügt.³⁸

Interessanterweise wird SeCys aber nicht wie alle anderen Aminosäuren als Ganzes an die entsprechende tRNA gekoppelt, sondern die Synthese des SeCys selbst erfolgt an einer Seryl beladenen tRNA. In zum Teil aufwendigen Schritten wird Selen dafür im Vorfeld aus den jeweiligen Molekülen freigesetzt, zu Selenid reduziert und anschließend unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Mit Hilfe der Selenocysteinyl-Synthase wird die endständige phosphorylierte Hydroxylgruppe des Serins – das bereits an die tRNA gekoppelt ist – durch eine Selenidgruppe ersetzt, wobei sowohl das aktivierte

Selenophosphat als auch die aktivierte Hydroxylgruppe des Seryl-Restes als energiereiche Substrate fungieren. Die nun entstandene Selenocysteinyl-tRNA steht dann für die Proteinbiosynthese zur Verfügung.^{41,42}

Doch dieser komplexe Vorgang allein reicht nicht aus, um die Bildung spezifischer Selenoproteine zu gewährleisten. In bisher einzigartiger Weise wird der Doppeldeutigkeit des Basentriplets UGA begegnet und ein gezieltes Einbauen von SeCys ermöglicht. Dafür erforderlich ist das Vorhandensein einer Haarnadelstruktur im untranslatierten-3'-Bereich des Transkriptes, die als Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS-Element) bezeichnet wird. Spezifische SECIS-bindende Proteine (SBP2) binden an die Haarnadelstruktur der aktuellen mRNA und stellen die Verbindung für weitere Elongationsfaktoren (z.B. EFsec) her, die schlussendlich die Interpretation des UGA-Triplets und den Einbau von Selenocystein ermöglichen (Abb. 2).⁴²

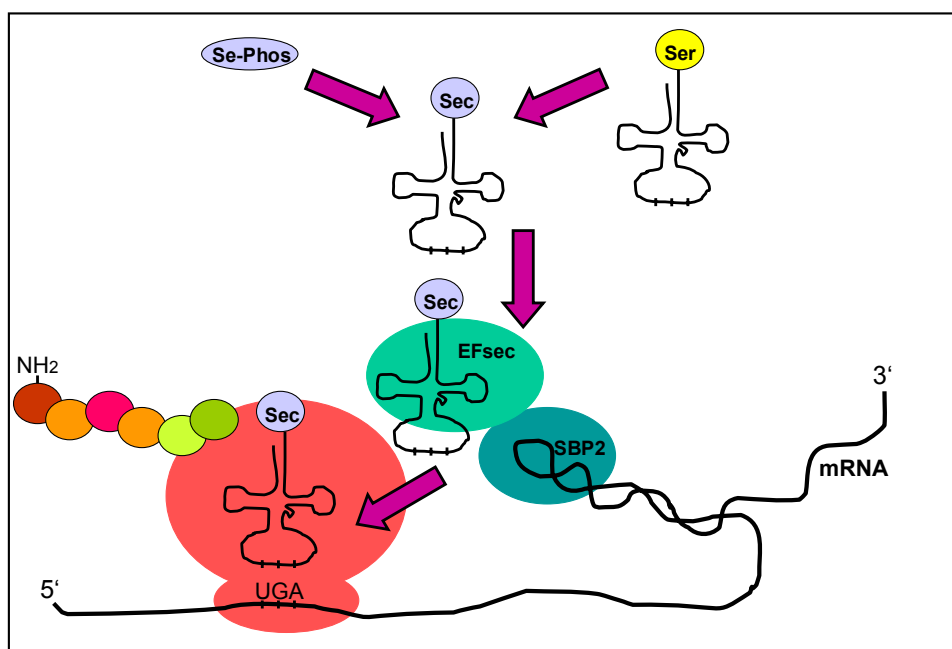


Abb. 2

Proteinbiosynthese von Selenoproteinen.

Das aktivierte Selenophosphat (Se-Phos) wird mit Hilfe der Selenocysteinyl-Synthase im Austausch mit der phosphorylierten Hydroxylgruppe des Serins an die Ser-tRNA gekoppelt, sodass Sec-tRNA entsteht. Eine Haarnadelstruktur (SECIS) im Transkript erlaubt die spezifische Interaktion mit SECIS-bindenden Proteinen (SBP2), die für den Sec-Einbau essentiell sind. Weitere Sec-spezifische Elongationsfaktoren (EFsec) bilden die Brücke zur Sec-tRNA, die anstelle eines Kettenabbruchs beim Basentriplett UGA in die laufende Polypeptidkette eingebaut wird.

Jeglicher Fehler in dieser komplexen Kette führt unweigerlich zum Abbruch der aktuellen Proteinkette, da keine Insertion von SeCys erfolgen kann und somit UGA als Stopp-Codon interpretiert wird. Diese Nonsense-Polypeptide werden in aller Regel dem zelleigenen Verdauungssystem zugeführt und unverzüglich wieder in die einzelnen Aminosäuren zerlegt. Im Gegensatz zu SeMet kann bereits eingebautes SeCys nicht einfach für die nächste Proteinbiosynthese genutzt werden, da der oben beschriebene Mechanismus zur Beladung der tRNA notwendig ist. Mit Hilfe einer Selenocystein-spezifischen- β -Lyase wird Selen daher aus SeCys abgespalten und steht erst danach wieder für die Phosphorylierung bereit. Soll das in SeMet enthaltene Selen verwertet werden, so muss zuerst eine Transselenierung von SeMet zu SeCys erfolgen, bevor das Selen wie gerade gezeigt abgespalten werden kann.⁴³

Den prozentual größten Anteil der zirkulierenden Selenoproteine stellt das im Blut nachweisbare Selenoprotein P (SePP) dar. Für seine Synthese in den Hepatozyten wird ein Großteil des über die Nahrung zur Verfügung gestellten Selens verbraucht, welches vom Darm über die Pfortader direkt in die Leber gelangt. Dort kann es für die Proteinbiosynthese von SePP genutzt werden und gelangt dann nach der Sekretion des selenreichen SePP über den Blutstrom zu allen Organen und Geweben des Körpers. SePP kann nun von den Zellen aufgenommen, verstoffwechselt und das frei werdende Selen für die Neusynthese anderer Selenoproteine genutzt werden.⁴⁴

1.1.4 Selenbestimmung: Selenoprotein P versus Gesamtselen

Für die Bestimmung von Selen stehen heute eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, wobei ein qualitativer Nachweis so gut wie keine diagnostische Bedeutung mehr hat. Bis vor kurzem stellte daher die Gesamtselenbestimmung die Nachweismethode der Wahl dar, sowohl für wissenschaftliche als auch für diagnostische Fragestellungen. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse bezüglich der Rückschlussmöglichkeit auf die tatsächliche bioaktive Selenversorgung ist aber begrenzt. Bei hohen Konzentrationen von SeMet werden hohe Gesamtselenkonzentrationen gemessen, auch wenn SeMet nur im prozentualen Verhältnis zu Methionin unspezifisch in die Proteine eingebaut wird und keine eigene Funktion aufweist. Auch nicht verwendetes, anorganisches Selen wird in die Messung mit einbezogen. Somit werden qualitativ unterschiedliche Aussagen vermischt, und sowohl die essentielle Syntheseleistung Selenocystein-tRNA zu bilden – und damit die notwendige Grundvoraussetzung für die Proteinbiosynthese von

Selenoproteinen – als auch die Konzentration und Abfolge der notwendigen Bindungselemente (SECIS, SBP2 etc.) entzieht sich dabei der Beurteilbarkeit.

Jegliche Störung, Behinderung oder Verlangsamung in der Biosynthese der Selenocystein-tRNA sowie der nachfolgende Ablauf des tatsächlichen Einbaus, wird durch die Gesamtselenbestimmung verschleiert, da trotz hoher Gesamtselenkonzentrationen ein Mangel an Selenoproteinen vorliegen kann.

Im Gegensatz dazu erlaubt die Bestimmung von SePP eine tatsächliche Einschätzung des derzeitig nutz- und verwertbaren Selens, da kein weiteres Protein so viel SeCys beinhaltet und als Selentransporter fungiert. Aus diesem Grund stellt die Messung von SePP eine weitaus differenziertere und aussagekräftigere Bestimmungsmethode dar, die brauchbare Ergebnisse für eine Interpretation der derzeitigen individuellen Selenversorgung und Nutzungskapazität liefert.^{45,46}

„It is the position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada that appropriately planned vegetarian diets are healthful, nutritionally adequate, and provide health benefits in the prevention and treatment of certain diseases.“⁴⁷

1.2 Vegetarische Ernährung

Immer mehr Menschen in Deutschland entscheiden sich bewusst für eine Ernährungsweise, die ganz oder teilweise auf tierische Produkte verzichtet. Die Motivationen für diese Entscheidung sind sehr vielfältig und reichen von gesundheitlichen und religiösen Gründen, über Tierliebe, bis zu politischen und ethischen Argumenten. Diese Vielfalt an Beweggründen sorgt dafür, dass es unzählige individuelle Formen gibt, eine vegetarische Ernährung zu leben, die häufig fließend ineinander übergehen. Definitionsgemäß unterscheidet man Ernährungsformen, die lediglich Fleisch, Fisch und Geflügel meiden, von denen, die zusätzlich Eier und/oder Milch ablehnen. Werden überhaupt keine tierischen Produkte konsumiert, spricht man von veganer Ernährung als extremste Form der vegetarischen Ernährung (Tab. 3).⁴⁸

Konkrete Angaben, wie viele Menschen in Deutschland derzeit vegetarisch leben, sind schwer zu erheben und teilweise widersprüchlich. Da es sich unter anderem um ein kulturelles Phänomen handelt, das nicht unabhängig vom jeweiligen Hintergrund der Person ist, hängen die Ergebnisse sehr von der jeweiligen Stichprobe ab. So ist zum Beispiel der Prozentsatz an Menschen mit vegetarischer Ernährung in den Städten

grundsätzlich höher als auf dem Land und jüngere Menschen neigen eher dazu, eine neue Ernährungsform auszuprobieren, als ältere. Darüber hinaus beinhalten bestimmte religiöse Gruppen (Siebenten-Tags-Adventisten, Hindus, Buddhisten und andere) eindeutige Regeln für eine vegetarische Ernährung als konstituierenden Bestandteil der Religionsausübung im Alltag.

Tab. 3

Unterteilung der unterschiedlichen vegetarischen Ernährungsformen.

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Ernährung ohne:</u>
Ovo-Lakto-Vegetarisch	Fleisch, Fisch und Geflügel
Lakto-Vegetarisch	Fleisch, Fisch, Geflügel und Eier
Ovo-Vegetarisch	Fleisch, Fisch, Geflügel und Milchprodukte
Vegan	Jegliche vom Tier stammende Lebensmittel, zum Teil auch Verzicht auf Wolle, Leder und andere nicht essbare tierische Produkte.

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Hauptrichtungen gibt es viele individuelle Abwandlungen. Die Grenzen zwischen den jeweiligen Untergruppen sind häufig fließend.

Im Rahmen der Nationalen Verzehrsstudie von 2007 wurden knapp 20.000 Bürgerinnen und Bürger aus Deutschland im Alter von 14 bis 80 Jahren bezüglich ihres Essverhaltens befragt. 1,6% der Deutschen gaben dabei an, sich vegetarisch zu ernähren. Doch es ist zu beachten, dass über 70% der Befragten über 35 Jahre alt waren und sich der Prozentsatz in den jüngeren Alterstufen, vor allem zwischen dem 14. und 34. Lebensjahr, zugunsten der fleischlosen Ernährung verschiebt. 0,1% aller Befragten gaben an, vegan zu leben.²⁶

Ein Jahr zuvor erhob das Marktforschungsinstitut Produkt + Markt ebenfalls Daten zur Anzahl von vegetarisch lebenden Menschen in Deutschland. Die Ergebnisse wurden von verschiedenen Nichtregierungsorganisationen (NGOs) unterschiedlich interpretiert. So geht die Tierschutzorganisation PETA⁴⁹ von 7,3% und die Europäische Vegetarier-Union⁵⁰ sogar von 9% Vegetarierinnen in der Gesamtbevölkerung aus. Der Vegetarierbund Deutschland fasst die Erhebung des FORSA-Instituts mit den Umfragenergebnissen der Magazine Stern und Focus zusammen und kommt auf knapp 8%.⁵¹

Vergleicht man diese Zahlen mit entsprechenden Ergebnissen aus den USA und Kanada, so leben dem Position Paper der American Dietetic Association and Dietitians

of Canada zufolge 2,5% der amerikanischen Bevölkerung vegetarisch und 4% der Kanadierinnen.⁴⁷

Wie auch immer man die Daten für die Bundesrepublik Deutschland interpretiert, ernähren sich selbst nach den niedrigsten Schätzungen mindestens 1,5 Millionen Menschen vollkommen ohne Fleisch, Fisch und Geflügel. Es ist daher angebracht, sich mit den gesundheitlichen Bedürfnissen dieser Gruppe weiter auseinander zu setzen, um mögliche Unterschiede aufzuzeigen und eventuelle Risiken frühzeitig erkennen zu können. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft bietet eine vegetarische oder vegane Ernährung keinen gesundheitlichen Nachteil und fördert sogar die Minimierung der Risikofaktoren Übergewicht, Bluthochdruck und erhöhte Cholesterinwerte. Dies gilt nachweislich für jede Lebensphase.^{47,48} Nichtsdestotrotz warnen nach wie vor unterschiedliche Studien vor Mangelversorgungen einzelner Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente bei vegetarisch lebenden Menschen. Die Daten sind in ihren Ergebnissen aber teilweise sehr widersprüchlich.

Auch im Bezug auf die Selenversorgung zeigt sich in der Literatur ein sehr buntes Bild (Tab. 4) und reicht von signifikant erniedrigten bis zu signifikant erhöhten Werten.

Tab. 4

Übersicht der aktuellen Studienlage zur Selenversorgung von vegetarisch lebenden Menschen im Vergleich zur omnivoren Vergleichsgruppe.

Studie	Land	Vegetarische Gruppe	Vegane Gruppe
Shultz & Leklem (1983) ⁵²	USA	kein signifikanter Unterschied	nicht untersucht
Akesson & Ockerman (1985) ⁵³	Schweden	signifikant niedrigere Werte	kein signifikanter Unterschied
Srikumar et al. (1992) ⁵⁴	Schweden	signifikant niedrigere Werte	nicht untersucht
Krajcovicova et al. (1995) ⁵⁵	Slowakei	signifikant höhere Werte	nicht untersucht
Rauma et al. (1995) ⁵⁶	Finnland	nicht untersucht	kein signifikanter Unterschied
Meissner (1997) ⁵⁷	Deutschland	kein signifikanter Unterschied	nicht untersucht
Dhindsa et al. (1998) ⁵⁸	Australien	kein signifikanter Unterschied	nicht untersucht
de Bortoli & Cozzolino (2008) ⁵⁹	Brasilien	kein signifikanter Unterschied	nicht untersucht

Häufig findet sich auch kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Dabei muss angemerkt werden, dass vor allem die neuen großen Studien, wie die EPIC-Oxford Kohorte (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) als eine der größten Ernährungsstudien weltweit, der Selenversorgung unter vegetarischer Ernährung keine Beachtung schenken.⁶⁰

Weitere Studien befassen sich lediglich mit der täglichen Selenzufuhr durch vegetarisches Essen, nicht aber mit dem tatsächlich aufgenommenen Selen oder dem resultierenden Selenstatus der Menschen, wobei auch dort die Interpretationen bezüglich der Selenversorgung auseinander gehen und unterschiedliche Empfehlungen gegeben werden.⁶¹⁻⁶⁴

Zusammenfassend kann daher keine grundsätzliche Aussage über die Selenversorgung unter vegetarischer Ernährung in Deutschland getroffen werden. Nicht zuletzt, da sich nur eine einzige Studie mit der Selenkonzentration von vegetarisch lebenden Menschen in Deutschland befasst. Aufgrund des bereits oben eingeführten direkten Zusammenhangs zwischen der Selenkonzentration in der Nahrung und im Boden, ist eine aktuelle Untersuchung zur Selenversorgung bei vegetarischer Ernährung in Deutschland wünschenswert, die auch Menschen mit veganer Ernährung einschließt.

1.3 Muttermilch

Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt Muttermilch die optimale Ernährung während der ersten sechs Lebensmonate dar, und jegliche Zugabe von Essen oder Trinken – einschließlich Wasser – ist während dieser Zeit für voll gestillte Säuglinge überflüssig.⁶⁵

Muttermilch ist bezüglich ihrer Inhaltsstoffe optimal auf die Bedürfnisse des Neugeborenen abgestimmt und die meisten Mikronährstoffe sind innerhalb gewisser Schranken gleich bleibend in ihrer Konzentration, unabhängig von der aktuellen Versorgung der Mutter. Lediglich die Spurenelemente Jod, Fluor, Mangan und Selen sowie die wasserlöslichen B-Vitamine 2, 5, 6 und 12 sind von der täglichen Aufnahme der Mutter abhängig.⁶⁶

Die Besonderheit von Frauenmilch, sich stetig den wachsenden Bedürfnissen des Kindes anzupassen, zeigt sich neben der optimalen Nährstoff- und Energieversorgung auch in der umfassenden Unterstützung des Immunsystems. So erkranken voll gestillte Kinder – auch über die Stillperiode hinaus – nachweislich seltener an Infektions-

krankheiten des Magen-Darm-Traktes, der Atem- und ableitenden Harnwege, des Mittelohrs und der Hirnhäute.⁶⁷⁻⁷⁰ Der positive Effekt der Muttermilch beruht unter anderem auf den hohen Antikörperkonzentrationen an IgA, die schon an den Schleimhäuten mit der Abwehr beginnen. Im Gegensatz dazu kommt das plazentagängige IgG erst dann zum Tragen, wenn die Erreger bereits in das Gewebe des Organismus eingedrungen sind. Die durch die Aktivierung von IgG ausgelöste Immunantwort und der nachfolgende Entzündungsprozess (unter anderem eine Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β und TNF α) verbraucht zudem deutlich mehr Energie, als durch eine Aktivierung von IgA erforderlich wird.⁷⁰

Gerade zu früh geborene Kinder profitieren daher sehr von einer Ernährung mit Muttermilch, da sie ein erhöhtes Infektionsrisiko aufweisen, Verdauungsprobleme schlechter toleriert werden als von Reifgeborenen und sie noch geringere Reserven im Energiesystem aufweisen. Ist das Frühgeborene noch zu schwach, um selbständig Trinken zu können, ist eine Ernährung mit Muttermilch über die Magensonde anzustreben.⁶⁶

Tabelle 5 gibt einen Überblick über ausgewählte Inhaltsstoffe von Frauenmilch, jeweils bezogen auf 100 g. Ein Gesamtüberblick aller Milchbestandteile würde an dieser Stelle den Rahmen sprengen.

Interessanterweise gehört gerade Selen zu den Spurenelementen, die in Abhängigkeit von der mütterlichen Versorgung an das Neugeborene weitergegeben werden. Bis heute sind die Einflüsse von Selen auf die Muttermilch und auf die Säuglinge nicht vollständig geklärt. Betrachtet man aber die positiven Effekte von Selen auf die Gesundheit von Erwachsenen, so liegt nahe, dass auch bei Säuglingen positive Auswirkungen zu erhoffen sind. Es ist daher von großer Bedeutung, die Wege nachzuzeichnen, die Selen von der Nahrungsaufnahme der Mutter über die Frauenmilch bis zur Versorgung des Kindes zurücklegt, um gegebenenfalls unterstützend eingreifen zu können. So bestünde unter Umständen die Möglichkeit einer indirekten therapeutischen Unterstützung, indem man den Müttern selenreiche Nahrung oder Selensupplemente zur Verfügung stellt. Diese neue Möglichkeit ist insbesondere deshalb interessant und wichtig, da gezeigt werden konnte, dass Kinder, die in den ersten Lebensmonaten mit Ersatznahrung gefüttert wurden, einen deutlich niedrigeren Selenstatus aufwiesen als gestillte Kinder.^{71,72} Eine für das Kind belastungsfreie Nahrungsergänzung über die Mutter könnte daher besonders bei kranken, schwachen oder zu früh geborenen Säuglingen von großer Bedeutung sein.

Tab. 5

Ausgewählte Inhaltsstoffe von Kolostrum, Übergangs- und reifer Frauenmilch⁷³

jeweils bezogen auf 100 g Milch

	Kolostrum 2. – 3. Tag	Übergangsmilch 6. – 10. Tag	reife Milch
Energie [kcal]	56	65	69
Eiweiß [g]	2,6	1,6	1,1
Fett [g]	2,9	3,5	4,0
Kohlenhydrate [g]	4,9	6,6	7,0
Cholesterin [mg]	keine Angabe	29	25
Natrium [mg]	54	29	13
Kalium [mg]	64	64	47
Kalzium [mg]	29	40	29
Phosphor [mg]	keine Angabe	18	15
Magnesium [mg]	3	3,5	3
Eisen [µg]	48	40	58
Zink [µg]	keine Angabe	351	134
Jod [µg]	keine Angabe	2,4	5
Selen [µg]	1	1	3
Kupfer [µg]	46	54	35
Mangan [ng]	1100	keine Angabe	712
Relation in % der Energie			
Eiweiß:Fett:Kohlenhydrate	18:47:35	10:49:41	7:53:39

Unterschiedliche Autoren haben sich bisher mit der Selenkonzentration in Muttermilch befasst. Tabelle 6 gibt einen Überblick über bisher veröffentlichte Studien.

Tab. 6

Selenkonzentration in der Muttermilch in Abhängigkeit von der täglich aufgenommenen Menge*

Studie	Mess- methode	Zeit post partum	Selenkonzentration	N	Bemerkung
Hadjimarkos (1973) ⁷⁴	FM	29-195 Tage	0,020 ± 0,001 ppm	15	Iowa, USA
		40-83 Tage	0,020 ± 0,001 ppm	24	Athen, GR
Wälivaara (1986) ⁷⁵	GC	4 Tage	17,6 ± 0,5 ng/ml	5	1978
		4 Tage	14,2 ± 1,4 ng/ml	12	1983, Se in Tierfutter
		12-150 Tage	9,4 ± 0,5 ng/ml	24	1978
		16-330 Tage	11,9 ± 0,8 ng/ml	15	1983, Se in Tierfutter
Levander (1987) ⁷⁶	DAN-FM	1-6 Monate	84 ± 4 µg/d	23	tägl. Se-Zufuhr, USA
		1-6 Monate	190,0 ± 12,7 nmol/l	23	Muttermilch, USA
Moser (1988) ⁷⁷	IDMS	2-6 Monate	23 ± 16 (26) µg/d	26	tägl. Se-Zufuhr, Nepal
		2-6 Monate	126,7 ± 12,7 nmol/l	26	Muttermilch, Nepal
Funk (1990) ⁷⁸	GC	1-6 Monate	194 ± 15 nmol/l	8	Regenzeit
		13-19 Monate	222 ± 12 nmol/l	13	Regenzeit
		1-6 Monate	266 ± 11 nmol/l	15	Trockenzeit
		13-19 Monate	246 ± 10 nmol/l	19	Trockenzeit
Zachara (2000) ⁷⁹	DAN-FM	12-75 Tage	3,0-23,4 nmol/l	905	16 Provinzen in Polen
Kantola (1991) ⁸⁰	ETA-AAS	> 1 Monat	16,4 ± 3,2 ng/ml	175	1987
		> 1 Monat	18,9 ± 3,0 ng/ml	81	1993-95, Se in Düngemittel

* Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. der Wertebereich

FM: Fluorimetrie

GC: Gaschromatographie

DAN-FM: Diaminonaphthalin-Fluorimetrie

IDMS: Isotop-Massenspektrometrie

ETA-AAS: Atomabsorptionsspektroskopie mit elektrothermischer Aufheizung

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Inhaltlich steht für die vorliegende Doktorarbeit die Frage nach der Selenversorgung in besonderen Ernährungslagen im Vordergrund. Zum einen soll daher der in Deutschland ständig wachsenden Bevölkerungsgruppe Beachtung geschenkt werden, die sich bewusst für eine vegetarische oder vegane Ernährung entscheidet und aufgrund ihrer persönlichen Einstellung auf den Verzehr von Fleisch, Fisch, Geflügel oder jeglichen tierischen Produkten wie Fleisch, Fisch, Eier, Gelatine, Milchprodukte und Honig verzichtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese überprüft, ob die weit verbreitete Meinung, Vegetarierinnen und Vegetarier seien grundsätzlich mangelernährt zutrifft. Hierbei steht der Selenstatus im Vordergrund. Auf einer experimentell-analysierenden und wissenschaftlich-theoretischen Grundlage soll dadurch eine verbesserte Möglichkeit zur differenzierten Diskussion über Vor- und Nachteile einer solchen Ernährungsweise ermöglicht werden.

Neben der Frage zur Selenversorgung in der veganen und vegetarischen Ernährung wird ein zweiter Schwerpunkt auf die Untersuchung von humaner Muttermilch gelegt, da diese für voll gestillte Neugeborene die einzige Nahrungsquelle darstellt. Mittlerweile gilt es als unbestritten, dass eine ausschließliche Ernährung mit Muttermilch die optimale Versorgung für Säuglinge in den ersten sechs Lebensmonaten darstellt. Wie kein anderes Nahrungsmittel vermag es die Muttermilch, sich an die individuellen Anforderungen des Neugeborenen anzupassen, sodass jegliche Form der Flaschennahrung einen künstlichen Ersatz darstellt, der nur näherungsweise den extrem hohen Ansprüchen der Muttermilch gerecht werden kann. Umso wichtiger scheint es, die Inhaltsstoffe der Muttermilch in ihrer Konzentration und Bedeutung genau zu verstehen, um sowohl im Falle einer Mangelernährung der Mutter als auch im Rahmen eines pathologisch bedingten Mehrbedarfs des Neugeborenen handeln und den fehlenden Inhaltstoff ergänzen oder ersetzen zu können. Hier ist eine gezielte und biologisch sichere Applikation über die Mutter denkbar, die den gewünschten Stoff über die eigene Ernährung in der Muttermilch anreichert, sodass auf die direkte Gabe von Nahrungsergänzungsmitteln beim Säugling verzichtet werden kann.

In der Auseinandersetzung mit Spurenelementen zeigt sich die besondere Bedeutung dieser essentiellen Nahrungsbestandteile, die in kleinsten Mengen in unser Körpergeschehen eingreifen. Auf schwer wahrnehmbare Weise nehmen sie ihren Platz in den täglichen Abläufen ein und, tritt eine Unterversorgung auf, zeigen sie häufig nur ein sehr diffuses Bild von verlangsamten oder gestörten Stoffwechselforgängen.

Diese grundsätzliche Beobachtung gilt im Besonderen für das Spurenelement Selen, dessen essentielle Bedeutung nicht mehr anzuzweifeln ist. Der Einfluss von Selen auf die unterschiedlichen Stoffwechselfvorgänge stellt sich als sehr weitreichend und komplex dar, sodass über die eindimensionale Substanz-Wirkungs-Beziehung hinaus gedacht werden muss. Dies erfordert neue Modelle und neue Herangehensweisen, um ein tieferes Verständnis für die grundlegende Bedeutung und (patho)physiologischen Vorgänge im menschlichen Organismus erlangen zu können.

Diesem anspruchsvollen Themenfeld widmet sich die vorliegende Promotionsarbeit, die hoffentlich einen Teil dazu beitragen kann, die Selenversorgung besonderer Bevölkerungsgruppen wie von Neugeborenen und Vegetariern besser einschätzen zu können, und darüber die physiologische und allgemeinmedizinische Bedeutung von Selen besser verstehen zu lernen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Probanden und Probenvorbereitung

2.1.1 Vegetarismus-Studie

Im Rahmen des Ethikantrags: *„Blutproben für die In-vitro-Diagnostik – Diagnostische Blutentnahme für wissenschaftliche Zwecke: Referenzbereich gesunder Probanden (Normalkollektiv)“*; einzusehen unter der Ethikkommission-Antragsnummer: EA1/057/07, wurden Menschen für eine freiwillige, einmalige Blutentnahme gesucht und gefunden.

Grundsätzliches Einschlusskriterium für die vegane oder vegetarische Gruppe war das Meiden von Fleisch, Fisch und Geflügel bzw. von jeglichen tierischen Produkten seit mindestens sechs Monaten. Menschen mit omnivorer Ernährung mussten seit mindestens fünf Jahren gemischte Kost konsumieren. Darüber hinaus wurden nur volljährige Probanden mit subjektivem gesundheitlichen Wohlbefinden eingeschlossen, die sich ausdrücklich zur freiwilligen Teilnahme und Analyse bereit erklärten. Einen finanziellen Anreiz zur Teilnahme gab es nicht.

Die Blutabnahme erfolgte mittels Einmal-Entnahme-Set von geschultem und autorisiertem Personal. Zur Gewinnung von Serum wurden BD Vacutainer® SST™ verwendet und für den Erhalt von Plasma mit EDTA versetzte BD Vacutainer®.

Im Anschluss an die Blutentnahme standen die Vollblutproben für die notwendige Gerinnung 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur bzw. maximal 12 Stunden bei 4°C. Danach wurde das Blut bei 1400 g und 24°C für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand (Serum bzw. Plasma) im unmittelbaren Anschluss portioniert, in Polyethylengefäße (1,7 ml, Eppendorf-Cups) überführt und bei -20°C gelagert. Der restliche Teil der Blutprobe („Blutkuchen“) wurde verworfen.

Mit der schriftlich dokumentierten Einwilligung zur Blutentnahme ging eine freiwillige Befragung zur Ernährung und zum Gesundheitszustand einher. Dabei fand die Befragung der Teilnehmenden grundsätzlich in anonymisierter Form statt und beinhaltete Fragen zum Alter, zur Größe, zum Gewicht, zum Geschlecht, zum Konsum von Alkohol und Nikotin, zur Nahrungsmittelergänzung, zum Sportverhalten und zur aktuellen gesundheitlichen Verfassung. Darüber hinaus erfolgt die grundsätzliche Einteilung in eine der drei Gruppen: omnivore, vegetarische oder vegane Ernährung. Dabei wurde auch erfasst, wie lange die jeweilige Person schon der aktuellen Ernährungsweise nachging.

2.1.2 Muttermilch

Die verwendeten Muttermilchproben stammten von gesunden, stillenden Frauen, die ihre Milch selbständig mit elektrischen Milchpumpen abpumpen konnten. Alle Frauen waren mit der Handhabung der Milchpumpen vertraut und hatten ihr ausdrückliches Einverständnis zur Untersuchung ihrer Milch gegeben. Die Milch beider Brüste wurde gemischt und eine Probe aus der Gesamtmilch entnommen, die bis zum Einfrieren bei 4°C gelagert wurde. Von den Milchproben wurden nur geringe Volumina (im Milliliter-Bereich) für die analytischen Zwecke entnommen. Grundsätzlich wurde Frauenmilch verwendet, die in der Zeit zwischen 9:00 und 12:00 Uhr abgepumpt worden war.

Die Literaturrecherche und eigene Vorversuche deuteten an, dass Muttermilch eine heterogene und schwer zu pipettierbare Matrix darstellt. Im Gegensatz zu den Serumproben mussten deshalb die Muttermilchproben in drei Fraktionen unterteilt werden: „whole milk“ (Vollmilch), „decelled milk“ (zellfreie Milch) und „skimmed milk“ (entrahmte Milch), wobei auf das Zentrifugationsschema von Loennerdal et al. zurückgegriffen wurde.⁸¹ Hierzu wurde die Milch in zwei Abstufungen zentrifugiert. Dabei entsprach die unzentrifugierte Milch der „Vollmilch“ (VM). Teile der VM wurden bei 500 g und 4°C für 25 Minuten zentrifugiert. Das Ergebnis konnte in Pellet, Mittelteil und Rahmschicht unterteilt werden, wobei der Mittelteil als „zellfreie Milch“ (zM) weiterverwendet wurde. Für den zweiten Schritt wurde zM bei 5000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, wodurch sich eine deutlichere Rahmschicht auf der „entrahmten Milch“ (eM) bildete, die abgenommen und verworfen wurde. Jede Muttermilchprobe wurde nach diesem Verfahren fraktioniert und in 1,7 ml Polyethylengefäßen bei -20°C gelagert.

Grundsätzlich wurde bei allen Muttermilch- und Blutproben jeder Einfrier- und Auftauvorgang dokumentiert und auf den Proben vermerkt. Soweit nicht anders beschrieben erfolgten die spezifischen Messungen immer nach dem erstmaligen Auftauen der Probe.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Quantitativer Nachweis von Selenoprotein P

Die quantitative Bestimmung von Selenoprotein P (SePP) erfolgte im Triplikat über einen Antikörpernachweis, der auf dem Sandwich-Prinzip (Abb. 3) beruht, wobei auf die Methode von Frau B. Hollenbach et al. 2008 zurückgegriffen wurde.⁴⁶

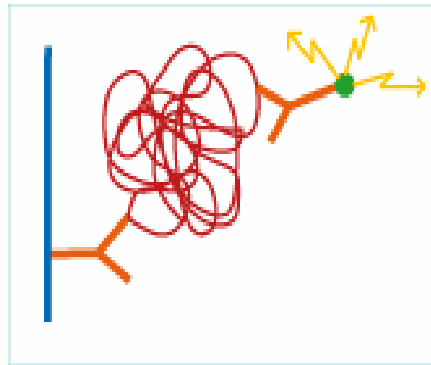


Abb. 3 „Sandwich-ELISA“ (Enzyme Linked Immunsorbent Assay)

Der erste Antikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, ist an eine feste Phase (z.B. Glas- oder Kunststoffgefäß) gekoppelt. In dieses Gefäß kann jetzt die Probe gegeben werden, aus der die Proteinmenge bestimmt werden soll. Als einziges Protein wird es an den Antikörper binden, sodass im nachfolgenden Waschschrift, alle anderen Proteine weggespült werden können. Im Anschluss werden chemisch markierte Antikörper zugegeben, die ebenfalls spezifisch an das gesuchte Protein binden, aber ein anderes Epitop erkennen. Alle nicht gebundenen Antikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. Zurück bleiben nur Antikörperproteinkomplexe, die auf Grund der „Sandwich“-Struktur (Antikörper – Protein – Antikörper) namensgebend für diese Art von Assay sind. Im letzten Schritt können die chemischen Moleküle, die an den zweiten Antikörper gekoppelt sind, photometrisch bestimmt und zuverlässig quantifiziert werden.

Alle eingesetzten Reagenzien sowie die Standardreihe wurden über B.R.A.H.M.S. AG Hennigsdorf (bei Berlin) bezogen und sind in dieser Form derzeit noch nicht kommerziell zu erwerben.

Die zu vermessenen humanen Seren wurden 1:78 verdünnt, die Milchproben unverdünnt eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte ausschließlich in dem Probenpuffer mit dem auch die lyophilisierten Standards und der Tracer in Lösung gebracht wurden, wobei der Tracer die Lösung ist, die den zweiten Antikörper enthält. Nach Lösen des Tracers wurde dieser durch einen 0,2 µm Filter (Whatman® Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert, um eventuelle Antikörperkonglomerate abzutrennen. Zu Beginn jeder Messung erfolgten drei Kontrollmessungen: 1. Leerwert (Nulleffektmessung), 2. zwei feststehende Verdünnungen (1:2 und 1:10) eines definierten Tracers und 3. der aktuelle Tracer. Der Zielwert für 200 µl Tracer betrug 800.000 +/- 200.000 RLU (Relative Light Units). Erst wenn die Kontrollmessungen zufrieden stellend waren, wurde mit dem Pipettieren der Standardreihe begonnen. Sowohl von der Standardreihe als auch von allen Proben bzw. Probenverdünnungen, wurden 50 µl in Polystyrolröhrchen gegeben, die mit dem ersten Antikörper beschichten

waren (CTs = Coated tubes). Direkt im Anschluss wurden in jedes CT 200 µl Tracer gegeben und die Proben für zwei Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur und 300 rpm geschüttelt. Nach zwei Stunden wurden die Proben dreimal mit 1 ml Waschpuffer (LUMItest, B.R.A.H.M.S AG Hennigsdorf) gespült und am Ende zur Trocknung gut ausgeklopft. Über Kopf standen die Proben erneut 20 Minuten im Dunklen, sodass alle Waschpufferreste abfließen konnten. Danach erfolgte die SePP Quantifizierung mittels Lumineszenzmessung (Kettenluminometer von Berthold, Modell LB 953) nach automatischer Zugabe von 300 µl Basisreagenz 1 (100 mM HNO₃; 0,5% H₂O₂) und 300 µL Basisreagenz 2 (250 mM NaOH).

2.2.2 Qualitativer Nachweis (Western-Blot)

Für den spezifischen Nachweis einzelner Proteine wurde auf die altbewährte Methode der Western Blot Analyse zurückgegriffen. Voraussetzung für diesen immunologischen Nachweis ist die Auftrennung des Proteingemisches nach Größe und Ladung, mit Hilfe einer SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Je nach Größe des gesuchten Proteins wurden Trenngelkonzentrationen von 10%, 12,5% oder 15% eingesetzt (Tab. 7).

Tab. 7

Trenn- und Sammelgelrezepturen

	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%	Sammelgel 4,5%
ddH₂O	4,9 ml	4,3 ml	3,65 ml	3,1 ml
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)	2,5 ml	3,1 ml	3,75 ml	560 µl
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	----
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	----	----	----	1,25 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	80 µl	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	5 µl
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl	50 µl

Auf das Gel (Dicke 0,75 – 1,0 mm) wurden maximal 100 µg Protein aufgetragen, wobei diese immer in einem Volumen von 20 µl eingesetzt wurden, die sich wie folgt zusammensetzten:

4 µl Probenpuffer (Tab. 3)

16 µl Gemisch aus: ddH₂O + Proben (je nach Proteinkonzentration)

Vor dem Auftragen wurden die Probengemische bei 96°C für 5 Minuten denaturiert und dann auf die Gele gegeben. Die verwendeten Gelkammern sowie alle notwendigen Geräte zum Gießen der Gele stammten von der Firma Bio-Rad. Für die ersten 20 – 30 Minuten wurde lediglich eine Spannung von 70 V an das Gel angelegt, damit die Proben gleichmäßig ins Sammelgel eintreten konnten, wobei der Laufpuffer (Tab. 8) als elektrischer Leiter benutzt wurde. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 120 V bis der Farbstoff des Probenpuffers (Bromphenolblau) die Gelunterkante erreicht hatte.

Tab. 8

Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot

Laufpuffer, pH 8,4	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
4 x Probenpuffer	200 mM Tris, pH 7,5 50% Glycerin 4% SDS 0,04% Bromphenolblau 125 mM DTT
Transferpuffer, pH 8,3	100 ml (25 mM Tris; 190 mM Glycin) 100 ml Methanol 800 ml dH ₂ O
Waschpuffer, pH 8,0	25 mM Tris 125 mM NaCl 0,3% Tween® 20
ECL-Lösung	1 ml Tris/HCl (1 M), pH 8,5 20 µl Coumaicacid (90 mM) 50 µl Luminol ad 10 ml dH ₂ O für die Aktivierung: 3 µl H ₂ O ₂

Nach dem vollständigen Auftrennen des Proteingemischs wurden die Gele vorsichtig aus den Platten entnommen und auf – mit Transferpuffer (Tab. 8) getränktes – Blotpapier (3 mm Whatman, Schleicher & Schuell) gelegt. In einer Blotkammer erfolgte der Proteintransfer aus dem Gel auf eine verstärkte Nitrocellulose-Membran (Protran®, Whatman, Schleicher & Schuell) mittels eines Semidry-Blot-Systems (Transferblotapparatur; Transblot SD von Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)) bei 20 V für 30 – 40 Minuten. Zur Überprüfung eines gleichmäßigen Ergebnisses wurde der fertige Blot mit Ponceau-Rot (1% in 5% Essigsäure) eingefärbt. Bei gutem Ergebnis (vergleichbare Proteinmengen, gute Auftrennung, distinktes Bandenmuster von häufigen Proteinen) folgte die Blockierung mit 5% Milchpulver in Waschpuffer für 20 – 30 Minuten und anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Konzentration siehe Tab. 9). Vor dem ersten Waschvorgang wurden die Blots während einer Stunde auf dem Schüttler auf Raumtemperatur gebracht. Nach zweimaligem Spülen zur Entfernung der Antikörperlösung und fünfmaligen Waschen mit Waschpuffer auf dem Schüttler über 10 Minuten, folgte die zweite Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 9) bei Raumtemperatur für 60 Minuten ebenfalls auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt und der Blot bis zur Entwicklung im Waschpuffer belassen. Für die Immundetektion wurde der Blot unmittelbar vor Auflegen auf den Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) für 1 Minute mit aktivierter ECL-Lösung (Tab. 8) gespült und dann für die Belichtung des Films in eine Röntgenfilmkassette (Kodak, Rochester, New York) gelegt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase (HRP – Horse Radish Peroxidase) führte dabei zur Umsetzung von Luminol in dessen oxidierte Form, die dann aufgrund der Lichtemission den Röntgenfilm schwärzte.

Tab. 9**Primäre und sekundäre Antikörper für den Western-Blot**

Protein	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
SePP	Sheep-α-human-SePP 6c 0,15 mg/ml	Donkey-α-sheep-HRP
	BRAHMS AG	Rockland/BIOMOL
	1:100 (= 1,5 μ g/ml)	1:5000

2.3 Enzymatische Bestimmung der Glutathion-Peroxidase

Die Bestimmung der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GPx) erfolgte indirekt mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests und der Konzentrationsberechnung anhand des Lambert-Beerschen- Gesetz:

$$E = \epsilon_{\lambda} * d * c$$

E = Extinktion [Dimensionslos]

ϵ_{λ} = Wellenlängen spezifischer, molarer Extinktionskoeffizient [l/(mol*cm)]

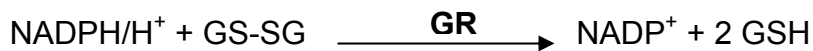
d = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/l]

Unter Vorhandensein von Glutathion (GSH) reduziert die GPx ein Hydroperoxid (R-OOH) zum entsprechenden Alkohol (R-OH) und Wasser (H₂O), während zwei GSH Moleküle zum oxidierten Glutathion (GS-SG) oxidiert werden.



Zur Regeneration wird das GS-SG unter NADPH/H⁺ Verbrauch durch die Glutathion-Reduktase (GR) zu 2 GSH reduziert.



Dabei kann der Verbrauch von NADPH/H⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt werden. Dieser Stoffmengenverbrauch entspricht der umgesetzten Substratstoffmenge durch die GPx und erlaubt dadurch einen Rückschluss auf deren Aktivität

Die berechnete GPx-Aktivität in Units (U) ergibt sich dabei aus:

$$U = (\Delta E_{\text{Minute}} * V_{\text{ges}}) / (\epsilon_{340\text{nm}} * d * V_{\text{Pr}})$$

U = nmol Konzentrationsänderung (NADPH/H⁺) pro Minute und ml Serum bzw. Muttermilch

ΔE = Extinktionsänderung pro Minute [1/min]

V_{ges} = Gesamtvolumen (Probe + Reaktionsmix) [l]

$\epsilon_{340\text{nm}}$ = millimolarer Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm (= 6,22 l/(mmol*cm))

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

V_{Pr} = Probenvolumen [ml]

Alle Proben wurden im Duplikat bestimmt und um eine unspezifische Oxidation von NADPH/H⁺ auszuschließen, wurde jede Probe zusätzlich in einem gehemmten Ansatz vermessen. Hierfür wurde dem Reaktions-Mix (Tab. 11) Mercaptosuccinat (Endkonzentration 10 mM) zugesetzt, um die GPx spezifisch zu hemmen. Die weiterhin umgesetzte Stoffmenge an NADPH/H⁺ wurde von den ungehemmten Messungen abgezogen.

$$\text{Umsatz der GPx} = \text{Gesamtumsatz}_{\text{NADPH/H}^+} - \text{Umsatz}_{\text{NADPH/H}^+} \text{ nach Hemmung der GPx}$$

Tab. 10

Puffer und Lösungen für die GPx-Aktivitätsbestimmung

20xTE,	1 M Tris 0,5 M EDTA, pH 8,0 37% HCl
1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,0	für 200 ml: 123 ml 1 M K ₂ HPO ₄ 77 ml 1 M KH ₂ PO ₄
Mercapto-Succinat-Lsg. Sigma M-3754	15 mg Mercapto-Succinat in 1 ml dH ₂ O
0,07% tBuOOH Merck #8.14006	

Tab. 11

Reaktions-Mix für die GPx-Aktivitätsbestimmung

		für 25 Proben	für 40 Proben
dH₂O		28,15 ml	45 ml
20xTE		7,5 ml	12 ml
NADPH	40 mg in 1 ml 10 mM		
Roche #107824	K-Phosphatpuffer, pH 7,0	312,5 µl	500 µl
GSH	30,74 mg in 1 ml dH ₂ O		
Sigma G-4251		1,5 ml	2,4 ml
GR			
CALBIOCHEM®		37,5 µl	60 µl
Cat# 359960			

In den Küvetten wurden 500 µl Reaktions-Mix mit 500 µl dH₂O 1:2 verdünnt und für den gehemmten Ansatz zu 500 µl Reaktions-Mix 400 µl dH₂O und 100 µl Mercapto-

Succinat-Lsg. gegeben. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben in die vorbereiteten Küvetten gegeben und direkt im Spektralphotometer (SPECORD® 205 von analytikjena, Deutschland) vermessen.

2.4 Zytokinbestimmung

Die Bestimmung von Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) erfolgte in den unverdünnten Serumproben mittels eines multiplex Immunoassays von LINCOpex™.

Verwendet wurden folgende „Antibody-Immobilized Beads“:

#01-Human IL-1 β

#12-Human IL-6

#40-Human TNF α

Alle verwendeten Reagenzien, sowie die benötigten Mikrotiterplatten waren Bestandteil des LINCOpex™-Kits, Cat. #HCYTO-60K. Das Vorgehen während der Messung erfolgte strikt nach Angaben des Herstellers.

Jeweils 25 μ l Probe wurde mit 25 μ l mitgeliefertem Puffer und 25 μ l „mixed Beads“ versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte, die Zugabe von 25 μ l Detektionslösung und die erneute Inkubation für 30 Minuten. Nach dem Hinzufügen von 25 μ l Streptavidin-Phycoerythrin und einer weiteren Inkubation von 30 Minuten schlossen sich wieder zwei Waschschrte an. Die anschließende Messung erfolgte nach Zugabe von 100 μ l „Sheath Fluid“ im Multiplex Analyse Systems (Luminex 200, Austin, TX (USA)).

2.5 Bestimmung von Spurenelementen

Für die Messung der Gesamtkonzentrationen der unterschiedlichen Spurenelemente und Calcium wurde die Total-Reflektions Röntgenfluoreszenz Analytik (TRFA) herangezogen, die eine simultane Messung vieler Einzelelemente erlaubt.⁸²

Das Prinzip der Messung beruht auf der Beobachtung, dass die Bestrahlung von Materie mit Röntgenstrahlen die Emission von spezifischen Fluoreszenzstrahlungen zur Folge hat. Die Wellenlänge und Energie der entstandenen Fluoreszenzstrahlungen ist jeweils charakteristisch für die unterschiedlichen enthaltenden Elemente und lässt eine qualitative Zuordnung dieser Elemente zu. Gleichzeitig können über die Intensität der Fluoreszenzstrahlungen Aussagen über die Konzentrationen der enthaltenden Elemente gemacht werden. Eine definierte Elementmenge (in diesem Falle Gallium),

die der Probe zugesetzt wird, dient dabei als interner Standard zur Quantifizierung der Messergebnisse.

Für die Analyse der Serumproben wurde jeweils 100 µl Serum mit doppelt destilliertem Wasser 1:10 verdünnt und zur internen Standardisierung mit einer 5 µl Ga-Lösung (10 mg/l) versetzt. Nach jedem Mischungsschritt wurden die Proben gründlich homogenisiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe einer Heizplatte das Eintrocknen von 10 µl der vorbereiteten Probe auf nicht silikonisierten Quarzglasprobenträgern. Blasenfrei getrocknete Proben wurden jeweils über 2000 Sekunden in einem Auftisch-TRFA Spektrometer (S2 PICOFOX, Bruker AXS Microanalysis GmbH, Berlin) vermessen.

Die Aufbereitung der Muttermilchproben sowie das Vermessen der Proben erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie beim Serum, allerdings ohne den Verdünnungsschritt mit doppelt destilliertem Wasser.

2.6 Datenauswertung und Statistik

Die Datenauswertung erfolgte je nach Datenart und Anzahl der zu vergleichenden Gruppen in unterschiedlichen Schritten. Grundsätzlich wurden drei Programme zur Datenauswertung verwendet: *Graphpad Prism 4.03* von Graphpad Software, San Diego, CA (USA), *SPSS Statistics 17.0* von SPSS Inc. Chicago, IL (USA) und *Excel – Microsoft Office 2007* von Microsoft Deutschland, Unterschleißheim.

Beginnend wurden die Daten mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft. Soweit die Normalverteilung gegeben war wurde mit Hilfe der Levene-Statistik die Varianzhomogenität untersucht. Im Anschluss erfolgte über eine ANOVA (**analysis of variance**) eine Varianzanalyse, wenn mehr als eine Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen werden sollte. Bei Varianzhomogenität schloss sich der ANOVA als Post-Hoc-Test ein Bonferroni und bei nicht gegebener Homogenität der Varianzen ein Dunnett-T3 als Post-Hoc-Test an.

Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes zwischen zwei Gruppen (z. B. Kontroll- versus Vergleichsgruppe) wurde der Student's t-Test angewandt. p-Werte kleiner 0,05 galten als signifikant und wurden mit einem Sternchen (*) versehen. Wenn möglich wurden weitere Abstufungen der p-Werte unternommen und mit ** (p-Wert $\leq 0,01$) bzw. *** (p-Wert $\leq 0,001$) beschriftet.

In den Graphiken sind jeweils die Mittelwerte, zum Teil auch Standardabweichungen angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Vegetarismus-Studie

Im Rahmen meiner Doktorarbeit bin ich der Frage nachgegangen, inwieweit ein Unterschied im Selenstatus in Abhängigkeit von der jeweiligen Ernährungsweise (vegan, vegetarisch oder omnivor) besteht. Zu diesem Ziel wurden 107 Personen befragt und nach ausführlicher Aufklärung und ausdrücklicher, freiwilliger Teilnahme Blut abgenommen. Die Ergebnisse sollten im zweiten Schritt hinsichtlich einer eventuell erforderlichen Selensubstitution bewertet werden. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Teilnehmenden.

Tab. 12

Übersicht der Teilnehmenden an der Vegetarismus-Studie

Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen in Klammern.

	♀ - Omnivor n = 29	♂ - Omnivor n = 24	♀ - Veget. n = 17	♂ - Veget. n = 11	♀ - Vegan n = 12	♂ - Vegan n = 14
Alter (Jahre)	25,4 (±5,6)	25,2 (±5,3)	33,3 (±14,7)	31,7 (±8,2)	30,8 (±11,1)	28 (±8,7)
BMI (kg/m ²)	20,9 (±2)	23,8 (±3,2)	22,2 (± 2,4)	22,9 (± 3,3)	21,6 (±3,5)	21,6 (±2,2)
Raucher (n)	6 (20,7%)	5 (20,8%)	0 (0%)	1 (9,1%)	5 (41,7%)	1 (7,1%)
Orale Kon- trazeptiva (n)	14 (48,3%)	---	5 (29,4%)	---	1 (8,3%)	---
Sport (n) ≥ 1x/Woche	13 (44,8%)	12 (50%)	7 (41,2%)	7 (63,6%)	6 (50%)	6 (42,9%)
Nahrungser- gänzung (n)	5 (17,2%)	2 (8,3%)	5 (29,4%)	5 (45,5%)	3 (25%)	6 (42,9%)

94 der insgesamt 107 Teilnehmenden waren normalgewichtig (BMI zwischen 18,0 – 24,9). Übergewichtig (BMI 25 – 29,9) waren drei Frauen, jeweils eine aus jeder Gruppe und neun Männer, unter denen zwei Vegetarier und einer Veganer waren. Von den sechs übergewichtigen omnivoren Männern waren zwei adipös (BMI > 30).

Hinsichtlich der oralen Kontrazeptiva war der deutlichste Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zu beobachten. Im Vergleich zu den 48,3% der omnivoren Frauen nahmen nur 29,4% der Vegetarierinnen und lediglich 8,3% der Veganerinnen hormonelle Verhütungsmittel ein.

Die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln lag in der vegetarischen und veganen Gruppe deutlich über der Vergleichsgruppe, was unter Anbetracht der Tatsache, dass

die Einnahme von Vitamin B12 vor allem bei veganer Ernährung auf Dauer unverzichtbar ist, durchaus zu erwarten war.

In allen Blutproben wurde die SePP- und die Gesamtselenkonzentration, sowie die pGPx-Aktivität bestimmt. Darüber hinaus wurden die Spurenelemente Eisen, Kupfer und Zink, sowie Calcium im Blut gemessen. Mit IL-1 β , IL-6 und TNF α wurden abschließend noch drei aussagekräftige Zytokine bestimmt, die eine Aussage über eine aktuelle Entzündungssituation erlauben.

Die Interpretation der Messergebnisse erfolgte grundsätzlich für Frauen und Männer getrennt, um auch eventuelle Geschlechtsunterschiede beurteilen zu können. Dies ist vor allem im Hinblick auf den sexuell dimorphen Selenmetabolismus⁵ und die besonderen körperlichen Anforderungen während der Menstruation, Schwangerschaft und Stillzeit ein interessanter und wichtiger Aspekt.

3.1.1 Selenoprotein P und Gesamtselen

Ein grundlegender Bestandteil der Messergebnisse sind die Daten bezüglich der Gesamtselen- und SePP-Konzentrationen. Hauptverantwortliches Organ für die SePP-Konzentration im Blut ist die Leber, auch wenn grundsätzlich in fast allen Geweben SePP synthetisiert werden kann.^{44,83} Von allen Selenoproteinen enthält dieses die höchste Konzentration an Selen, da bis zu zehn SeCys-Reste pro SePP-Molekül eingebaut werden können.⁸³ Durch die große Beweglichkeit über den Blutstrom und die Möglichkeit, mehrere SeCys einzubauen, übernimmt SePP eine bedeutende Transport- und Speicherfunktion für Selen. Somit gelangt SePP prinzipiell zu allen Zellen des Körpers, die mit Blut versorgt werden. Interessanterweise scheinen vor allem Gehirn, endokrine Organe und Hoden verstärkt SePP aus dem Blut aufnehmen zu können, wobei die genauen Aufnahmemechanismen noch nicht endgültig geklärt werden konnten.⁸⁴ Zwei Transmembranproteine aus der Lipoprotein-Rezeptor-Familie konnten kürzlich als potentielle SePP-Rezeptoren identifiziert werden.⁸⁵ Einmal in der Zelle, wird SePP allem Anschein nach in seine Grundbausteine zerlegt, und das so freigesetzte Selen steht dann der Proteinbiosynthese von neuen Selenoproteinen als Selenquelle zur Verfügung. Inwieweit SePP neben der Transport- und Speicherfunktion noch eine weitere eigenständige Aufgabe zukommt, konnte bisher noch nicht ausreichend belegt werden, sodass sein Schicksal wohl hauptsächlich in seinem Abbau zu liegen scheint.⁸³

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in den drei Untergruppen „Vegane Ernährung“, „Vegetarische Ernährung“ und „Omnivore Ernährung“. Da bis heute die Bestimmung der Gesamtselenkonzentration als das übliche Verfahren zur Beurteilung der Selenversorgung gilt, zeigt Abb. 4 die Verteilung der Gesamtselenkonzentrationen in den beschriebenen Gruppen.

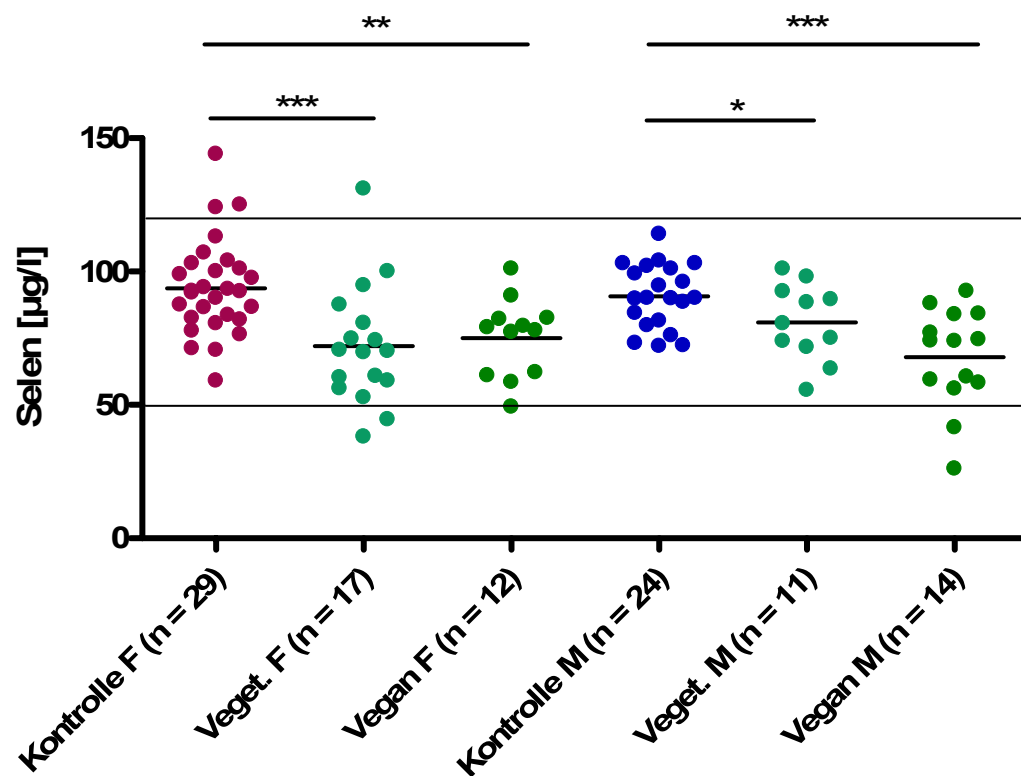


Abb. 4

Gesamtselenkonzentration aus Serum. Bestimmt wurde die Selenkonzentration über die TXRF-Analyse [µg/l], wobei die Teilnehmenden mit omnivorer Ernährung als Kontrollgruppe fungierten. Angegeben sind neben den Einzelwerten die Mittelwerte (kurze Linie) der Gruppe. Die quer verlaufenden Linien zeigen den Referenzbereich für Selen (50 – 120µg/l)⁸⁶ an. Es zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden weiblichen Gruppen (Veget. Female, Vegan Female) und der weiblichen Kontrollgruppe. Auch zur männlichen Kontrollgruppe sind signifikante Konzentrationsunterschiede zu den Vergleichsgruppen (Veget. Male, Vegan Male) aufzuweisen. Zwischen den jeweiligen Gruppen besteht kein nachweisbarer Geschlechtsunterschied.

Die Ergebnisse zeigen klar, dass die überwiegende Mehrheit der Teilnehmenden mit ihrer Gesamtselenkonzentration in den zugrundeliegenden Referenzwerten (0,6 – 1,5 µmol/l bzw. 50 – 120 µg/l) der Charité Universitätsmedizin Berlin⁸⁶ liegen.

Im Vergleich dazu weisen die Ergebnisse der SePP-Konzentration eine ähnliche Tendenz auf und sind in Abb. 5 zusammengefasst.

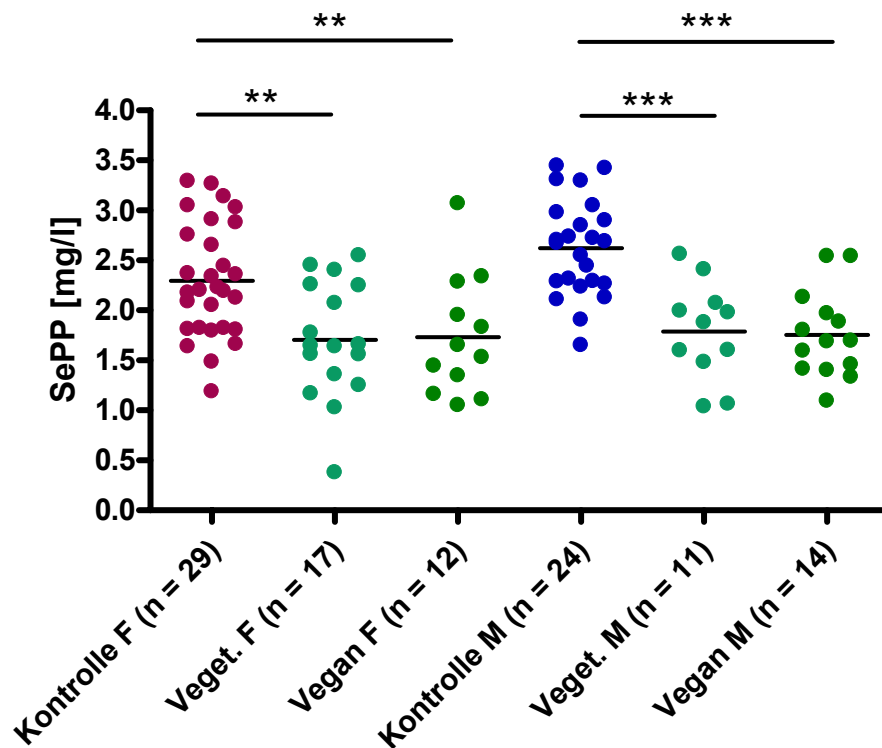


Abb. 5

SePP-Konzentration aus Serum. Angegeben sind die SePP-Konzentrationen in mg pro Liter Serum. Neben den Einzelwerten sind jeweils auch die Mittelwerte der Gruppen (kurze quer verlaufende Linien) aufgeführt. Sowohl zwischen den Gruppen der weiblichen Teilnehmerinnen, als auch zwischen den männlichen Probanden zeigen sich signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe. Ein Geschlechterunterschied konnte wiederum nicht festgestellt werden.

Beginnend kann festgestellt werden, dass ein Großteil der untersuchten Personen unter dem Durchschnittswert von 2,6 – 3,4 mg/l⁴⁶ liegen, die in einer vorangegangenen Studie an gesunden Sportlern ermittelt wurde. Dabei gilt es zu beachten, dass es noch keinen zuverlässigen Referenzwert für SePP gibt und eine eventuell notwendige Anpassung bezüglich Geschlecht und Alter noch aussteht⁴⁶ (siehe dazu auch Kapitel 4.1 der Diskussion). Nichtsdestotrotz bestehen hochsignifikante Unterschiede sowohl zwischen den Frauen als auch zwischen den Männern im Hinblick auf die jeweilige Kontrollgruppe. Nur eine einzige Frau befindet sich unter allen Teilnehmenden mit vegetarischer oder veganer Ernährung, die den Durchschnittswert des Sportlerkollektivs erreicht, wohingegen ungefähr die Hälfte aller omnivoren Probandinnen und Probanden innerhalb dieses Bereiches liegen. Lediglich zwei männliche Teilnehmer aus der

Kontrollgruppe liegen – als einzige aller hier vermessenen Menschen – minimal außerhalb des oberen Referenzwertes.

Beide Messmethoden kommen zu dem Schluss, dass ein signifikanter Unterschied im Selenstatus zwischen der omnivoren Kontrollgruppe und der vegetarischen bzw. veganen Gruppe besteht. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied kann dabei nicht beobachtet werden.

3.1.2 pGPx

Ein weiteres Protein, das zur Beurteilung des Selenstatus herangezogen wird, ist die plasma Glutathion-Peroxidase (pGPx).⁸⁷ Die Familie der Glutathion-Peroxidasen (GPx) umfasst eine Gruppe von Enzymen, die die Zellen vor den schädigenden Wirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und der Peroxide schützen. Mit Hilfe des atypische Tripeptids Glutathion (gamma-Glutamyl–Cysteinyl–Glycin), welches zu den kleinsten Peptiden des menschlichen Körper gehört, bildet die GPx einen verlässlichen Schutz vor ungewollten Oxidationsprozessen. Dabei werden zwei Moleküle Glutathion (GSH) benötigt, um ein Molekül eines Peroxids (R-OOH) zu dem entsprechenden Alkohol (R-OH) und Wasser (H₂O) zu reduzieren. Zur Regenerierung des Glutathionpools wird das oxidierte Glutathion unter NADPH/H⁺ Verbrauch durch die Glutathion-Reduktase (GR) wieder in zwei Glutathion-Moleküle rücküberführt (Abb. 6).

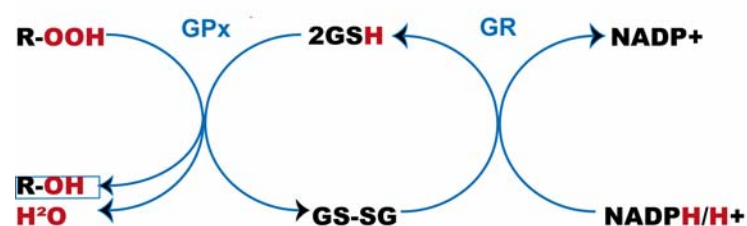


Abb. 6

Schematische Darstellung der Hin- und Rückreaktion des GSH durch die Glutathionperoxidase (GPx) bzw. Glutathion-Reduktase (GR). Dabei entstehen aus dem zu Grunde liegenden Peroxid (R-OOH) der dazugehörige Alkohol (R-OH) und Wasser (H₂O), während NADPH/H⁺ zu NADP⁺ verbraucht wird.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der bereits oben beschriebenen Methode und die Ergebnisse sind in Abb. 7 zusammengefasst.

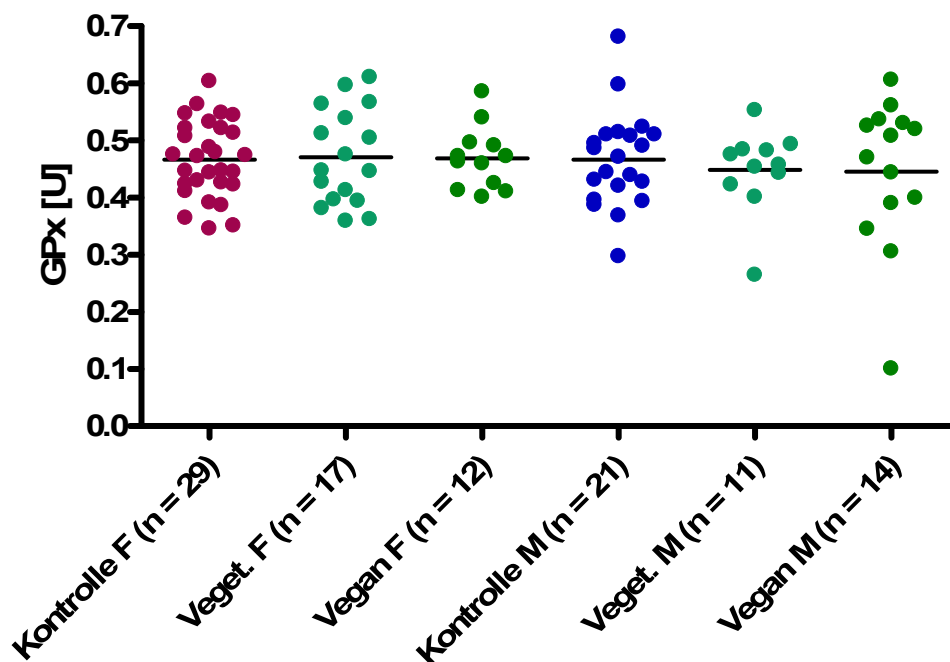


Abb. 7

pGPx-Aktivität im Serum. Gegenüberstellung der GPx-Aktivitätsänderungen [U] in nmol pro Minute und μ l Serum zwischen Kontroll- und Vergleichsgruppen. Weder im Bezug auf die Ernährungsform, noch im Bezug auf das Geschlecht sind Unterschiede nachzuweisen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Selen- und SePP-Bestimmungen kann bei der GPx-Aktivitätsmessung kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

3.1.3 Zytokine

Zur differenzierten Beurteilung des aktuellen inflammatorischen Zustandes wurden die drei proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF α bestimmt. Eine ständige unterschwellige Entzündungssituation im Körper gilt als Teil der multifaktoriellen Ursachen komplexer Krankheitsbilder wie Diabetes, Krebs oder Artherosklerose.⁸⁸ Die Wirkung dieser drei Zytokine ist ähnlich, wobei sie sowohl ergänzend als auch überlappend fungieren.⁸⁹ Ihre Aufgabe ist es sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem anzuregen und Bedingungen zu schaffen, die die Überlebenswahrscheinlichkeit für potentielle Erreger erschwert. In extremer Dosierung ist TNF α andererseits mitverantwortlich für die katastrophalen Zustände im Organismus, die durch die Auslösung einer diffusen intravasalen Gerinnung mit Verbrauchs-koagulopathie entstehen und die letale Folgen haben können.⁸⁹ Da die Halbwertszeiten

der Zytokine in der Regel im Minutenbereich liegen und die Messung noch relativ aufwendig ist, wird ihre Bestimmung bislang noch nicht in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. In Situationen, die ein enges Zeitfenster aufweisen und begleitende klinische Überwachung erfordern (schwer kranke Frühchen oder Patientinnen auf der Intensivstation), wird die Bestimmung von IL-6 aber bereits eingesetzt. Ein Anstieg dieses proinflammatorischen Zytokins ist deutlich früher zu verzeichnen als der von den nachfolgenden akute-Phase-Proteinen, wie das CRP (C-reaktives Protein), das als unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse angesehen werden kann und im klinischen Alltag routinemäßig für Diagnostik und Verlauf bestimmt wird. In gesunden, normalgewichtigen Menschen liegen die Serumwerte für IL-6, IL-1 β und TNF α unter 1 pg/ml, wobei diese Werte zum Teil durch exzessiven Sport erhöht sein können^{90,91} und sich selbst kleinste Infekte in den Messwerten niederschlagen. Ein Zusammenhang zwischen Selenstatus, Selenoprotein S Expression und diesen Zytokinen wurde in einer genetischen Studie kürzlich dargelegt.⁸⁸ Die in Abb. 8a-c zusammengefassten Ergebnisse zeigen daher zum Teil erhöhte Werte, da zwar körperliches Wohlbefinden, nicht aber objektive Infektfreiheit, zu den Einschlusskriterien gehörte.

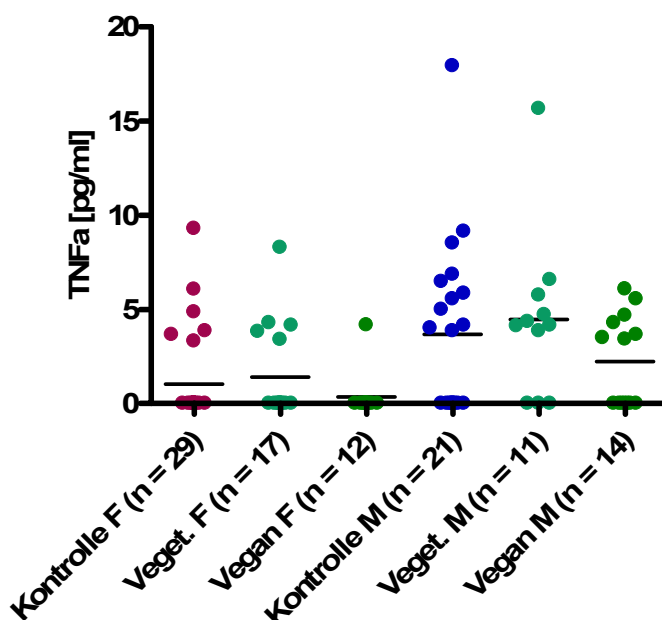


Abb. 8a

TNF α im Serum.

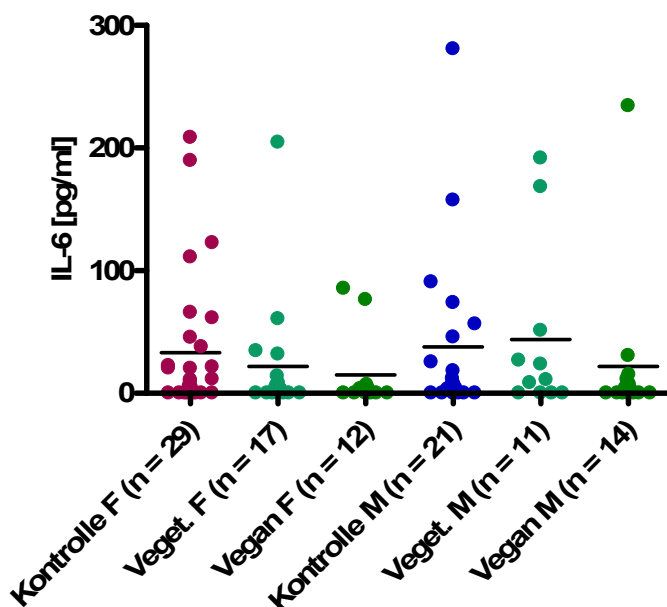


Abb. 8b
IL-6 im Serum.

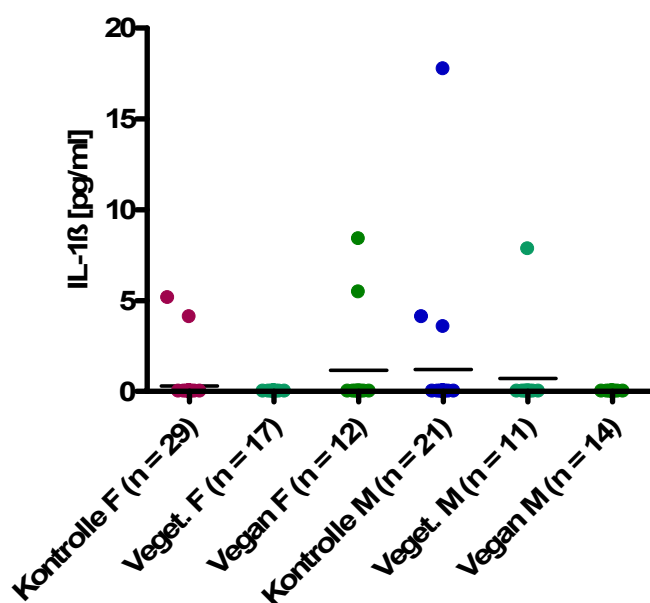


Abb. 8c
IL-1β im Serum.

Abb. 19a-c Die Bestimmung der Zytokine erfolgte aus dem Serum der Teilnehmenden. Aufgeführt sind die jeweiligen Zytokine in pg pro ml Serum. Es konnte für keines der gemessenen Zytokine signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichs- und den Kontrollgruppen festgestellt werden. Die Messungen des TNF α (8a) wiesen allerdings einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen auf, der bei alle drei Gruppen (omnivore, vegetarische und vegane Ernährung) vorlag.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse vor allem im Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen interessant und nicht so sehr im Hinblick auf einzeln erhöhte Werte. Insgesamt kann zwischen der omnivoren Kontrollgruppe und der vegetarischen und veganen Vergleichsgruppe kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Auffallend ist aber, dass eine signifikante Differenz der TNF α -Werte zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmenden besteht, die für alle drei Gruppen (omnivor, vegan, vegetarisch) zutrifft.

3.1.4 Spurenelemente und Elektrolyte

Neben der Bestimmung von Selen wurden mit Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Eisen (Fe) drei weitere Spurenelemente bestimmt, sowie Calcium (Ca) als wichtiges Blutsalz. Aufgrund der angewendeten Methode wurden immer die Gesamtkonzentrationen des jeweiligen Elementes bestimmt. Dies ließ eine Interpretation der jeweiligen Gruppen untereinander zu, erlaubte aber keinen Vergleich mit den üblichen Referenzwerten von Eisen, da diese im klinischen Alltag nicht auf die Gesamt-Eisenkonzentrationen bezogen, sondern in der Regel als Transferrin- und Ferritin-Eisen bestimmt werden.

Bei den Ergebnissen der Eisengesamtkonzentration im Serum fiel auf, dass sich nur die weibliche Kontrollgruppe signifikant von den Ergebnissen der anderen unterschied (Abb. 9). Sowohl die weiblichen Probandinnen der vegetarischen als auch die der veganen Gruppe zeigten eine leichte Tendenz zu höheren Werten als in den jeweiligen Gruppen mit männlichen Probanden.

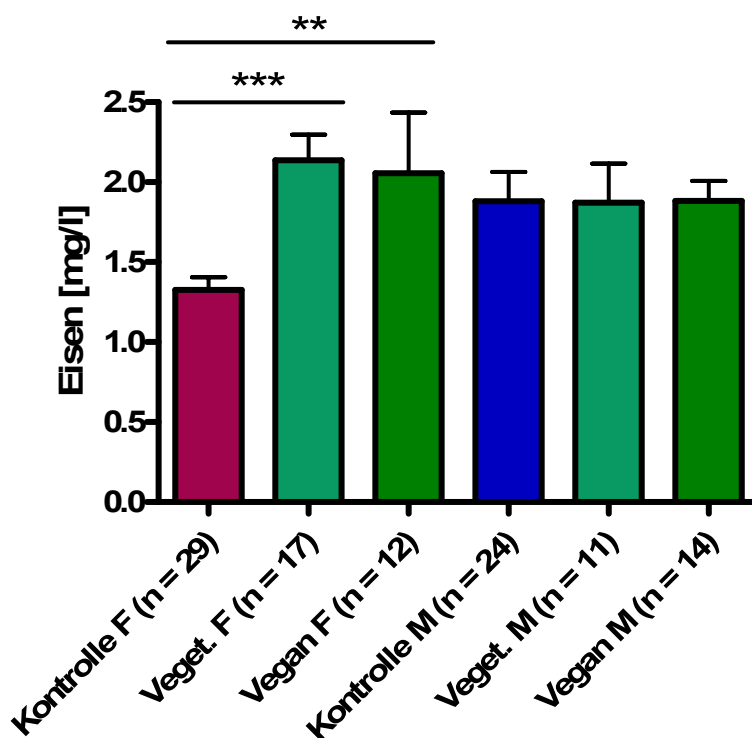


Abb. 9

Gesamteisenkonzentration (Fe) im Serum. Bei der Bestimmung von Gesamteisen im Serum zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Frauen der Kontrollgruppe und den beiden Vergleichsgruppen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Gruppen der männlichen Teilnehmer nicht. Zwischen Frauen und Männern findet sich eine signifikante Differenz lediglich bei den beiden Kontrollgruppen. Ein Referenzwert für die Gesamteisenkonzentration im Serum kann nicht hinzugezogen werden, da Gesamteisen im klinischen Alltag nicht als üblicher Parameter bestimmt wird.

Die Bestimmung der Gesamtkupferkonzentration zeigte einen deutlichen Geschlechterunterschied (Abb. 10). Frauen waren grundsätzlich besser mit Kupfer versorgt als Männer, zeigten aber auch größere Abhängigkeit von der Ernährungsform. So wiesen weibliche Veganerinnen deutlich geringere Serumkupferkonzentrationen auf, auch wenn sich kein signifikanter Unterschied zur weiblichen Kontrollgruppe aufzeigen ließ. Die männlichen Gruppen zeigten ein sehr homogenes Bild ohne nennenswerte Abweichungen im Bezug auf die jeweils bevorzugte Ernährungsweise. Keine Gruppe lag unterhalb des empfohlenen Referenzwertes.

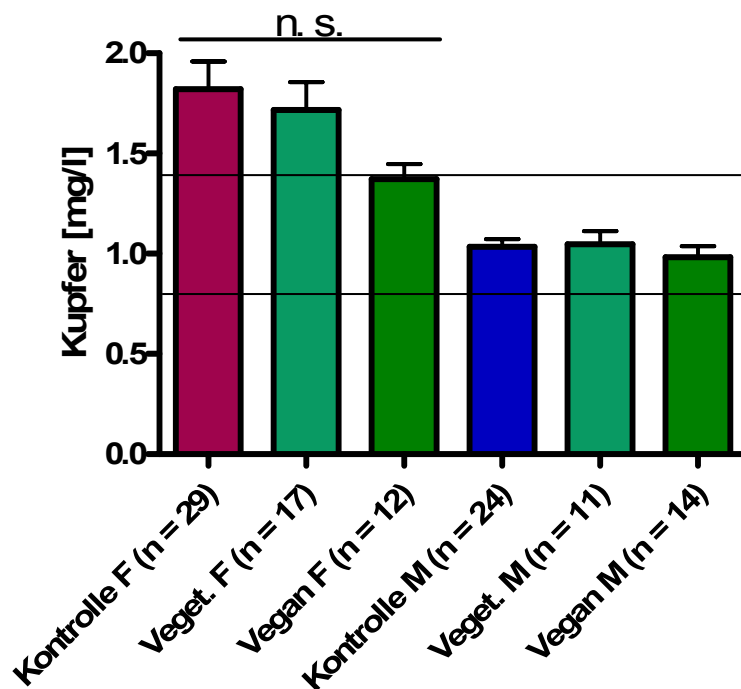


Abb. 10

Gesamtkupferkonzentration (Cu) im Serum. Referenzwert: 0,8 – 1,4 mg/l⁹²

Die Abbildung zeigt die Gesamtkupferkonzentration in mg pro Liter Serum. Innerhalb der weiblichen Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Gleiches gilt für die männlichen Teilnehmenden, wobei aber ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern vorliegt.

Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen Frauen und Männern der Vergleichsgruppen im Bezug auf die Gesamtzinkkonzentration im Serum festgestellt werden (Abb. 11). Auch innerhalb der Frauengruppen konnten keine signifikanten Differenzen im Bezug auf eine Versorgung mit Zink nachgewiesen werden. Bei den männlichen Probanden zeigte sich hingegen eine signifikant niedrigere Gesamtzinkkonzentration bei der vegan lebenden Gruppe. Zwischen den männlichen Vegetariern und der männlichen Vergleichsgruppe gab es aber keine deutlichen Unterschiede.

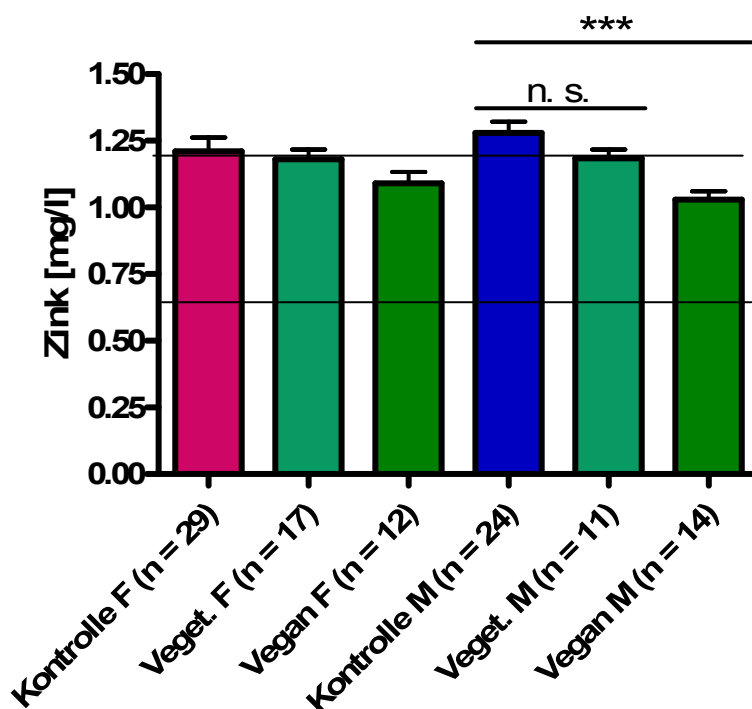


Abb. 11

Gesamtzinkkonzentration (Zn) im Serum. Referenzbereich: 0,65 – 1,2 mg/l⁸⁶

Diese Abbildung stellt die Gesamtzinkkonzentration in mg pro Liter Serum dar. Es sind dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den weiblichen Teilnehmerinnen zu erkennen. Bei den männlichen Probanden hingegen zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Veganern und der Kontrollgruppe. Die Vegetarier weisen keinen Unterschied auf.

Auffällig bei der Bestimmung der Gesamtcalciumkonzentration waren die signifikant höheren Werte bei der vegetarischen Vergleichsgruppe und zwar sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Probanden (Abb. 12). Zwischen den Kontrollgruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden und auch die Gruppen mit veganer Ernährung zeigten keine Abweichung untereinander. Wohingegen die männlichen Veganer einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwiesen. Eine Einordnung in die bestehenden Referenzwerte (88 – 104 mg/l⁹²) für Calcium war nicht möglich, da in der verwendeten Messmethode die endgültige Validierung von Absolutwerten für Calcium noch aussteht.

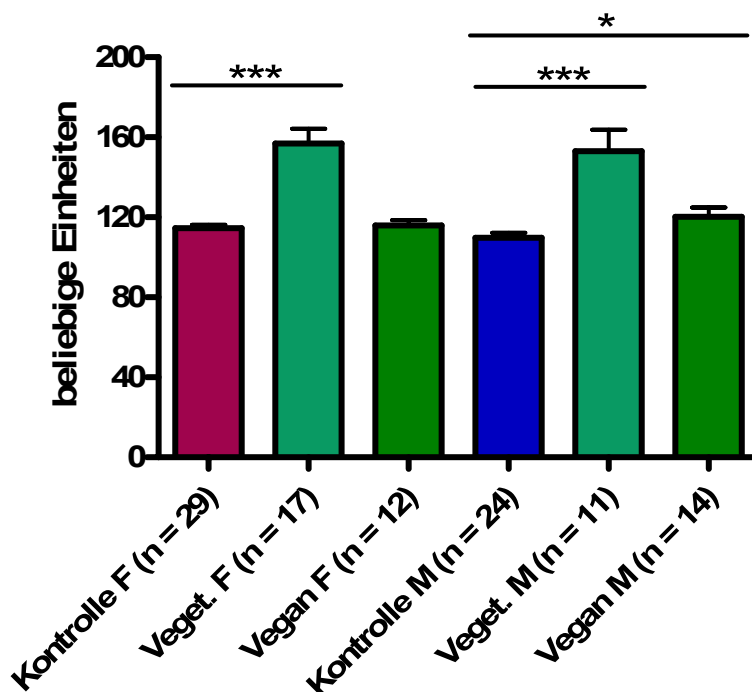


Abb. 12

Gesamtcalciumkonzentration (Ca) im Serum. Dargestellt sind die relativen Werte der Gesamtcalciumkonzentration aus humanem Serum. Hochsignifikante Unterschiede zeigen sich sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Teilnehmenden zwischen den Kontrollgruppen und den jeweiligen Vergleichsgruppen mit vegetarischer Ernährung. Lediglich bei Männern ist zusätzlich ein Unterschied zwischen den Veganern und der Kontrollgruppe vorhanden.

3.2 Muttermilch

Am Anfang der Fragestellung zur Selenversorgung von Neugeborenen stand die Suche nach einer verlässlichen Methode zur Bestimmung des Selenstatus in der Muttermilch. Genau wie im Blut erfasst die Gesamtselenbestimmung in der Muttermilch zwar die Gesamtkonzentration des vorhandenen Selens, erlaubt aber keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Selenformen (Selenoproteine, SeMet, SeCys, anorganisches Selen etc.). Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das enthaltene Selen in einer gut verfügbaren Form vorhanden ist oder in einer für den Säugling unzugänglichen oder unbrauchbaren Form vorliegt. Beispielsweise werden sich hohe Konzentrationen an SeMet zwar in höheren Gesamtselenkonzentrationen des Säuglingsserums widerspiegeln, sie erlauben aber keine Rückschlüsse auf eine ausreichende kindliche Selenoproteinbiosynthese. Da das in SePP enthaltene SeCys eine gute Bioverfügbarkeit zeigt und SePP mit seinen 10 SeCys-Resten somit unter anderem als wichtigstes Speicher- und Transportprotein fungiert, schien die

Bestimmung von SePP eine viel versprechende Alternative. Darüber hinaus konnte SePP in der Milch von Nagern bereits nachgewiesen werden.⁹³

Ähnlich wie Blut handelt es sich bei Muttermilch um eine Suspension, die vor allem aus vier Bestandteilen besteht:

1. Flüssige Phase mit gelösten Stoffen (Zucker, Mineralstoffe etc.)
2. Zelluläre Bestandteile
3. wasser- und fettassoziierte Proteine
4. Fette

Diese Bestandteile befinden sich – wie im Blut – aufgrund von Bewegung und amphiphiler Lösungsvermittlung in einer relativ homogenen Mischung. Jedes Innehalten der Bewegung führt unweigerlich zu einer Entmischung der Bestandteile, sodass Vollmilch – genau wie Vollblut – die Gefahr einer hohen Messungenauigkeit in sich birgt.

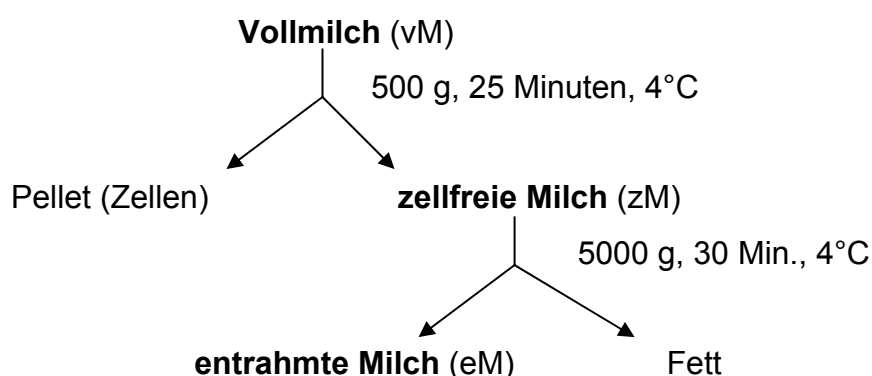


Abb. 13

Zentrifugationsschema für humane Muttermilch. Vereinfachte Darstellung der Milchezusammensetzung. Vollmilch wird nach einer Zentrifugation über 25 Minuten bei 4°C und 500 g in ein Pellet (enthält den Großteil der zellulären Bestandteile der Milch) und den Überstand unterteilt. Der Überstand wird als zellfreie Milch ein weiteres Mal bei 4°C zentrifugiert, jetzt aber bei höherer Umdrehung (5000 g) und für etwas längere Zeit (30 Minuten). Durch diesen zweiten Zentrifugationsschritt bildet sich eine deutliche Fettschicht auf der verbliebenen Milch, sodass die Milch nach Entfernung der Rahmschicht als entrahmte Milch bezeichnet werden kann.

Um dieser Fehlerquelle entgegenzuwirken und eine genauere Charakterisierung zu ermöglichen, wurde in Anlehnung an die Aufarbeitung von Vollblut jede Muttermilchprobe nach einem Zentrifugationsschema von Lonnerdal B et al. in drei Fraktionen unterteilt (Abb. 13).⁸¹

3.2.1 Etablierung der SePP-Messung in humaner Muttermilch

Eine intensive Literaturrecherche konnte keine Eintragungen zur Bestimmung von SePP in der humanen Muttermilch aufzeigen, sodass für die Etablierung der Messung auf keinerlei Erfahrung zurückgegriffen werden konnte. Daher stand als Ausgangssituation lediglich die bereits mehrfach erprobte und von Frau Hollenbach B et al. 2008 publizierte immunologische Methode zur Messung von humanem SePP aus Serum zur Verfügung.⁴⁶

Aus diesem Grund galt die erste Messung der grundsätzlichen Frage, ob SePP aus humaner Muttermilch mit dem vorhandenen Assay überhaupt detektiert werden kann. Ebenso stand die Frage nach der präanalytischen Vorgeschichte der Proben im Raum, d.h., wie stabil ist der Analyt in der Matrix Muttermilch bzgl. Temperatur, Zeit, Einfrier- und Auftauprozessen. Gleichzeitig sollten erste Aussagen über eine notwendige Probenmenge gewonnen werden, die gegebenenfalls für weitere Messungen als Grundlage dienen sollte. Schließlich sollte anhand der Ergebnisse abgeschätzt werden, welchen relativen Bestandteil SePP an der Selenkonzentration von Muttermilch hat.

Für diese Fragen wurde die Milch (M1 – M4) von vier gesunden Müttern vermessen, wobei alle drei Fraktionen (VM, zM, eM) sowohl unverdünnt als auch in einer 1:26 Verdünnung im Sandwich-ELISA eingesetzt wurden. Das Ergebnis (Abb. 14) zeigte erfreulicherweise eine gute Detektierbarkeit von SePP in der Muttermilch, wies aber auch deutlich darauf hin, die Proben im Gegensatz zum Serum unverdünnt einzusetzen, da die Messwerte sonst in der Größenordnung des niedrigsten Standards (ca. 900 RLUs) lagen.

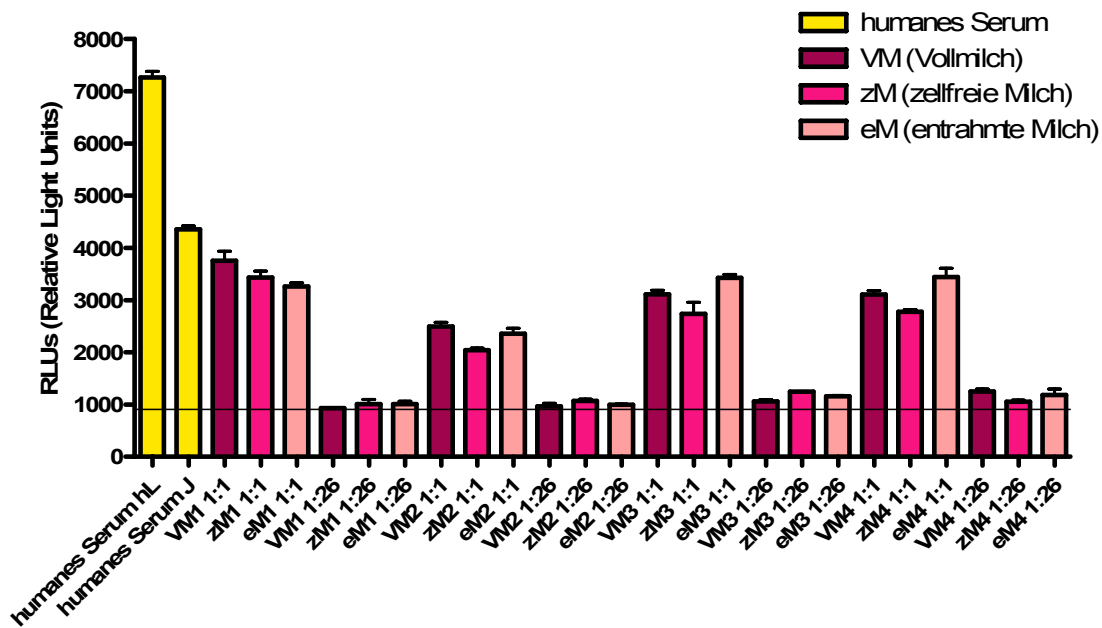


Abb. 14

Detektion und relative Quantifizierung von SePP in humaner Muttermilch. Aufgeführt sind relative Werte der SePP-Konzentrationen in Form von Relative Light Units (RLUs) pro 50 µl verdünnter bzw. unverdünnter Probe. Die eingezeichnete Linie gibt den niedrigsten Standard der Standardreihe wieder. Zum Vergleich sind zwei Serumproben mit gemessen worden, die in absoluten Einheiten 44 bzw. 38 µg Se/l und 0,8 bzw. 0,4 mg SePP/l enthielten.

Zur weiteren Interpretation wurden die gewonnenen Ergebnisse in Absolutwerte umgerechnet (Abb. 15a) und die Messung mit den gleichen Proben wiederholt (Abb. 15b), um erste Eindrücke über die Reproduzierbarkeit der Messungen zu erhalten. Erstaunlicherweise ergab die Messung der gleichen Proben nach dem zweiten Auftauen signifikant unterschiedliche Werte im Gegensatz zu denen nach dem ersten Auftauen, was im klaren Widerspruch zu den Ergebnissen bezüglich der Reproduzierbarkeit aus Serumproben steht.⁴⁶ Deutlich wurde auch, dass sich die Konzentrationsänderung nicht in allen Milchfraktionen gleichermaßen darstellt. Besonders die zellfreie Milch zeigte einen so deutlichen Abfall, dass die SePP-Konzentration der zM2 sogar unter die Nachweisgrenze sank. Wesentlich geringer beeinflusst schienen die Fraktionen der Vollmilch, die zwar auch deutlich an absolutem Messwert abnahmen, aber nicht in dem Maße wie die zellfreie Milch. Den geringsten Veränderungen unterlag die entrahmte Milch, deren Werte noch am ehesten den Ursprungswerten entsprachen.

Erste Aussagen bezüglich der Konzentration von SePP in der Muttermilch ließen einen Faktor von 100 unter der bekannten Konzentration aus Serum ableiten.

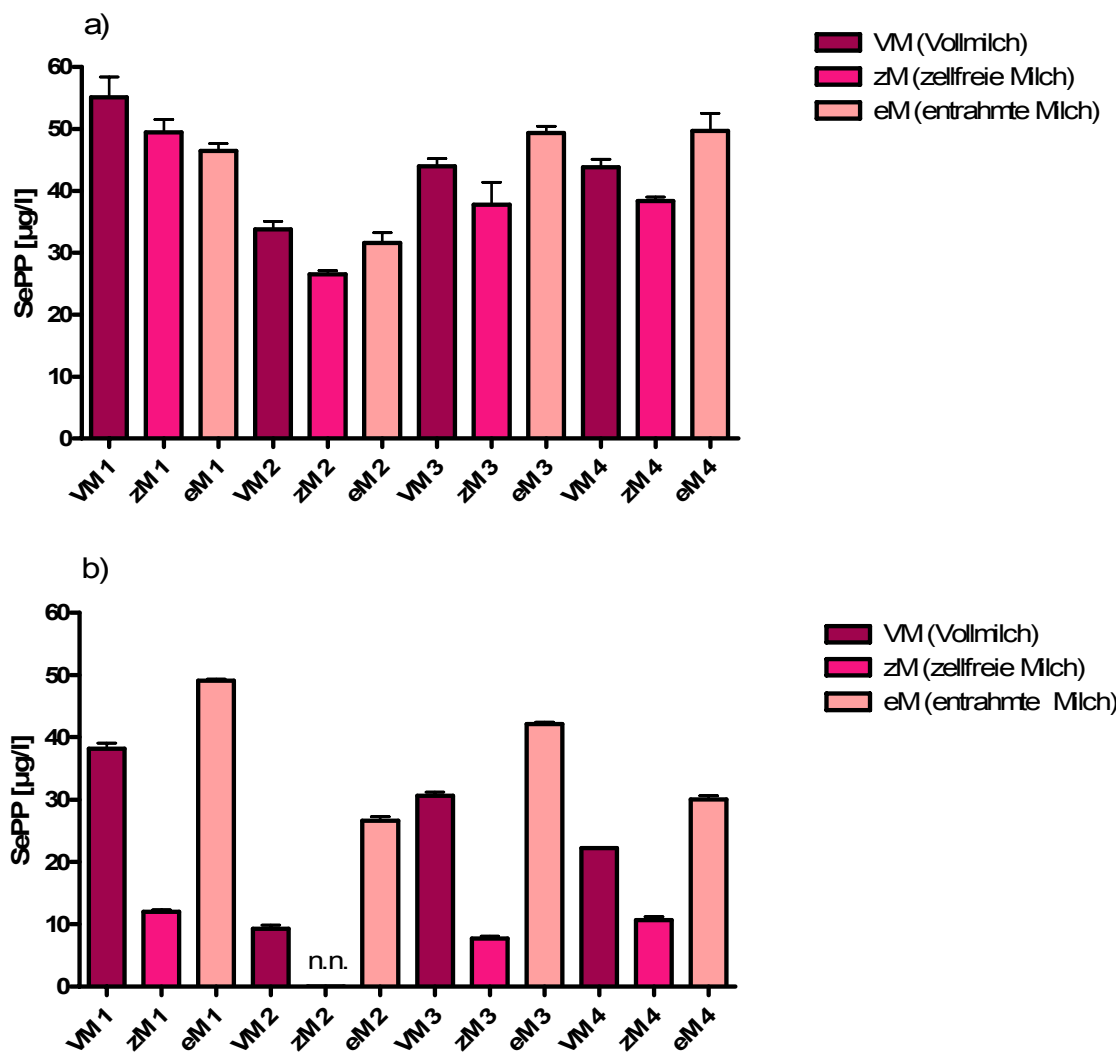


Abb. 15

a) 1. Vorversuch in absoluten Werten, nach einmaligem Auftauen

b) 2. Vorversuch in absoluten Werten, nach zweimaligem Auftauen

Aufgeführt sind die Absolutwerte des SePP in µg/l unverdünnter Muttermilch in Mittelwerten und Standardabweichungen. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Werten nach einmaligem bzw. zweimaligem Auftauen. Am stärksten betroffen sind die Fraktionen der zellfreien Milch (zM). In einer Muttermilchprobe sank die SePP-Konzentration unter die Nachweisbarkeitsgrenze (n. n. = nicht nachweisbar)

Diese Ergebnisse der deutlich geringeren SePP-Werte im Vergleich zum Serum sollten zusätzlich durch einen Westernblot überprüft werden. Gleichzeitig diene diese Analyse der Überprüfung, ob es sich in der Milch um das gleiche (Größe, Bandenmuster, Laufverhalten) SePP wie im Serum handelte. In Abb. 16 sind Serum und Muttermilch im Vergleich zu sehen.



Abb. 16

Westernblot. Dargestellt ist ein Westernblot mit dem typischen Bandenmuster für SePP (ca. 57 kDa). Die eingesetzten Probenmengen betragen 0,25 µl humanes Serum und 6 µl Muttermilch. Als Negativkontrolle wurde Mausserum verwendet.

Um den unerwarteten Konzentrationsabfällen von SePP durch einmaliges Einfrieren und Auftauen näher nachzugehen wurden zur Überprüfung der Stabilität von SePP die Muttermilchproben kontrolliert mehrmals aufgetaut und eingefroren, sowie bei Raumtemperatur gelagert (Abb. 17).

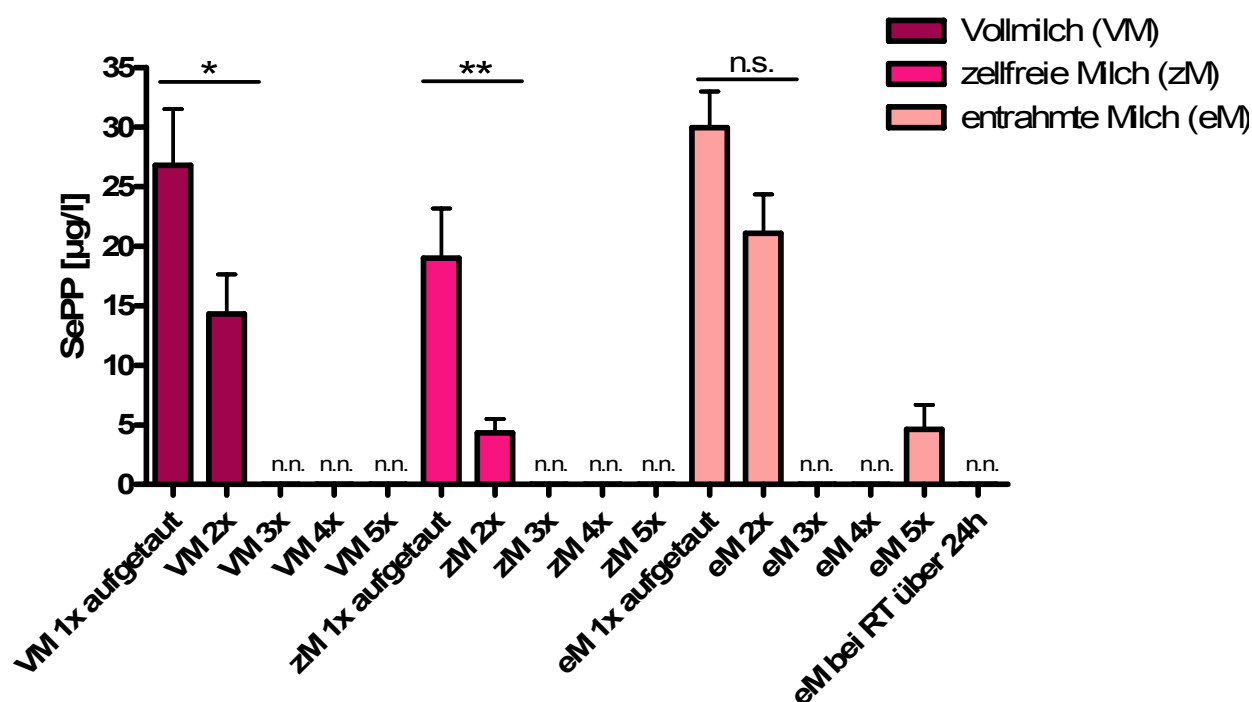


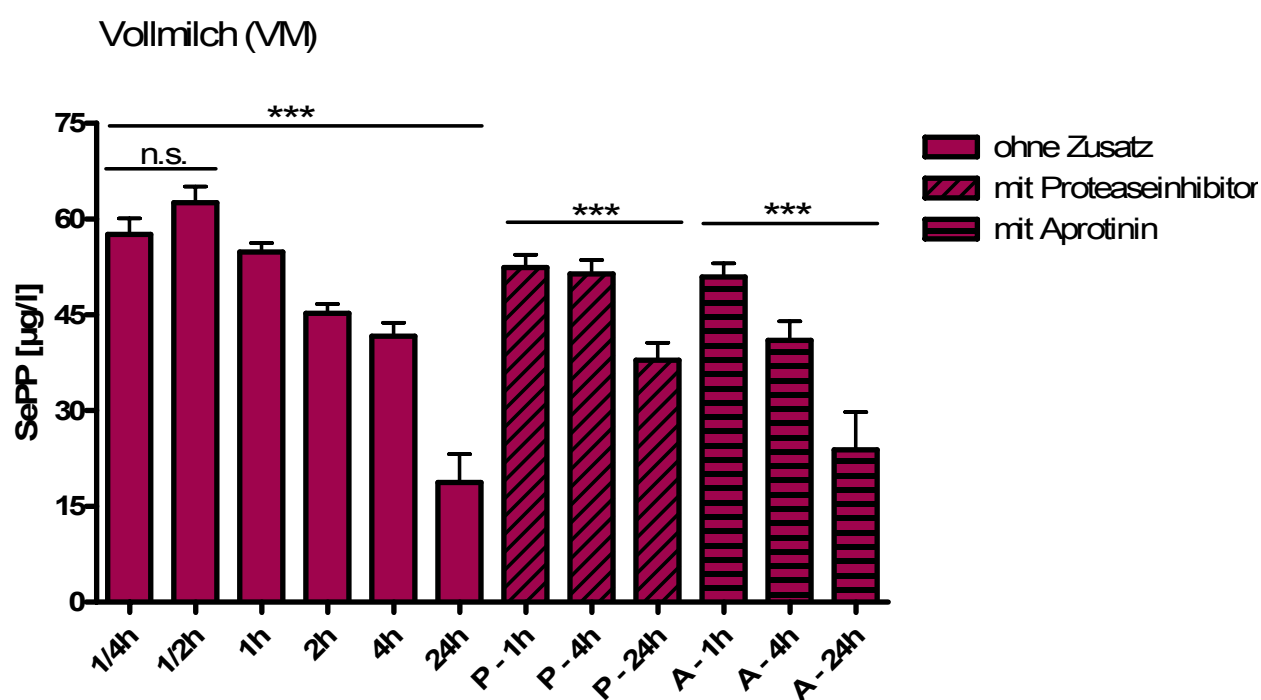
Abb. 17

Stabilitätsprüfung: Auftauen – Einfrieren – Raumtemperatur (RT). Aufgeführt sind SePP-Konzentrationen in µg pro Liter unverdünnte Milch, dabei jeweils in Vollmilch (VM), zellfreier (zM) und entrahmter Milch (eM) bestimmt. Bereits nach zweimaligem Auftauen zeigen sich bei VM und zM signifikante Unterschiede, die bei der eM erst nach dem dritten Auftauen eintreten. Nach drei Auftauzyklen sind die SePP-Konzentrationen in der Regel unter die Nachweisgrenze gesunken (n. n. = nicht nachweisbar). Gleiches gilt für eine Lagerung bei Raumtemperatur über 24h.

Das Ergebnis wies anschaulich auf die große Empfindlichkeit von SePP in der Muttermilch hin und bestätigte somit den Verdacht, der schon durch den Vergleich zwischen ein- und zweimaligem Auftauen entstanden war.

Zusätzlich bestand ein eindeutiger Unterschied zwischen den verschiedenen Milchfraktionen (vM, zM, eM). Am instabilsten erwies sich SePP in der zM, und zeigte sich im Gegensatz dazu in der eM am beständigsten.

Da durch die Erfahrung mit SePP-Messung aus Serum bekannt ist, dass Einfrier-Auftau-Zyklen bis zu einem gewissen Grade von SePP toleriert werden und den Messwert nicht negativ beeinflussen, ergab sich die Frage nach der Ursache des deutlichen Abfalls der SePP-Konzentration in Milch. Außerdem stellte die unterschiedliche Stabilität in den einzelnen Fraktionen ein zusätzliches Argument dafür dar, dass die Verringerung von SePP nicht allein auf den physikalischen Vorgang des Einfrierens bzw. Auftauens zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde ein gängiges Verfahren zum Schutz von enzymkatalysierten Proteinabbau angewendet, indem den Proben ein Proteaseinhibitormix zugesetzt wurde, der sowohl Serin- als auch Cysteinproteasen hemmt. Um die mögliche Beteiligung einer Proteasenfamilie näher eingrenzen zu können, wurden parallel Proben mit Aprotinin versetzt, was ausschließlich die Aktivität von Serinproteasen blockiert (Abb. 18).



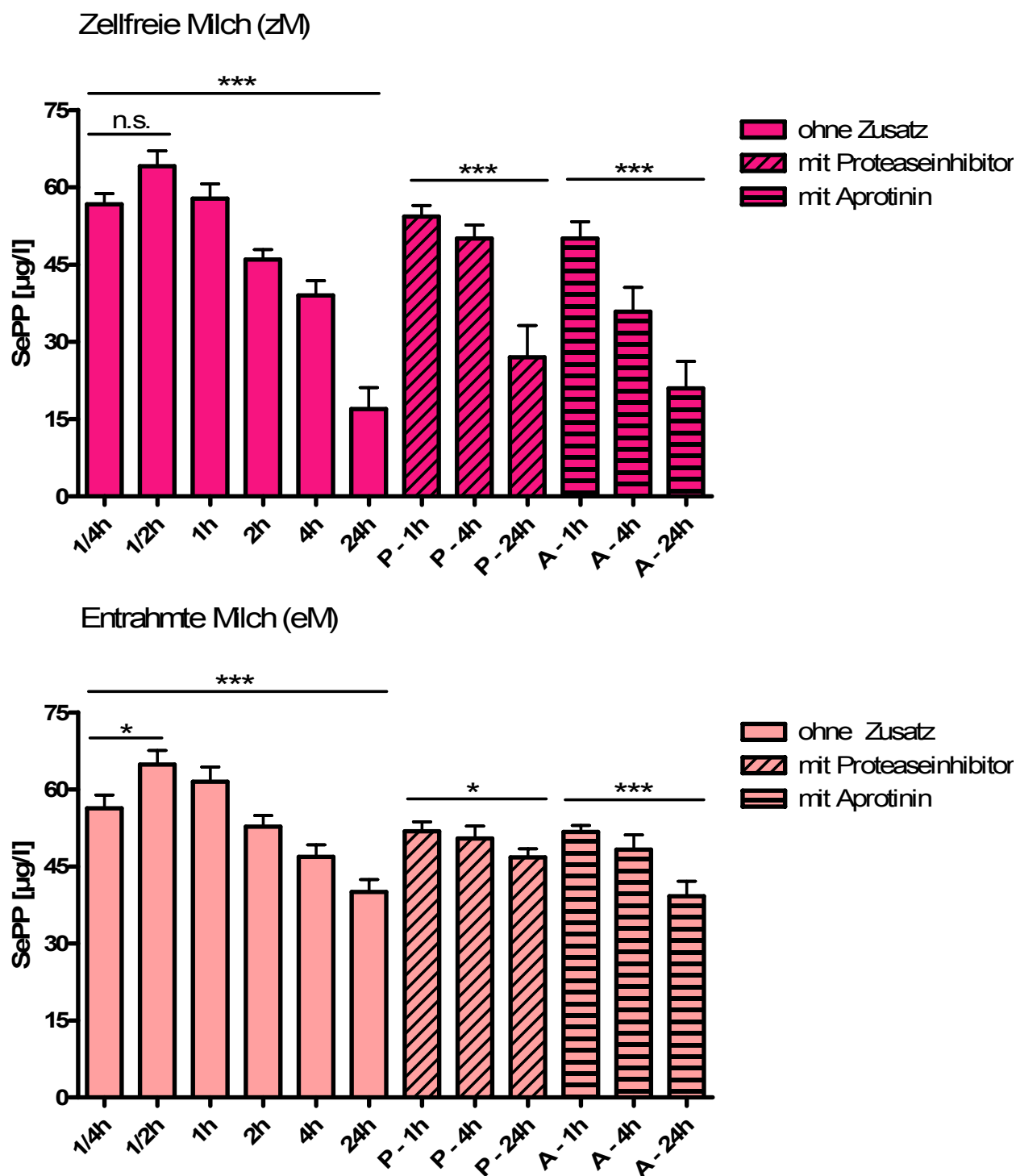


Abb. 18

SePP-Abbau in der Muttermilch über die Zeit. Der Versuch wurde für alle drei Milchfraktionen (VM, zM, eM) separat durchgeführt. Dabei bezogen sich die Vergleichswerte immer auf das Ergebnis der Probe mit der geringsten Wartezeit vor Messbeginn (1/4 Stunde bzw. eine Stunde). Angegeben sind Mittelwerte der SePP-Konzentration in µg pro Liter unverdünnter Milchprobe und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Grundsätzlich zeigte sich in allen drei Fraktionen das gleiche Bild, jedoch zum Teil in unterschiedlicher Ausprägung. Der messbare Anstieg von SePP innerhalb der ersten halben Stunde war nur in der eM signifikant, in der VM und zM aber auch deutlich nachzuvollziehen. Interessanter Weise war der Abfall nach 24 Stunden in der VM und zM viel größer als in der eM, was wiederum die beste Haltbarkeit in der eM bestätigte. Gleiches war auch in den Proben zu beobachten, denen entweder der Proteaseinhibitor oder das Aprotinin zugesetzt worden war. VM und zM zeigten eindeutig stärkere SePP-Konzentrationsminderungen über 24 Stunden. Insgesamt konnte ein Verlust von immunreaktivem SePP über 24 Stunden bei Raumtemperatur aber in keiner der drei Fraktionen verhindert werden.

Als weitere Untersuchung des möglicherweise Protease bedingten SePP-Abbaus wurden versuchsweise Serumproben mit 5% Muttermilch versetzt und über 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die dahinter stehende Fragestellung war, ob das was in der Muttermilch SePP abbauen kann, dies auch noch im Serum vermag. Zur Differenzierung zwischen SePP-Verlust aufgrund der Lagerung bei Raumtemperatur und dem SePP-Verlust durch die Muttermilch wurde eine Serumprobe ohne Muttermilch genau wie die versetzten Proben über 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert (Abb. 19).

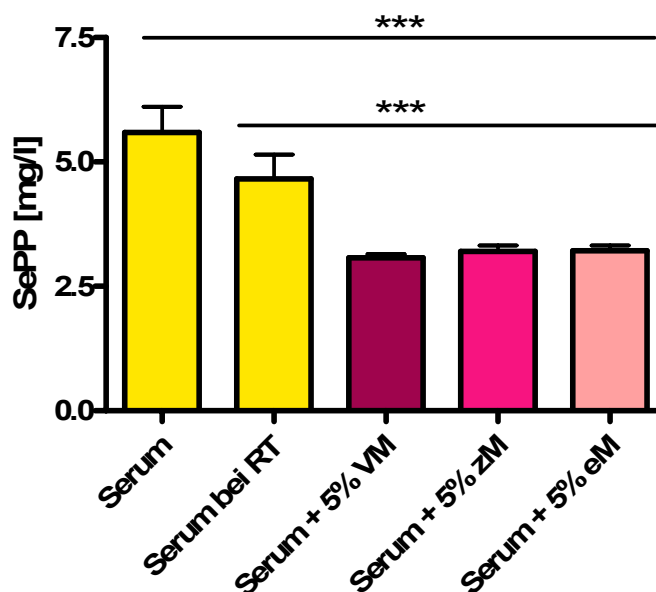


Abb. 19

SePP Konzentration in mit Muttermilch versetztem Serum. Dargestellt sind die SePP-Konzentrationen in mg pro Liter humanem Serum, das zum Teil mit Muttermilchproben versetzt wurde. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Im Vergleich zum reinen Serum zeigen alle, mit Muttermilchfraktionen versetzte Serumproben hochsignifikant niedrigere SePP-Konzentrationen.

Das Ergebnis des ersten Vorversuchs zeigte nach 24 Stunden einen signifikanten Abfall der SePP-Konzentrationen in allen mit Muttermilch versetzten Proben. Dies galt auch dann, wenn als Vergleichswert die SePP-Konzentration der bei Raumtemperatur gelagerten Serumprobe herangezogen wurde und konnte nicht durch den Verdünnungsfaktor aufgrund der geringen SePP-Konzentration in der Muttermilch erklärt werden, da dieser maximal 5% (vol/vol) betrug.

Dieses sehr deutliche Ergebnis warf daher mehrere Fragen auf. Denn auch wenn der Abfall der SePP-Konzentration nicht durch den Verdünnungsfaktor, der durch die Vermischung mit der Muttermilch entstanden war, erklärt werden konnte, fehlte doch der Nachweis, dass der Verlust wirklich aufgrund von enzymatischer Aktivität zustande gekommen war. In einem zweiten Versuch sollte daher näher eingegrenzt werden, was für den Abfall von SePP verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden sowohl Serum- als auch Plasmaproben vorbereitet und Milchproben aller drei Fraktionen (VM, zM, eM) über fünf Minuten auf 95°C erhitzt, um jegliche Enzymaktivität durch Hitzedenaturierung zu verhindern. Wie im Vorversuch wurden jeweils 95 µl Serum bzw. Plasma mit 5 µl erhitzter oder nicht erhitzter Muttermilch (entsprechend 5%) gemischt und dieses Prozedere für alle drei Fraktionen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 a-d zusammengefasst.

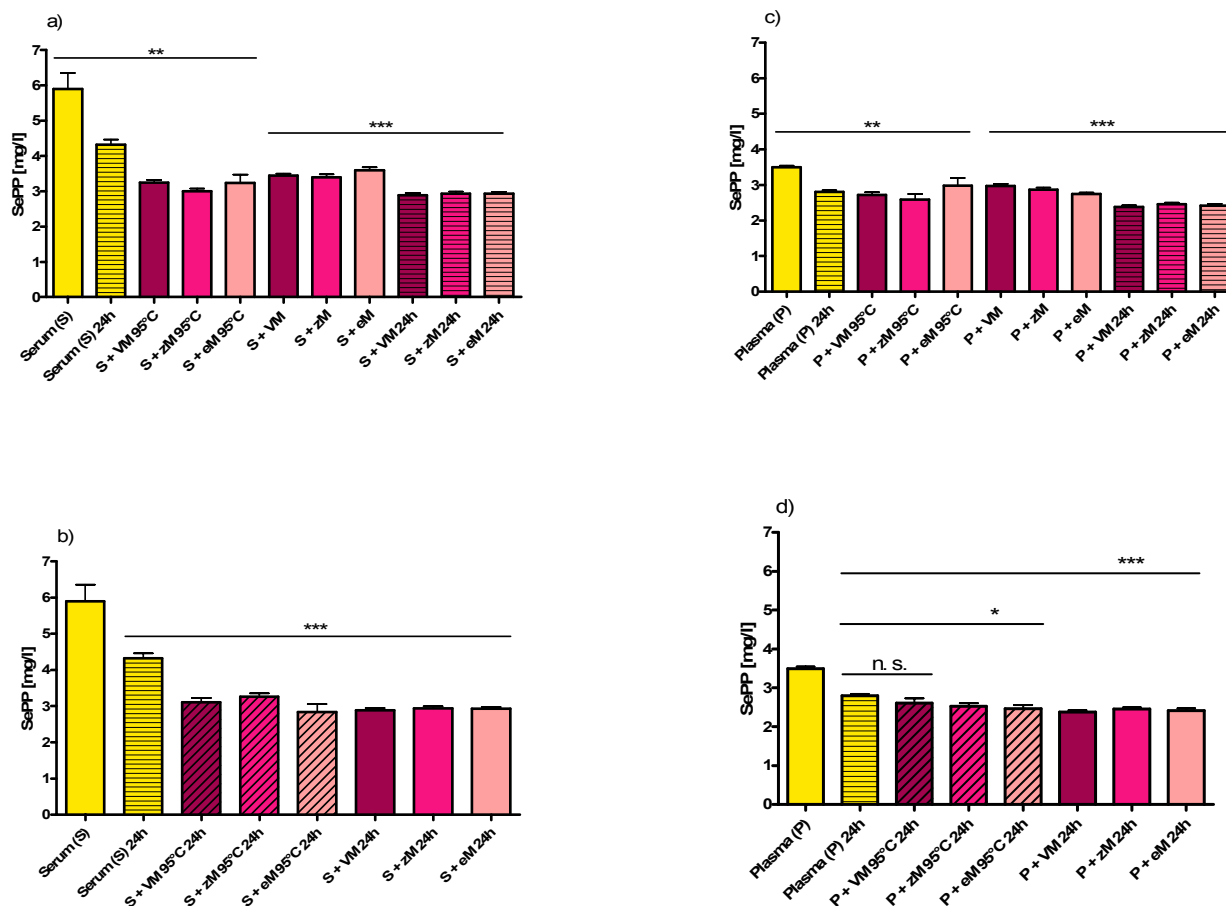


Abb. 20

SePP Konzentration in mit Muttermilch versetztem Serum bzw. Plasma

- a) 5% Muttermilch in Serum, direkt und nach 24 h gemessen
- b) 5% Muttermilch in Serum, nach 24 h gemessen
- c) 5% Muttermilch in Plasma, direkt und nach 24 h gemessen
- d) 5% Muttermilch in Plasma, nach 24 h gemessen

Verwendung von humanem Serum bzw. humanem Plasma, welches teilweise mit Muttermilch (VM, zM, eM) vermischt wurde. Die Endkonzentration der Muttermilchfraktion im Serum bzw. Plasma entsprach 5%. Aufgeführt sind die SePP-Konzentrationen in mg pro Liter Serum als Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung.

Auffällig war, dass selbst durch die Vermischung mit erhitzter Muttermilch und unmittelbarer Weiterverarbeitung der Proben im Assay ein deutlich signifikanter Abfall an SePP zu verzeichnen ist. Dieser konnte weiterhin nicht durch den Verdünnungsfaktor erklärt werden, da die Differenz zwischen den Ergebnissen größer als 5% war. Zusätzlich gab es einen hochsignifikanten Abfall der SePP-Konzentration zwischen den mit Muttermilch gemischten Proben, die direkt und denen die nach 24 Stunden

Lagerung bei Raumtemperatur vermessen wurden, doch konnte dieser Abfall nicht sicher auf einen enzymatischen Abbau zurückgeführt werden.

Ferner fiel auf, dass die Menge an SePP im Plasma deutlich unter der von SePP im Serum lag.

3.2.3 GPx Messung

Neben der Etablierung zur Bestimmung von SePP sollten GPx-Messungen in der Muttermilch die Daten des Selenmetabolismus ergänzen. Hierfür wurde eine erste Orientierungsmessung durchgeführt, die die bestehende Methode zur Bestimmung der GPx-Aktivität in Serum und Zelllysaten auf ihre Detektionsmöglichkeiten in der Muttermilch testen sollte (Abb. 21).

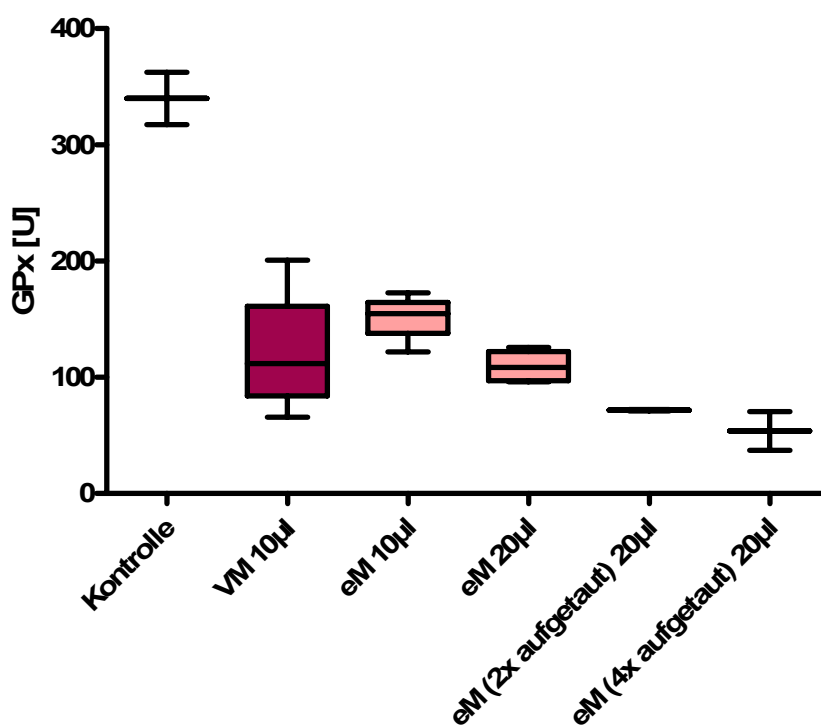


Abb. 21

Erste Orientierungsmessung zur GPx-Aktivität in der Muttermilch. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung, der GPx-Aktivität in nmol pro Minute und ml Milchprobe. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur und das eingesetzte Probenvolumen betrug 10 oder 20 µl (siehe Graphik).

Dabei zeigte sich, dass Vollmilch (VM) aufgrund des großen Feststoffanteils äußerst ungeeignet für die Messung war. Durch den hohen Anteil an Schwebestoffen konnte keine homogene Mischung in der Reaktionsküvette erzeugt werden, sodass nur schwer reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen waren. Gleichzeitig wurde der Lichtstrahl

des Photometers durch die Trübung beeinflusst, was die Messung zusätzlich ungenau machte.

Im Bezug auf die Probenmenge zeigten Wiederholungsmessungen mit 20 μl geringere Fehlerbalken als Messungen mit 10 μl . Da Muttermilchproben in der Regel im Bereich mehrerer ml zur Verfügung standen und somit das Probenvolumen diesbezüglich keinen limitierenden Faktor darstellte, fiel die Entscheidung für alle weiteren Messungen auf 20 μl eingesetztes Probenvolumen. Mehrfach aufgetaute Proben wurden nur der Vollständigkeit halber mit in die Messreihe aufgenommen, stellten aber keine sinnvolle Alternative zu den erstmals aufgetauten Proben dar. In einer zweiten Messreihe wurden diese Ergebnisse in Vierfachbestimmung verifiziert (Abb. 22).

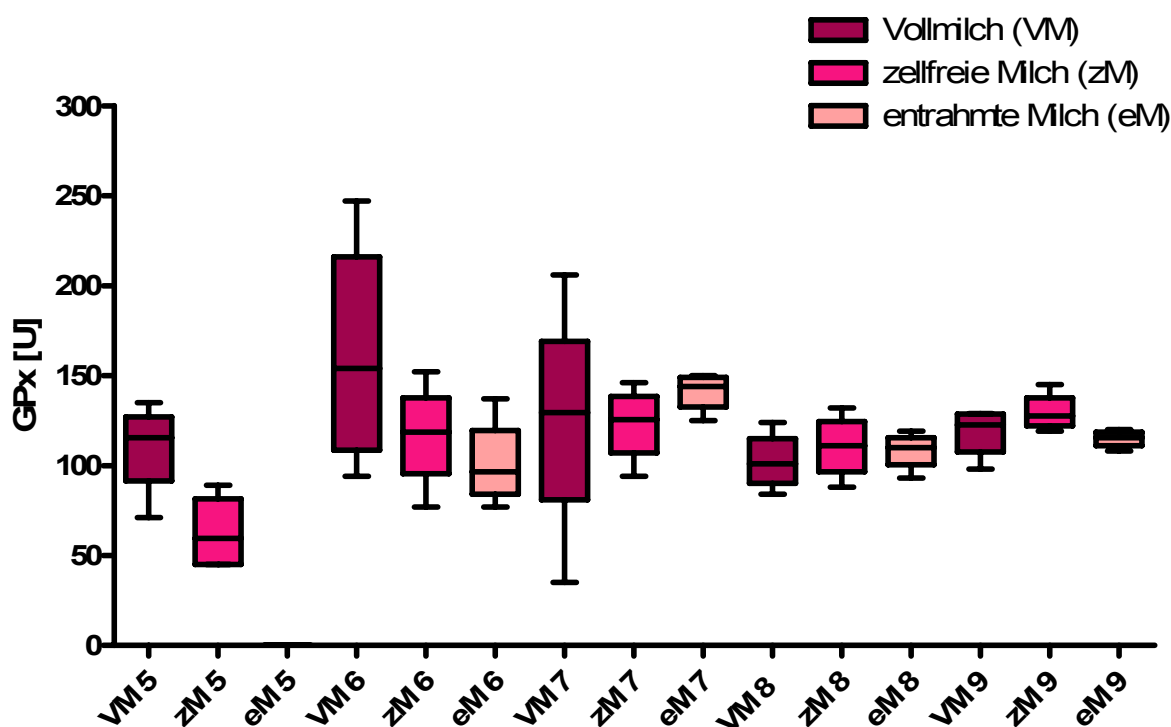


Abb. 22

GPx-Aktivität in Muttermilch. Angegeben sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung der GPx-Aktivität in nmol pro Minute und ml Muttermilchfraktion. Eingesetzt wurden jeweils 20 μl Probe, wobei alle Messungen bei Raumtemperatur erfolgten. Für die Bestimmung der eM 5 stand nicht genügend Probenmenge zur Verfügung, bei den anderen Milchpräparaten zeigte sich ein relativ einheitliches Bild.

Erneut konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Vollmilch die ungenauesten Ergebnisse bei der GPx-Aktivitätsbestimmung lieferte. Dies erlaubt die Empfehlung für weitere Versuche, keine Vollmilch zur Bestimmung der GPx-Aktivität zu verwenden. Um

die Aussage – entrahmte Milch würde die geringste Messungenauigkeit aufweisen – weiter zu bestätigen, wurde der Variationskoeffizient von jeder Vierfachmessung bestimmt (Abb. 23). Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Variationskoeffizienten von Vollmilch und entrahmter Milch, während der Unterschied zwischen zellfreier und entrahmter Milch zwar nicht signifikant, aber von der Tendenz doch deutlich sichtbar war. Um der Frage nachzugehen, ob durch den Zentrifugationsprozess erhebliche Mengen an GPx verloren gehen und damit signifikante Änderungen der Messergebnisse nach sich ziehen würden, wurden die jeweiligen Mittelwerte einander gegenüber gestellt (Abb. 24). Auch hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden und die scheinbar höheren Werte der Vollmilch können glaubhaft durch die größere Messbreite aufgrund von erhöhter Messungenauigkeit erklärt werden. Somit konnte bestätigt werden, dass der Einsatz von 20 µl entrahmter Milch (eM) die reproduzierbarsten Ergebnisse lieferte.

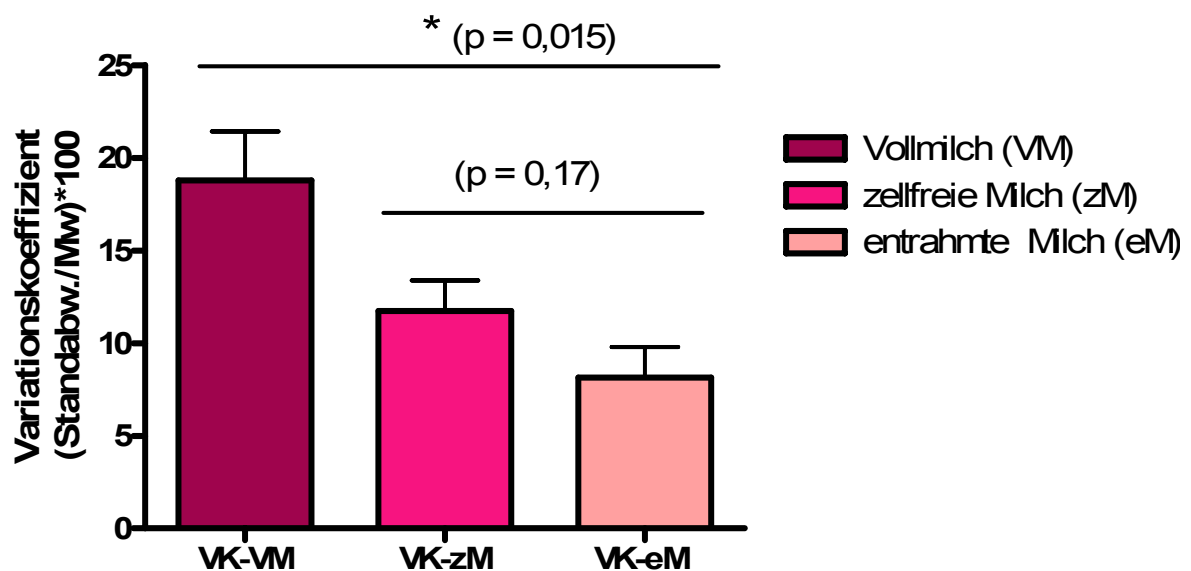


Abb. 23

Gegenüberstellung der Variationskoeffizienten bei der pGPx Aktivitätsbestimmung aus Muttermilch. Darstellung der Variationskoeffizienten der GPx-Messungen in absoluten Zahlen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Berechnung erfolgte wie folgt: Variationskoeffizient = (Standardabweichung/Mittelwert)*100.

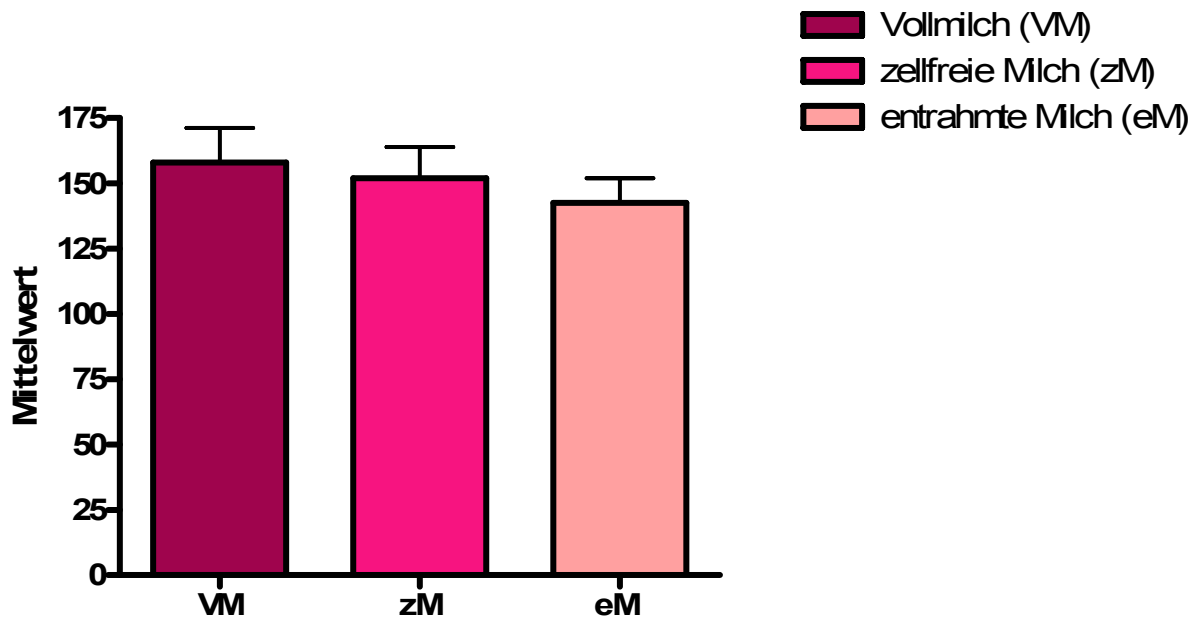


Abb. 24

Gegenüberstellung der Mittelwerte. Aufgeführt sind die gesamten Mittelwerte der GPx-Konzentrationen einer Fraktion jeweils als Mittelwert und mit Standardabweichung. Keine signifikanten Unterschiede sind zwischen den Mittelwerten der Fraktionen nachweisbar.

3.2.3 Spurenelemente und Elektrolyte

Ein sehr anschauliches Ergebnis zeigte sich bei der Messung der Gesamtselenkonzentration in Vollmilch im Verlauf über die Zeit (Abb. 25). Die Konzentration von Selen nahm immer weiter ab, sodass am 54. Laktationstag nicht einmal mehr halb soviel Selen in der Muttermilch zu finden war, wie im Kollostrum am 3. Laktationstag.

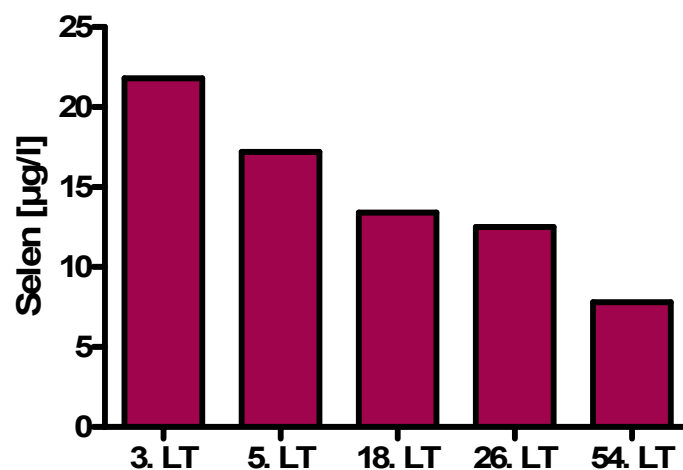


Abb. 25

Gesamtselenkonzentration in VM im zeitlichen Verlauf. Aufgeführt sind Gesamtselenkonzentrationen in µg pro Liter Vollmilch. Dabei entspricht der LT = Laktationstag nicht dem Lebenstag des Kindes, da der Milcheinschuss in der Regel nicht unmittelbar mit der Geburt einsetzt.

Die Bestimmung von Kupfer und Eisen (Abb. 26) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen.

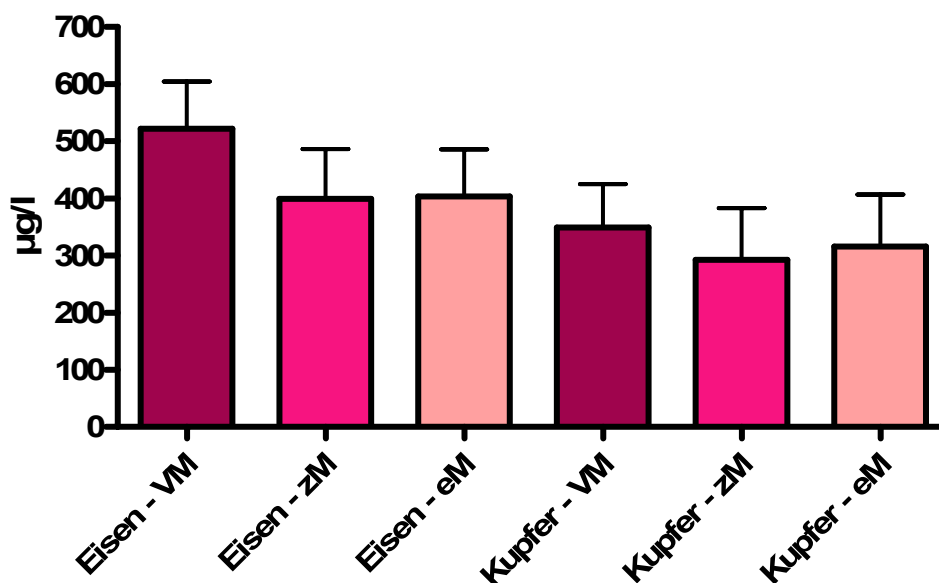


Abb. 26

Gesamtkonzentration von Eisen und Kupfer. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtkonzentrationen von Eisen und Kupfer in den drei Milchfraktionen (VM, zM, eM). Keine signifikanten Unterschiede sind zwischen den Gruppen nachzuweisen. Richtwerte laut Nährwerttabelle: ca. 580 µg/l Gesamteisenkonzentration und ca. 350 µg/l Gesamtkupferkonzentration.⁶⁶

In den Konzentrationen stimmen die gemessenen Werte gut mit denen in der weiter oben aufgeführten Nährstofftabelle überein, die für reife Frauenmilch Eisenkonzentrationen von ca. 580 µg/l und Kupferkonzentrationen von ca. 350 µg/l angibt.⁶⁶

Des Weiteren wurden die Gesamtkonzentrationen von Zink (Abb. 27) und Mangan (Abb. 28) bestimmt. Dabei zeigten sowohl die Zink-, als auch die Mangankonzentrationen deutlich höhere Werte, als in der Nährwerttabelle⁶⁶ angegeben waren.

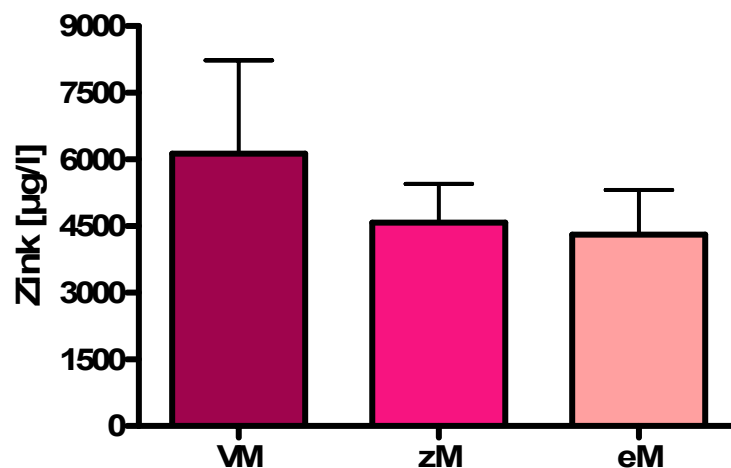


Abb. 27

Gesamtzinkkonzentration in Muttermilch. Aufgeführte Werte der Gesamtkupferkonzentration als Mittelwerte und Standardabweichung in µg pro Liter Milchfraktion (VM, zM, eM). Richtwert für Zink laut Nährwerttabelle: 1340 µg/l⁶⁶.

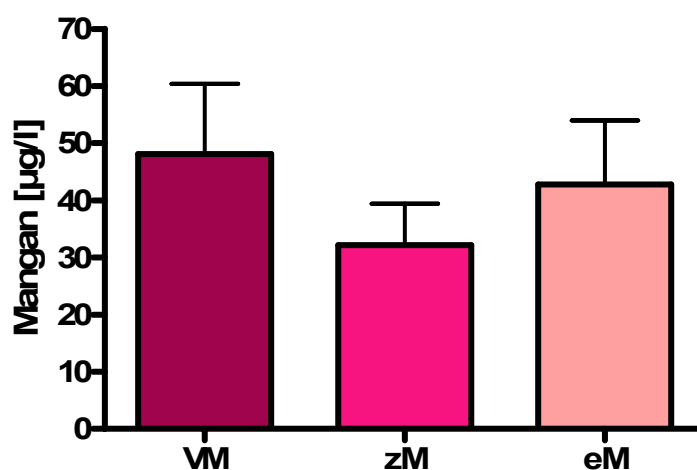


Abb. 29

Gesamt mangankonzentration in Muttermilch. Dargestellt sind die Gesamtkonzentrationen des Mangans in den drei Milchfraktionen (VM, zM, eM) in Mittelwerten und Standardabweichung. Richtwert für Mangan laut Nährwerttabelle: ca 7,1 µg/l⁶⁶.

Interessanterweise wies die eM bei der Manganbestimmung tendentiell höhere Werte auf als die zM, ein Ergebnis, was aber unter diesen Bedingungen nicht signifikant war.

4. Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so können zwei Kernaussagen zusammengefasst werden:

- Menschen mit omnivorer Ernährung unterscheiden sich im Selenstatus von Menschen mit vegetarischer und veganer Ernährung, wobei die Unterschiede aber abhängig vom gewählten Biomarker des Selenstatus sind.
- SePP ist ein Bestandteil der humanen Muttermilch und beinhaltet etwa 5% des in der Milch nachweisbaren Selens. Im Gegensatz zum Serum ist SePP in der Muttermilch aber weniger stabil und liegt damit eventuell in einer für den kindlichen Organismus besser verwertbaren Form vor. Die Aktivität der löslichen GPx in Muttermilch entspricht hingegen den Konzentrationen der pGPx im Blut.

Im Folgenden soll nun genauer auf diese Aussagen eingegangen und die Ergebnisse darüber hinaus im größeren Kontext diskutiert werden.

4.1. Vegetarismus-Studie

Den Anfang der Untersuchung bildete die Frage, ob ein Unterschied in der Selenversorgung in Abhängigkeit von der Ernährung existiert. Dabei bestand die Hypothese, dass ein hauptsächlich oder ausschließlicher Konsum pflanzlicher Nahrung zu einer Mangelsituation in Deutschland führen könnte, da die meisten pflanzlich basierten Nahrungsbestandteile als selenarm einzustufen sind. Gleichzeitig sollte mit dieser Untersuchung überprüft werden, ob sich SePP als zuverlässiger Marker zur Beurteilung des Selenstatus der unterschiedlich ernährten Menschengruppen eignet. Eine weitere Grundlage der oben gemachten Annahme liegt in dem Umstand, dass die unterschiedlichen Selenstoffwechselwege von Pflanzen und Tieren dem Menschen verschiedene Selenformen zur Verfügung stellen, die unterschiedlich gut zur Biosynthese von Selenoproteinen genutzt werden könnten. Werden vorwiegend pflanzliche Produkte zu sich genommen, ist die Aufnahme von SeMet deutlich höher als bei regelmäßigem Fleischkonsum. Gleichzeitig sind tierische Produkte gute und reichhaltige Quellen für SeCys, die dem Körper kaum durch Pflanzen zugeführt werden können (siehe Abb. 29).⁹⁴

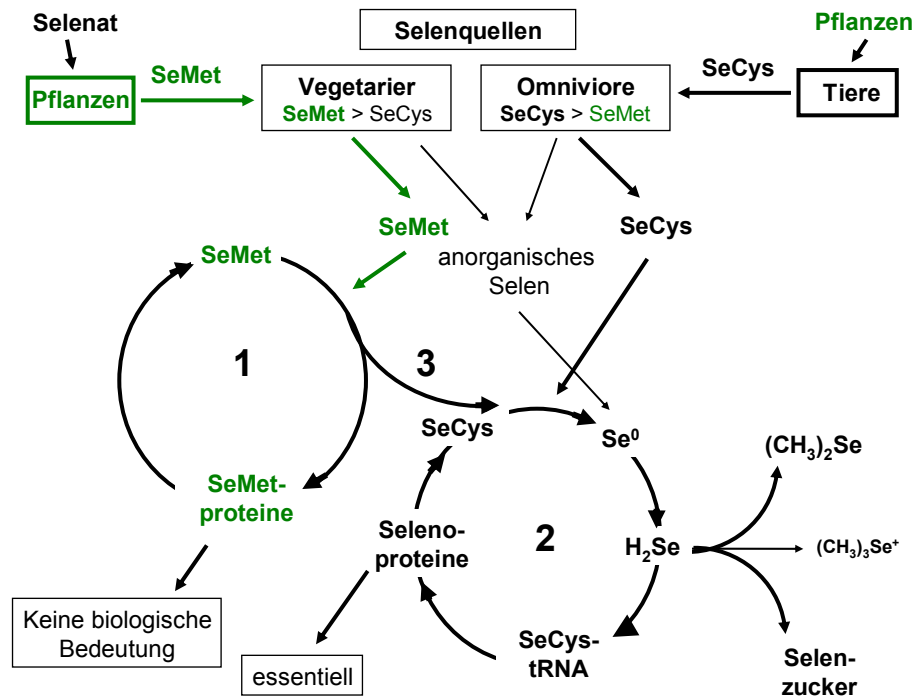


Abb. 29

Vereinfachte Darstellung des Selenmetabolismus. In Abhängigkeit der Ernährungsform überwiegen entweder SeMet oder SeCys als Quelle der aufgenommenen Selenversorgung. Ein Teil des SeMet wird dabei über eine Transsulfurierungsreaktion (3) der Neusynthese von SeCys zur Verfügung gestellt, wodurch es der Proteinbiosynthese essentieller Selenoproteine zur Verfügung steht (2). Zusätzlich kann SeMet äquivalent zu Methionin in Eiweiße eingebaut werden, ohne dass diesen Proteinen eine neue – selen-spezifische – Funktion zugeschrieben werden könnte (1).

Mehrfach ist bisher beschrieben worden, dass nicht alle Selenoproteine im Körper der gleichen Versorgung unterliegen und dass gerade in Selenmangelsituationen eine Priorität für bestimmte Selenoproteine besteht.^{5,83} Zusätzlich scheint eine Hierarchie zwischen den verschiedenen Organen zu existieren, wenn es darum geht, die Selenversorgung in Zeiten des Mangels aufrecht zu erhalten.^{5,84} Bis heute liegen aber noch keine abschließenden Daten über die genauen Mechanismen der Selenoproteinpräferenzen vor, die zeigen würden, welchen Proteinen dieser Familie die größte physiologische Bedeutung zukommt.⁵

Bereits im Vorfeld konnte jedoch gezeigt werden, dass bei unterschiedlich hoher Gesamtselenkonzentration die pGPx-Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe (normale bis hohe Gesamtselenkonzentrationen) und Vergleichsgruppe (niedrige Selenkonzentrationen) gleich waren.^{56,83} Auch in der hier beschriebenen Studie konnte dies wieder beobachtet werden, denn es zeigte sich kein Unterschied in der pGPx-

Aktivität im Bezug auf die Ernährung. Dies stand im deutlichen Gegensatz zu den Gesamtselen- und SePP-Konzentrationen, die in beiden Fällen signifikant niedrigere Ergebnisse in den Gruppen mit veganer und vegetarischer Ernährung aufzeigten. Es kann daher die Frage formuliert werden, ob die gleich hohe pGPx-Aktivität in den drei untersuchten Ernährungsgruppen ein Kriterium für eine suffiziente Selenversorgung sein kann. Im Gegensatz zu dieser Position argumentieren Burk und Hill glaubhaft, dass trotz gleich hoher pGPx-Spiegel das zirkulierende SePP den besseren Marker für die Beurteilung der aktuellen Selenversorgung darstellt, da SePP nicht zu den Selenoproteinen mit erster Priorität gehört und über sehr weite Selenbereiche gut zur Aufnahme und zum Selenstatus korreliert.⁸³ Das bedeutet, dass im Rahmen einer Selenunterversorgung beide zirkulierenden Marker – also pGPx und SePP – gut geeignet sind, um den Mangel abzubilden. Jedoch in einer grenzwertig schlechten Versorgung erscheint pGPx bereits in ein stabiles Niveau geführt, während die SePP-Biosynthese, Sekretion und Serumkonzentration immer noch auf die verfügbaren Selenkonzentrationen reagiert und somit den sensitiveren Marker darstellt. Somit wäre die Bestimmung der pGPx-Aktivität in ihrer Aussagekraft zur aktuellen Selenversorgung in Europa relativ ungeeignet, da sich erst ein starker Selenmangel in einer Aktivitätsminderung niederschlagen würde. Trotz allem bleibt die Frage offen, ob eine ausreichend hohe pGPx-Aktivität nicht zumindest Aufschluss über einen gedeckten Grundspiegel an Selen bieten könnte, sodass erniedrigte pGPx-Spiegel im Blut immer als deutliches Warnzeichen angesehen werden sollten. Gerade in Situationen des Selenmangels – der zuvor durch niedrige SePP-Spiegel bestätigt wurde – könnte die pGPx-Aktivität zu einem zweiten und sensitiven Parameter bezüglich des Ausmaßes der Unterversorgung werden. In Anbetracht der außergewöhnlichen Bedeutung von freien Radikalen im Pathomechanismus vieler Erkrankungen, könnte dies zum Beispiel auf der Intensivstation von großer Bedeutung sein. Überdies ist die pGPx Biosynthese und Sekretion ins Blut überwiegend der Niere zuzuschreiben, sodass die pGPx Bestimmung neben dem Selenstatus auch eine Aussage über die Nierenfunktion erlaubt und entsprechend differenziert beurteilt werden muss. Dies bedeutet aber auch, dass die Beurteilung erniedrigter pGPx-Werte die Beurteilung der Nieren mit einschließt, da eine eingeschränkte Nierenfunktion sowie einige systemische Erkrankungen die Funktionsfähigkeit der Nieren weit über die Filtrationsfähigkeit hinaus beeinträchtigen.⁹⁵ Analysiert man die SePP-Konzentrationen, so war mit der omnivoren Gruppe eine repräsentative Vergleichsgruppe gegeben, die die bestehenden Referenzwerte erneut

mit Daten ergänzte, wenngleich auch ein Teil dieser Gruppe unterhalb des durch Hollenbach et al. in der Gruppe der Sportler bestimmten Referenzwertes lag.⁴⁶ Es bleibt daher zu wünschen, dass sich weitere Studien die differenziertere Ausarbeitung des Referenzwertes für SePP zum Ziel setzen, wobei eindringlich darauf hingewiesen sei, dass neben der Geographie auch eine Unterteilung in verschiedene Alterstufen und Geschlechter bei den Erhebungen unbedingt berücksichtigt werden sollte.

Ein international einheitlicher Referenzwert scheint vorerst nicht angebracht, da die tägliche Selenaufnahme in den verschiedenen Ländern zu unterschiedlich ist.¹ Lediglich eine internationale Mindestkonzentration könnte auch für SePP festgelegt werden und sich in der Medizin als durchaus sinnvoll erweisen, allerdings nur, wenn sich die verschiedenen Techniken zur Quantifizierung von SePP als gleichermaßen zuverlässig und präzise erweisen. Die vollständigste Charakterisierung einer SePP-Bestimmungsmethode erfolgte von Hollenbach et al. und wurde entsprechend in dieser Arbeit genutzt und fortgeführt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Vegetarismus-Studie bezüglich der Gesamtselen- und der SePP-Konzentrationen, so fällt ein wesentlicher Unterschied auf. Auch wenn mit beiden Messmethoden die hochsignifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sicher nachzuweisen sind, so befinden sich nur bei der Gesamtselenmessung nahezu alle Teilnehmenden innerhalb des Referenzbereiches. Damit würde die Differenz zwischen den Gruppen aus klinischer Sicht entkräftet und hätte keine medizinische Relevanz in Bezug auf eine potentielle Empfehlung zur Selensupplementation.

Im Vergleich dazu liegen bei der SePP Messung die Vergleichsgruppen alle unter dem Referenzbereich der Sportler und auch die Kontrollgruppen zu großen Teilen, sodass eine Selensupplementation durchaus zu überdenken wäre. Es stellt sich aber vor allem die Frage, ob hiermit nicht ein weiteres Mal gezeigt werden konnte, dass mit SePP ein differenzierterer Marker für die Selenversorgung gefunden wurde, der die geringe tägliche Selenaufnahme und damit die geringe Grundversorgung in Deutschland zuverlässig widerspiegelt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigt die SePP-Konzentration – im Gegensatz zum Gesamtselen Spiegel – proportional wirklich nur das Selen, das dem Körper zur Biosynthese von Selenoproteinen zur Verfügung steht. Daraus würde sich ergeben, dass die Ergebnisse der Gesamtselenmessung einen bestehenden Mangel verschleiern und die Untersuchenden in falscher Sicherheit wiegen würden.

Glaut man den SePP-Werten als verlässlichem Marker nicht, so wäre die logische Schlussfolgerung, dass hier in keiner Gruppe ein ernstzunehmender Mangel vorliegt und somit auch kein Handlungsbedarf besteht.

Damit zeigt sich, wie sehr die Interpretation des Selenstatus nach heutigem Wissensstand von der verwendeten Messmethode abhängt. Inwieweit also aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine grundsätzliche Empfehlung zur Nahrungsergänzung mit Selen für die in Deutschland lebenden Menschen mit vegetarischer und veganer Ernährung ausgesprochen werden sollte, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Es wäre aber wünschenswert, dass die definitiv geringere Selenkonzentration – ob nun unterhalb oder gerade noch innerhalb des Referenzbereiches – vor allem bei Menschen mit vegetarischer und veganer Ernährung mehr ins Bewusstsein von medizinischem Personal rücken würde, sodass gerade in gesundheitlichen Ausnahmezuständen auch auf diesen scheinbar kleinen Parameter ein Augenmerk gelegt werden könnte. Denn wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben gerade die Ergebnisse von Studien mit Sepsispatienten gelehrt, dass ein guter Selenstatus überlebenswichtig sein kann.

Leider ist bisher viel zu wenig über möglicherweise verbesserte Recyclingprozesse von Selen bekannt, die auftreten könnten wenn sich der Körper auf eine geringe tägliche Selenzufuhr eingestellt hat und die vielleicht all die oben beschriebenen Sorgen relativieren würden. Und noch weniger sind die vielen möglichen Einflussfaktoren verstanden, die den individuellen Selenmetabolismus kontrollieren. Ob sich bei geringerer Selenkonzentration im Serum eine erhöhte Wiederverwertbarkeit von Selen einstellt, muss daher zum jetzigen Zeitpunkt reine Spekulation bleiben.

Auch wenn zusätzliche Daten den Nutzen der SePP-Messungen weiter bestätigen müssen, spricht schon heute vieles dafür, eine Etablierung der SePP-Bestimmung als Routinemethode zu unterstützen, zumal die Messung sehr robust und der Transport der Blutproben verhältnismäßig unkompliziert ist. Mehrere Stunden Lagerung bei Raumtemperatur sowie bis zu sechs Auftau- und Einfrierzyklen führen zu keiner signifikanten Änderung der SePP-Werte im Serum.⁴⁶ Gerade für den klinischen Alltag sind diese Voraussetzungen von großer Bedeutung, da im Krankenhaus nicht immer ein sofortiger und gekühlter Transport für eine Selenbestimmung ins Labor gewährleistet werden kann, bzw. das Nachmelden einer Messung aus bereits wieder eingefrorenen Proben nicht ungewöhnlich ist. Vor allem bei schwer kranken Patienten

ist es erfreulich, wenn aufgrund von verlässlichen Messverfahren weitere Blutentnahmen vermieden werden können, was Zeit, Schmerzen und Geld erspart.

Liest man noch einmal die aktuellen Studien zur Frage nach einer möglichen Selenunterversorgung bei Menschen, die auf tierische Produkte fast oder vollständig verzichten, so fallen erneut die sehr unterschiedlichen Schlussfolgerungen in den verschiedenen Studien auf. Da die Gruppen der Teilnehmenden aus unterschiedlichen Ländern stammen, zeigt dies noch einmal deutlich, wie sehr die Selenversorgung von der Selenkonzentration des Bodens abhängt und wie uneinheitlich in den verschiedenen Ländern ein Selenmangel beurteilt wird.

Es bleibt weiteren Studien überlassen zu untersuchen, inwieweit Menschen mit vegetarischer Ernährung vermehrt regional angebautes Obst und Gemüse verzehren, was eine geographisch bedingte Mangelversorgung noch verschärfen könnte.

Betrachtet man die anderen Spurenelemente, die in der hier vorliegenden Studie gemessen wurden, sind einige interessante Beobachtungen festzustellen. Beginnend mit Kupfer, hat dessen Bestimmung heutzutage vor allem dann klinische Relevanz, wenn erniedrigte Werte festgestellt werden. Ursachen dieser pathologisch erniedrigten Werte können Anämien oder seltene genetische Stoffwechselerkrankungen wie Morbus Wilson sein.⁹⁶ Hypercuprämien können zwar im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen auftreten, weisen aber keinen diagnostischen Wert auf, da sie zu unspezifisch sind. Auch akute und chronische Infektionen können mit erhöhten Kupferspiegeln einher gehen, und während der Schwangerschaft ist die Serumkupferkonzentration unter Östrogenwirkung physiologisch erhöht.⁹²

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellten deutlichen Geschlechterunterschiede bei der Bestimmung der Gesamtkupferkonzentration lassen sich daher gut mit einem erhöhten Östrogenspiegel durch z. B. orale Kontrazeptiva vereinbaren, zumal die Höhe der Kupferspiegel signifikant mit den Frauen korrelierte, die hormonelle Verhütungsmittel verwendeten (siehe Abb. 30). Ähnliche Ergebnisse konnten auch Milne und Johnson 1993 verzeichnen.⁹⁷

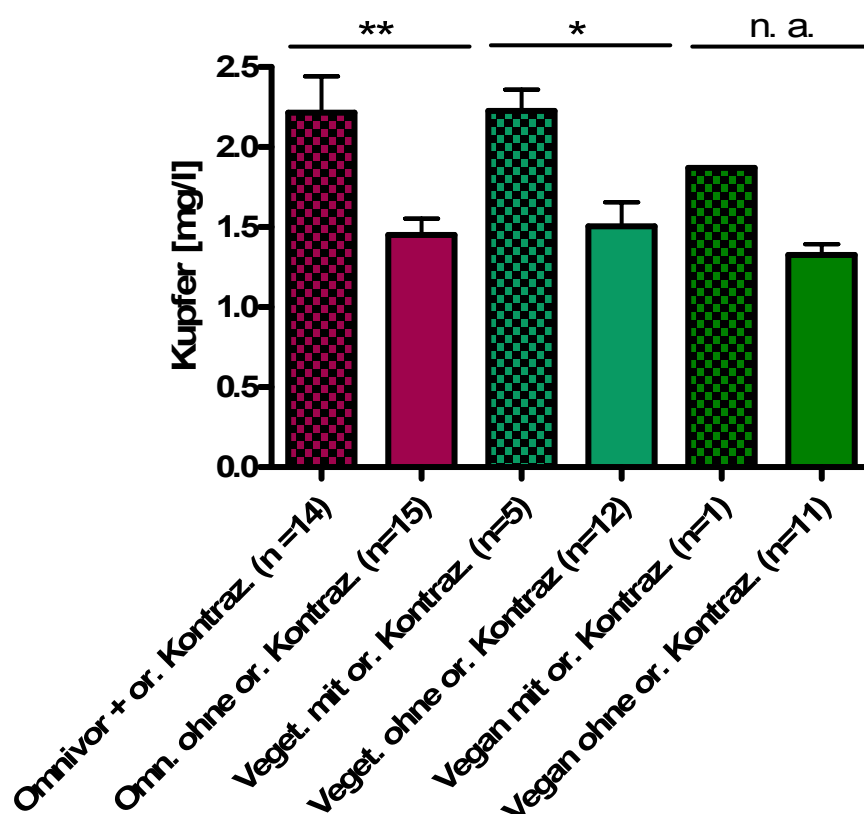


Abb. 31

Gesamtkupferkonzentration in Korrelation mit oralen Kontrazeptiva. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Gesamtkupferkonzentrationen in mg pro Liter Serum. Soweit analysierbar bestehen signifikante Unterschiede zwischen Frauen mit und ohne orale Kontrazeptiva.

n. a. = nicht analysierbar, da in der Gruppe der Veganerinnen nur eine Probandin hormonelle Verhütungsmittel verwendet.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der bei der Kupferauswertung auffiel, war der eindeutige Unterschied zwischen den weiblichen Gruppen, was die Anzahl der Frauen betraf, die orale Kontrazeptiva verwendeten. Damit zeigt sich erneut, wie sehr die Einnahme eines einzelnen Medikamentes von dem generellen Lebensstil abhängen kann, und wie sehr eine solche Substanz auf den Stoffwechsel der Spurenelemente einwirken kann, und wirft damit spannende Aspekte für weitere Public Health Studien auf.

Sehr viel weniger nachvollziehbar waren hingegen die erhöhten Calciumspiegel bei den Vegetarierinnen und Vegetariern. Auch wenn noch keine endgültige quantitative Beurteilung der Calciumwerte möglich ist, da die Validierung der angewandten

Messmethode für absolute Calciumwerte noch aussteht, sind die relativen Ergebnisse doch sehr eindeutig und deutlich.

Im Vergleich zu den hier bestimmten Calciumwerten zeigten die Auswertungen der EPIC-Oxford Studie, dass das Frakturrisiko zwischen Menschen mit omnivorer und vegetarischer Ernährung zwar unverändert war, hingegen hatten streng vegan lebende Menschen ein erhöhtes Risiko, welches durch einen niedrigeren Calciumspiegel erklärt wurde.⁹⁸ Erniedrigte Calciumspiegel konnten bei den vegan lebenden Menschen, die im Rahmen dieser Arbeit vermessen wurden – im Vergleich zu den Kontrollgruppen – nicht festgestellt werden. Eine Knochendichtemessung (Bone Mineral Density, BMD) in Taiwan ergab darüber hinaus auch keinen signifikanten Unterschied zwischen vegetarisch und omnivor lebenden Menschen.⁹⁹ Grundsätzlich scheint daher der gefürchtete, weit verbreitete angebliche Calciummangel in der vegetarischen und veganen Ernährung durchaus einer wissenschaftlichen Überprüfung bedürftig zu sein. Denn das Märchen vom eisenhaltigen Spinat hat uns nur zu gut gezeigt, wie schwer es ist, einen einmal festgesetzten Irrglauben wieder aus den Köpfen von Kindergärtnern, Eltern, Lehrerinnen und medizinischem Personal zu verbannen.

Die gemessenen Zinkwerte hingegen entsprachen den erwarteten Konzentrationen und wiesen keine Unterschiede auf, weder im Bezug auf Geschlecht, noch auf die Ernährungsweise.

Ungeklärt bleibt der erniedrigte Gesamteisenspiegel bei der weiblichen Kontrollgruppe. Ein Vergleich mit klinischen Werten ist – wie bereits oben erwähnt – aufgrund der Gesamtbestimmung nicht möglich, da diese keinen Bestandteil von klinischen Laborparametern darstellt. Zur Eisendiagnostik werden Erythrozyten, deren Volumen und Hämoglobinanteil, sowie Hämoglobin gesamt und Ferritin herangezogen.

Mit der Vermessung der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α konnte kein Hinweis darauf gegeben werden, dass in den Vergleichsgruppen aufgrund von geringerer Aufnahme an tierischen Proteinen ein erniedrigtes Entzündungspotenzial vorliegen könnte, oder das umgekehrt der Fleischverzehr eine stete Inflammationsreaktion induzierte. Ein vermindertes Potenzial freier Radikale könnte eine Auswirkung auf die notwendige Menge an Selenoproteinen haben. Inwieweit hier ein Zusammenhang mit tierischen Eiweißen und Fetten vorliegt, kann vielleicht nur in extremeren Situationen nachgezeichnet werden, was aber gerade bei der ständig wachsenden Zahl an übergewichtigen Menschen in Deutschland²⁶ nicht unwichtig wäre.

4.2 Selen

Auch wenn Selen immer mehr positive Anerkennung gewinnt und immer mehr Studien, die zu einem tieferen Verständnis des Selen-Metabolismus beitragen, veröffentlicht werden, so ist doch verwunderlich, warum die Überprüfung der Selenversorgung noch nicht so etabliert ist wie zum Beispiel die von Eisen, Zink oder Jod. Ist die Selenversorgung weniger problematisch oder doch nicht so wichtig wie die der anderen Spurenelemente? Oder sind es die noch zu wenig verbreiteten neuen Nachweismethoden, die eine sichere Selenbestimmung schnell und zuverlässig ermöglichen, die der Routinebestimmung im Wege stehen? Oder fehlt schlichtweg das Bewusstsein für die Bedeutung von Selen für die Humangesundheit?

Viel eher scheinen die schwer fassbaren Mangelerscheinungen in Folge einer Selenunterversorgung dazu bei zu tragen, dass dieses Spurenelement immer wieder für neue Fragen sorgt, sodass eine einfache Antwort in den meisten Fällen nicht möglich scheint. Trotz dieser Komplexität konnten mittlerweile gewisse Grundsätze immer weiter bestätigt werden. So lassen sich die positiven Auswirkungen von Selen besonders dann nachweisen, wenn von einer relativ geringen Grundkonzentration ausgegangen wird.^{100,101} Dies könnte erstaunlicherweise bedeuten, dass eine Supplementation in selenarmen Gebieten wie Deutschland die Inzidenz und Letalität bestimmter Erkrankungen senken würde, ohne dass in selenreichen Regionen wie den USA eine positive Auswirkung zu verzeichnen wäre.²⁰

In diesem Zusammenhang muss auch die Bedeutung eines Referenzwerts für Selen neu diskutiert werden. Es ist fraglich, ob es einen internationalen Referenzwert für Selen geben sollte, wenn dies bedeuten würde, dass große Teile der Welt auf lebenslange Supplementation angewiesen wären. Es bleibt die Frage, ob sich Menschen, die aufgrund ihrer geographischen Lage dauerhaft einem niedrigen Selenspiegel ausgesetzt sind, so an niedrigere Selenspiegel anpassen können, dass auf lange Sicht kein gesundheitlicher Nachteil zu verzeichnen ist. Ist dies nicht der Fall, sollte darüber nachgedacht werden, dem finnischen Beispiel³¹ zu folgen und zum Beispiel über die Anreicherung von Düngemitteln die tägliche Selenaufnahme zu erhöhen. Bei Beginn einer breit angelegten, künstlichen Selenanreicherung des Bodens mit Hilfe von Düngemitteln sollten jedoch umfassende Ergebnisse über den Einfluss eines solchen Selenanstiegs im Boden auf Mensch und Tier vorliegen.¹⁰² Einmal zugeführtes Selen kann nicht ohne weiteres wieder aus der Nahrungskette entfernt werden. Es wird von Pflanzen aufgenommen, die wiederum Mensch und Tier als

Nahrungsgrundlage dienen und birgt nach wie vor in zu hohen Dosierungen toxische Eigenschaften. Eine unüberlegte Selenanreicherung könnte zur Folge haben, dass Pflanzen bisher unbekannte Selenspeicherfunktionen haben, die erst in Folge eines unnatürlich hohen Selengehaltes im Boden zur Geltung kommen. Andererseits könnten diese Pflanzen aber auch als natürlicher Selenindikator dienen, da auch manche Pflanzen bei zu hohen toxischen Selenkonzentrationen im Boden Vergiftungserscheinungen zeigen, nicht mehr wachsen und somit einer übermäßigen Anreicherung natürlicherweise entgegenwirken.³⁰

Auf jeden Fall sollten potenziell gefährliche Situationen einer Selenunterversorgung klarer ins Bewusstsein eingehen, um vermeidbare Mangelsituationen wie lange Zeiten der künstlichen Ernährung oder intensivmedizinische Betreuung, die offenbar einen erhöhten Selenbedarf mit sich bringen, entgegenwirken zu können. Es ist zu hoffen, dass sich die viel versprechenden Ergebnisse, die für die positiven Auswirkungen von Selensubstituierung in der Intensivmedizin beschrieben wurden^{23,34}, weiter bestätigen und spezifizieren lassen, sodass ein differenzierter Einsatz von Selen als adjuvantes Therapeutikum ermöglicht wird. Ebenso wichtig aber bleibt die längst überfällige Ausweitung der Untersuchungen auf Einflussfaktoren wie Geschlecht und Alter.¹⁰³

Eine große Studien wie die SELECT-Studie, die im Oktober 2008 abgebrochen wurde, da die erwarteten Ergebnisse nicht eintraten¹⁹, müsste vielleicht nicht zum Scheitern verurteilt sein, wenn diese scheinbar nebensächlichen Einflussfaktoren von Alter, Geschlecht und Selengrundversorgung berücksichtigt worden wären.

Unverständlicherweise scheint nach wie vor sowohl die Wissenschaft und als auch die klinische Medizin leider vor allem theoretisch davon überzeugt zu sein, dass unterschiedliche Bedürfnisse von Frauen und Männern bestehen. In der Praxis liegt immer noch ein zu großes Ungleichgewicht vor, wenn es um Zielgruppen, die Entwicklung von Studiendesigns oder Teilnehmende geht. Für viele Spurenelemente ist mittlerweile deutlich gezeigt worden, dass unverrückbare Unterschiede im Bedarf von Spurenelementen zwischen den Geschlechtern bestehen⁵ und es ist an der Zeit, dies auch für Selen anzuerkennen und gründlicher zu untersuchen.

4.3 Selen in der Muttermilch

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eindeutig zeigen, dass SePP Bestandteil der Muttermilch ist. Damit wurde ein weiterer Beitrag geleistet, der zeigt, dass Selenproteine nicht nur in der Milch von Nagern zu finden sind.⁹³ Dies weist erneut

darauf hin, wie groß die Bedeutung dieser kleinen Proteinfamilie ist, denn als Bestandteil von Muttermilch macht es uns die Wichtigkeit für das Neugeborene deutlich.

Zwar in deutlich geringerer (ca. 100-fach), aber doch in einer reproduzierbaren Größenordnung von um die 30 – 50 µg/l lässt sich SePP in der Muttermilch nachweisen. Damit macht es ca. 5% der gesamten Selenvorkommen in der Milch aus. Interessanterweise zeigt sich dort aber eine komplett andere Stabilität dieses Proteins, als wir sie aus dem Serum kennen. Bereits kurze Inkubationszeiten von einigen Stunden oder ein zweimaliges Einfrieren und Auftauen sorgen dafür, dass die messbare SePP-Konzentration in den meisten Muttermilchproben unter die Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode gedrückt wird.

Die besondere Sensitivität von SePP in der Muttermilch gegenüber der präanalytischen Vorgeschichte der Proben zeigte sich auch beim Versuch, ein größeres Milchkollektiv aus der Charité Universitätsklinikum Berlin (Klinik für Neonatologie, Oberärztin Dr. A. Loui) zu vermessen. Die Messwerte schwankten drastisch und lagen zum Teil unter der Nachweisgrenze. Nach erneuter Rücksprache ergaben sich gewisse Unterschiede bezüglich der Probenentnahme, -Lagerung und Häufigkeit von Einfrier-Auftau-Zyklen, sodass diese Messungen nicht wissenschaftlich ausgewertet werden konnten.

Noch kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche Mechanismen für den Zerfall von SePP verantwortlich sind, wobei es deutliche Anzeichen gibt, die zumindest auf einen anteilmäßigen, enzymatisch-proteolytischen Prozess hinweisen. Nachfolgende Studien sollten sich mit dieser interessanten Fragestellung weiter auseinandersetzen, um den Abbau von SePP in der Frauenmilch besser verstehen zu können. Dies ist vor allem im Hinblick auf zwei Aspekte wichtig: zum einen kann eine lückenlose und unmittelbar beginnende Kühlkette von Frauenmilch nur schlecht gewährleistet werden, zum anderen sind es vor allem schwer kranke und zu früh geborene Kinder, die in der Regel auf die Versorgung mit bereits abgepumpter Milch angewiesen sind. In dieser gesundheitlich oft sehr bedrohlichen Situation ist es daher von immenser Bedeutung, alle möglichen Faktoren zu optimieren, die einer weiteren Verschlechterung – und damit auch einer sinkenden Muttermilchqualität – entgegenwirken. Allerdings können wir die physiologischen Konsequenzen einer partiellen SePP-Proteolyse noch nicht abschätzen. Eventuell verhindert eine Fragmentierung die optimale Verwertung durch das Neugeborene, denkbar ist allerdings auch, dass dadurch die physiologische Verwertung vereinfacht und erleichtert wird. Die Erwachsenenmedizin hat mittlerweile

sehr vielversprechend gezeigt, dass gerade in gesundheitlich sehr belastenden Phasen eine gute Selenversorgung von besonderer Bedeutung ist (siehe Einleitung „Selen und Gesundheit“), sodass auch für die kleinsten Patientinnen ein sehr guter Selenspiegel anzustreben wäre. Sollte sich dabei zeigen, dass eine Selenaufnahme über den Darm aus intaktem SePP leichter möglich ist als aus unvollständigem, könnte dies Verschärfungen in den Richtlinien zur Muttermilchlagerung nach sich ziehen, auch wenn diese in der Praxis schwerer umzusetzen wären. Bisher sind für die Lagerung von Muttermilch 6 - 8 Stunden bei Raumtemperatur und 72 Stunden bei 4 - 6°C zulässig, wobei eine durchgehende Kühlung schon jetzt empfohlen wird. Ist aber absehbar, dass die Muttermilch nicht innerhalb von drei Tagen verbraucht werden kann, so sollte sie umgehend portioniert und bei -18 bis -40°C tiefgefroren werden, damit eine Lagerung für 3 – 6 Monate möglich wird.⁶⁶ Mehrfaches Auftauen und Einfrieren sollte in jedem Fall vermieden werden.

Die Mischungsversuche von Plasma bzw. Serum mit Muttermilch werfen uns weitere Rätsel auf. Die Unbeständigkeit von SePP, die auch durch die Zugabe von erhitzter Milch hervorgerufen wird, lässt einen überwiegend enzymatischen Abbau unwahrscheinlich erscheinen, es sei denn die Protease ist besonders hitzestabil oder renaturiert wieder zur ursprünglichen Form und Aktivität.

Der Nachweis von SePP in der Muttermilch lässt nun die Frage aufkommen, woher das SePP stammt. Denn die in der Muttermilch enthaltenden Proteine sind unterschiedlichen Ursprungs und werden in der Regel mittels Exozytose in die Milchgänge (Ductus lactiferi) abgegeben. Dabei werden von den Brustdrüsenzellen selbst synthetisierte Proteine mit zytosolischen Proteinen (teils zelleigene, teils Serumproteine) gemeinsam sezerniert.¹⁰⁴

Die Frage ist nun, zu welcher Gruppe SePP gehört und wessen Ursprung es in der Muttermilch ist. Ob es sich um ein in den Brustdrüsen gebildetes Protein (wie z.B. das Kasein) oder um ein ursprünglich im Serum synthetisiertes und dann in die Milch hineingefiltertes bzw. durch Transzytose hinein gelangtes Eiweiß (wie z.B. Albumin) handelt.

Die Expression der von den Milchdrüsen gebildeten Proteine unterliegt zum Großteil der hormonalen Steuerung durch Prolaktin, Insulin und Hydrocortison.^{105,106} Dabei konnten sich deutliche Unterschiede in den Proteinkonzentrationen im zeitlichen Verlauf

nachweisen lassen. Im Gegensatz dazu zeigen sich die hormonunabhängigen Serumproteine in ihrer Konzentration in der Muttermilch sehr stabil.¹⁰⁴

Betrachtet man die Menge von SePP in den hier vermessenen Muttermilchproben, so soll ein erster Eindruck über den Verlauf post partum erlaubt sein (siehe Abb. 31).

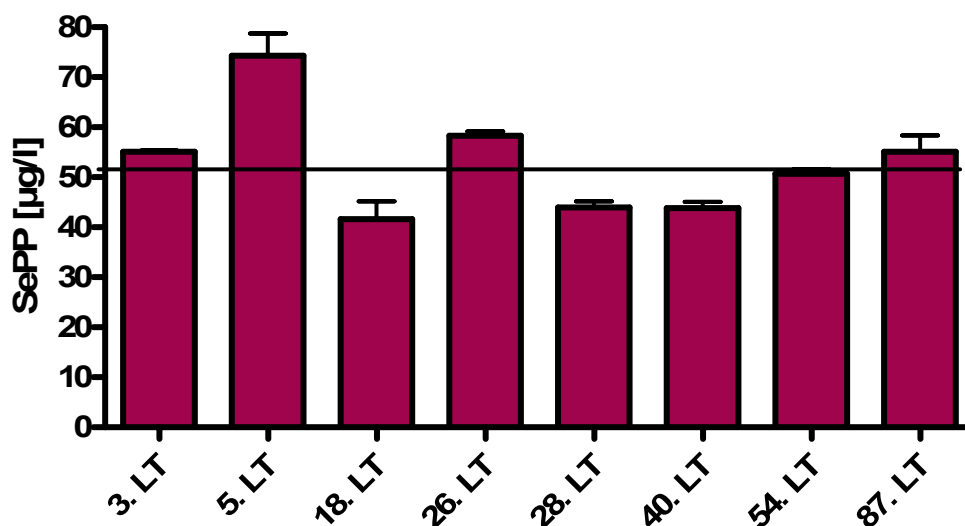


Abb. 31

Annäherung zur SePP Konzentrationen im zeitlichen Verlauf. Aufgeführt sind SePP-Konzentrationen in μg pro Liter unverdünnter Muttermilch als Mittelwert und Standardabweichung. Angegeben ist der Lebensstag (LT) des Kindes, der ungefähr 2-3 Tage höher als der Laktationstag liegt – bedingt durch die physiologische Verzögerung des Milcheinschuss nach der Geburt. Alle Proben stammen von unterschiedlichen Frauen und sind damit nur eingeschränkt vergleichbar. Die eingezeichnete Linie gibt den Mittelwert aller Messwerte an. Pro Balken liegt eine Muttermilchprobe zugrunde, die 3mal vermessen wurde.

Dabei muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass kein wirklicher Vergleich möglich ist, da die Proben von unterschiedlichen Frauen stammen und somit interindividuellen Schwankungen unterliegen. Nichtsdestotrotz kann hier ein Eindruck gewonnen werden, der für eine relativ konstante SePP-Menge und gegen große interindividuelle und zeitpunktabhängige Konzentrationsschwankungen spricht. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem in der Muttermilch vorhandenen SePP um ein ursprünglich aus dem Serum stammendes SePP handeln könnte. Vor allem da bei hormonabhängigen Proteinen in der Regel stärkere Schwankungen beobachtbar sind, als es sich bei SePP diesen Messungen zufolge abzeichnet.

Ohne Frage bedarf es weiterer Untersuchungen, um dies mit Sicherheit sagen zu können. Es wäre daher wünschenswert, wenn nachfolgende Studien sich mit dem Verlauf der SePP-Konzentration über die Zeit befassen würden, um Muttermilchproben während einer Stillperiode dergleichen Mutter miteinander vergleichen zu können.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit konnten reproduzierbare Aktivitäten der pGPx in Muttermilch zeigen. Dabei wurden Konzentrationen in ähnlicher Größenordnung wie im Serum gefunden (50 – 250 nmol/min*ml), ohne dass eine Aussage über die sichere Zugehörigkeit zu einem bestimmten GPx-Isoenzym getroffen werden konnte. Aufgrund der ähnlich hohen Konzentration wie im Serum lässt sich aber vermuten, dass es sich um die pGPx aus dem Blut handelt. Inwieweit dieses Enzym hierbei eine physiologische (Schutz-)Funktion ausübt oder ebenfalls zur Selenversorgung des Neugeborenen beiträgt, bleibt in dieser Arbeit jedoch noch offen und weitergehenden Studien vorbehalten.

5. Zusammenfassung

Dieser Arbeit lag als Arbeitshypothese die oft geäußerte und schriftlich formulierte Vermutung zugrunde, dass ein guter Selenstatus in Europa von einer omnivoren Ernährungsweise abhängig ist und entsprechend vegetarisch und vegan lebende Menschen ein Selendefizit aufweisen. Auch bei Säuglingen, die in den ersten sechs Monaten ausschließlich durch Muttermilch oder Muttermilchersatznahrung ernährt werden, stellt sich die Frage nach einer suffizienten Selenversorgung.

Der Vergleich von omnivor lebenden Menschen mit den Gruppen mit veganer und vegetarischer Ernährung zeigte einen signifikanten Unterschied in den Serumkonzentrationen von Selen. Diese Differenz bestätigte sich bei der Bestimmung der SePP-Konzentrationen. Bei beiden Messmethoden konnten annähernd die gleichen Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen gezeigt werden. Die Gefahr, dass bei einer Messung der Gesamtselenkonzentration eine Unterversorgung verschleiert werden kann, ist in der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert worden. Diese Daten bestätigen, dass sich mit der Bestimmung von SePP ein verlässlicherer Marker für die Bestimmung des Selenstatus gefunden hat, der eine differenziertere Beurteilung der Versorgungslage erlaubt als die Gesamtselenbestimmung. Interessanterweise unterschieden sich die Aktivitäten der Glutathionperoxidase im Serum nicht, so dass je nach gewähltem Biomarker die Gruppe der Vegetarier als selenarm oder als suffizient versorgt eingeordnet werden kann.

Ebenso wichtig wie für Erwachsene scheint auch die Versorgung von Neugeborenen mit Selen zu sein, wie uns durch das Auffinden von SePP in der humanen Muttermilch bestätigt wird. Noch ist vieles bezüglich der Stabilität von SePP in der Frauenmilch ungeklärt, und weitergehende Studien werden klären müssen, ob die hohe Instabilität dieses Proteins in Milch von physiologischer Bedeutung für die Verwertung durch das Neugeborene ist.

Anhand der Fraktionierung der Muttermilch in Vollmilch (VM), zellfreie Milch (zM) und entrahmte Milch (eM) konnten geeignete Bedingungen für eine reproduzierbare Bestimmung der SEPP-Konzentrationen und GPx-Aktivitäten definiert und optimiert werden. Folgestudien werden nun auf diesem Aufarbeitungsschema aufbauen können, um die Regulation und (patho-)physiologische Bedeutung dieser selenhaltigen Parameter für die Neugeborenenversorgung zu erarbeiten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit erneut, welch wichtiges und unerschlossenes Forschungsfeld sich um das Spurenelement Selen aufgetan hat. Eine

Beantwortung der noch offenen Fragen wird in der Zukunft weitere Klarheit in bisher unverständene Bereiche bringen, und damit die sich bereits abzeichnenden positiven Aspekte dieses Spurenelementes für den klinischen Alltag künftig noch effizienter nutzbarer machen.

6. Literaturverzeichnis

1. Reilly C. Selenium in Food and Health. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
2. Kohrle J, Jakob F, Contempre B, Dumont JE. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* 2005;**26**(7):944-84.
3. Peng A, Yang CL. Examination of the roles of selenium in the Kaschin-Beck disease. Cartilage cell test and model studies. *Biol Trace Elem Res* 1991;**28**(1):1-9.
4. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu Rev Nutr* 2008;**28**:157-77.
5. Schomburg L, Schweizer U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. *Biochim Biophys Acta* 2009.
6. Barceloux DG. Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;**37**(2):145-72.
7. 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.
8. Kise Y, Yoshimura S, Akieda K, et al. Acute oral selenium intoxication with ten times the lethal dose resulting in deep gastric ulcer. *J Emerg Med* 2004;**26**(2):183-7.
9. Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK, Puska P. Association between serum selenium and the risk of cancer. *Am J Epidemiol* 1984;**120**(3):342-9.
10. Clark LC. The epidemiology of selenium and cancer. *Fed Proc* 1985;**44**(9):2584-9.
11. Fleet JC. Dietary selenium repletion may reduce cancer incidence in people at high risk who live in areas with low soil selenium. *Nutr Rev* 1997;**55**(7):277-9.
12. Hartman TJ, Taylor PR, Alfthan G, et al. Toenail selenium concentration and lung cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control* 2002;**13**(10):923-8.
13. Knekt P, Aromaa A, Maatela J, et al. Serum selenium and subsequent risk of cancer among Finnish men and women. *J Natl Cancer Inst* 1990;**82**(10):864-8.
14. Jacobs ET, Jiang R, Alberts DS, et al. Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**(22):1669-75.
15. Russo MW, Murray SC, Wurzelmann JI, Woosley JT, Sandler RS. Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutr Cancer* 1997;**28**(2):125-9.
16. Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamins A, E, and C: nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc* 1986;**86**(4):505-10.

17. Diwadkar-Navsariwala V, Diamond AM. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. *J Nutr* 2004;**134**(11):2899-902.
18. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 2009;**301**(1):39-51.
19. <http://www.cancer.gov/newscenter/pressreleases/SELECTQandA>. National Cancer Institute - U.S. National Institutes of Health, 22.02.2009.
20. Hatfield DL, Gladyshev VN. The Outcome of Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) reveals the need for better understanding of selenium biology. *Mol Interv* 2009;**9**(1):18-21.
21. Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, et al. Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *Eur Heart J* 2007;**28**(5):628-33.
22. Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK, Pikkarainen J, Puska P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet* 1982;**2**(8291):175-9.
23. Angstwurm MW, 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.
24. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000;**356**(9225):233-41.
25. Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander OA. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat Med* 1995;**1**(5):433-6.
26. Nationale Verzehrs Studie II. In: Bundesministerium für Ernährung LuV, ed: Max Rubner-Institut Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, 2008.
27. Combs GF, Jr., Gobs SB. *The Role of Selenium in Nutrition*. New York: NY Academic Press, 1986.
28. Oldfield JE. *Selenium world atlas*. Grimbergen, Belgium: Selenium-Tellurium Development Association, 1999.
29. Combs GF, Jr. Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 2001;**85**(5):517-47.
30. Zhu YG, Pilon-Smits EA, Zhao FJ, Williams PN, Meharg AA. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci* 2009;**14**(8):436-42.

31. Aro A, Alfthan G, Varo P. Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland. *Analyst* 1995;**120**(3):841-3.
32. DGE DGfE. <http://www.dge.de/pdf/ws/ReferenceValues.pdf>, 10.06.2008.
33. Clark LC, Combs GF, Jr., Turnbull BW, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama* 1996;**276**(24):1957-63.
34. Zimmermann T, Albrecht S, Hanke S, von Gangern G. Selen in der Intensivmedizin. *Chir Gastroenterol* 2000;**16**:54-57.
35. Reid ME, Stratton MS, Lillico AJ, et al. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J Trace Elem Med Biol* 2004;**18**(1):69-74.
36. Yang G, Zhou R, Yin S, et al. Studies of safe maximal daily dietary selenium intake in a seleniferous area in China. I. Selenium intake and tissue selenium levels of the inhabitants. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1989;**3**(2):77-87.
37. Yang G, Yin S, Zhou R, et al. Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1989;**3**(3):123-30.
38. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003;**300**(5624):1439-43.
39. Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;**42**(39):4742-58.
40. Berry MJ, Banu L, Chen YY, et al. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 1991;**353**(6341):273-6.
41. Bock A, Forchhammer K, Heider J, Baron C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* 1991;**16**(12):463-7.
42. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 2002;**22**(11):3565-76.
43. Combs GF, Jr., Combs SB. The nutritional biochemistry of selenium. *Annu Rev Nutr* 1984;**4**:257-80.
44. Schomburg L, Schweizer U, Kohrle J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci* 2004;**61**(16):1988-95.

45. Hill KE, Xia Y, Akesson B, Boeglin ME, Burk RF. Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *J Nutr* 1996;**126**(1):138-45.
46. Hollenbach B, Morgenthaler NG, Struck J, et al. New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *J Trace Elem Med Biol* 2008;**22**(1):24-32.
47. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: Vegetarian diets. *J Am Diet Assoc* 2003;**103**(6):748-65.
48. Key TJ, Appleby PN, Rosell MS. Health effects of vegetarian and vegan diets. *Proc Nutr Soc* 2006;**65**(1):35-41.
49. http://www.peta.de/vegetarismus/vegetarismus_essen_frs_leben.149.html. 02.02.2009.
50. <http://www.euroveg.eu/lang/de/info/howmany.php>. 02.02.2009.
51. <http://www.vebu.de/aktuelles/news/293-bald-jeder-dritte-vegetarier-aktuelle-zahlen-und-fakten>. Bald jeder dritte Vegetarier? Aktuelle Zahlen und Fakten, 02.02.2009.
52. Shultz TD, Leklem JE. Selenium status of vegeterians, nonvegetarians, and hormone-dependent cancer subjects. *Am J Clin Nutr* 1983;**37**(1):114-8.
53. Akesson B, Ockerman PA. Selenium status in vegans and lactovegetarians. *Br J Nutr* 1985;**53**(2):199-205.
54. Srikumar TS, Johansson GK, Ockerman PA, Gustafsson JA, Akesson B. Trace element status in healthy subjects switching from a mixed to a lactovegetarian diet for 12 mo. *Am J Clin Nutr* 1992;**55**(4):885-90.
55. Krajcovicova-Kudlackova M, Simoncic R, Babinska K, et al. Selected vitamins and trace elements in blood of vegetarians. *Ann Nutr Metab* 1995;**39**(6):334-9.
56. Rauma AL, Torronen R, Hanninen O, Verhagen H, Mykkanen H. Antioxidant status in long-term adherents to a strict uncooked vegan diet. *Am J Clin Nutr* 1995;**62**(6):1221-7.
57. Meissner D. [Reference values for blood and serum selenium in the Dresden area]. *Med Klin (Munich)* 1997;**92 Suppl 3**:41-2.
58. Dhindsa HS, Bermingham MA, Mierzwa J, Sullivan D. Plasma selenium concentrations in a Sikh population in Sydney, Australia. *Analyst* 1998;**123**(5):885-7.
59. de Bortoli MC, Cozzolino SM. Zinc and Selenium Nutritional Status in Vegetarians. *Biol Trace Elem Res* 2008.

60. Davey GK, Spencer EA, Appleby PN, Allen NE, Knox KH, Key TJ. EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr* 2003;**6**(3):259-69.
61. Gibson RS. Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* 1994;**59**(5 Suppl):1223S-1232S.
62. Larsson CL, Johansson GK. Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. *Am J Clin Nutr* 2002;**76**(1):100-6.
63. Rauma AL, Mykkanen H. Antioxidant status in vegetarians versus omnivores. *Nutrition* 2000;**16**(2):111-9.
64. Larsson CL, Johansson GK. Young Swedish vegans have different sources of nutrients than young omnivores. *J Am Diet Assoc* 2005;**105**(9):1438-41.
65. http://www.who.int/child_adolescent_health/topics/prevention_care/child/nutrition/breastfeeding/en/index.html. Breastfeeding, 04.02.2009.
66. BZgA. Stillen und Muttermilchernahrung. Köln: Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, 2001.
67. Howie PW. Protective effect of breastfeeding against infection in the first and second six months of life. *Adv Exp Med Biol* 2002;**503**:141-7.
68. Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *Bmj* 1990;**300**(6716):11-6.
69. Silfverdal SA, Bodin L, Olcen P. Protective effect of breastfeeding: an ecologic study of Haemophilus influenzae meningitis and breastfeeding in a Swedish population. *Int J Epidemiol* 1999;**28**(1):152-6.
70. Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, et al. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Int* 2002;**44**(4):347-52.
71. Daniels L, Gibson RA, Simmer K, Van Dael P, Makrides M. Selenium status of term infants fed selenium-supplemented formula in a randomized dose-response trial. *Am J Clin Nutr* 2008;**88**(1):70-6.
72. Jochum F, Fuchs A, Menzel H, Lombeck I. Selenium in German infants fed breast milk or different formulas. *Acta Paediatr* 1995;**84**(8):859-62.
73. Souci SW, Fachmann, W., Kraut, H. . Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. Stuttgart: medpharm Scientific Publishers, 2000
74. Hadjimarkos DM, Shearer TR. Selenium in mature human milk. *Am J Clin Nutr* 1973;**26**(6):583-5.

75. Walivaara R, Jansson L, Akesson B. Selenium content of breast milk sampled in 1978 and 1983 in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 1986;**75**(2):236-9.
76. Levander OA, Moser PB, Morris VC. Dietary selenium intake and selenium concentrations of plasma, erythrocytes, and breast milk in pregnant and postpartum lactating and nonlactating women. *Am J Clin Nutr* 1987;**46**(4):694-8.
77. Moser PB, Reynolds RD, Acharya S, Howard MP, Andon MB, Lewis SA. Copper, iron, zinc, and selenium dietary intake and status of Nepalese lactating women and their breast-fed infants. *Am J Clin Nutr* 1988;**47**(4):729-34.
78. Funk MA, Hamlin L, Picciano MF, Prentice A, Milner JA. Milk selenium of rural African women: influence of maternal nutrition, parity, and length of lactation. *Am J Clin Nutr* 1990;**51**(2):220-4.
79. Zachara BA, Pilecki A. Selenium concentration in the milk of breast-feeding mothers and its geographic distribution. *Environ Health Perspect* 2000;**108**(11):1043-6.
80. Kantola M, Vartiainen T. Selenium content of breast milk in Finland after fertilization of soil with selenium. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1991;**5**(4):283-4.
81. Lonnerdal B, Woodhouse LR, Glazier C. Compartmentalization and quantitation of protein in human milk. *J Nutr* 1987;**117**(8):1385-95.
82. Stosnach H. Environmental trace-element analysis using a benchtop total reflection X-ray fluorescence spectrometer. *Anal Sci* 2005;**21**(7):873-6.
83. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2005;**25**:215-35.
84. Renko K, Werner M, Renner-Muller I, et al. Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice. *Biochem J* 2008;**409**(3):741-9.
85. Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF. Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem* 2007;**282**(16):12290-7.
86. Charité Univeritätsmedizin B.
<http://www.charite.de/zlp/routine/referenzdb/00Start.htm>: Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, 2008.
87. Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009;**89**(6):2025S-2039S.

88. Curran JE, Jowett JB, Elliott KS, et al. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat Genet* 2005;**37**(11):1234-41.
89. Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische Pathophysiologie*. 2006.
90. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**(9):3338-42.
91. Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* 1998;**508 (Pt 3)**:949-53.
92. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart: Thieme, 2003.
93. Schweizer U, Michaelis M, Kohrle J, Schomburg L. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem J* 2004;**378**(Pt 1):21-6.
94. Schomburg L, Kohrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res* 2008;**52**(11):1235-46.
95. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;**57**(13-14):1825-35.
96. Subramanian I, Vanek ZF, Bronstein JM. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2002;**2**(4):317-23.
97. Milne DB, Johnson PE. Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults. *Clin Chem* 1993;**39**(5):883-7.
98. Appleby P, Roddam A, Allen N, Key T. Comparative fracture risk in vegetarians and nonvegetarians in EPIC-Oxford. *Eur J Clin Nutr* 2007;**61**(12):1400-6.
99. Wang YF, Chiu JS, Chuang MH, Chiu JE, Lin CL. Bone mineral density of vegetarian and non-vegetarian adults in Taiwan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;**17**(1):101-6.
100. Persson-Moschos M, Alfthan G, Akesson B. Plasma selenoprotein P levels of healthy males in different selenium status after oral supplementation with different forms of selenium. *Eur J Clin Nutr* 1998;**52**(5):363-7.
101. Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, et al. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU Int* 2003;**91**(7):608-12.

102. Arthur JR. Selenium supplementation: does soil supplementation help and why? *Proc Nutr Soc* 2003;**62**(2):393-7.
103. Schomburg L. Selenium in intensive care (SIC) study: the XX files are still unresolved. *Crit Care Med* 2007;**35**(3):995-6; author reply 996-7.
104. Jensen RG, Thompson M P. Handbook of Milk Composition. San Diego: Academic Press, Inc., 1995.
105. Groner B, Gouilleux F. Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells. *Curr Opin Genet Dev* 1995;**5**(5):587-94.
106. Rosen JM, Rodgers JR, Couch CH, et al. Multihormonal regulation of milk protein gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1986;**478**:63-76.

7. Selbständigkeitserklärung

Erklärung

Ich, Johanna Höflich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung von Selen in der vegetarischen Ernährung und in der Muttermilch“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum 05. Oktober 2009

Unterschrift

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

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. *BJN* 2010; in press.

Schomburg L, Dumitrescu AM, Liao XH, Bin.Abbas B, Hoeflich J, Köhrle J, Refetoff S. Selenium supplementation fails to correct the selenoprotein synthesis defect in subjects with SBP2 gene mutations. *Thyroid* 2009;19(3):277-81.

Stosnach H, Hoeflich J, Behrends T, Schomburg L. Mit der TRFA den Spurenelementen auf der Spur. *BIOspektrum* 2008;06: 626-7.