

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

DISSERTATION

**Spurenelement- und Biomarkeranalysen in Serumproben
von Patient*innen mit traumatischen
Rückenmarksverletzungen**

**Trace element and biomarker analyses
in serum samples of patients with
traumatic spinal cord injury**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Seelig

aus Schwerin

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Traumatische Rückenmarksverletzungen.....	5
1.1.1 Initiales klinisches Assessment.....	7
1.2 Essenzielle Spurenelemente.....	9
1.2.1 Selen und Selenoprotein P.....	10
1.2.2 Selen-bindendes-Protein 1.....	10
1.2.3 Kupfer und Ceruloplasmin.....	11
1.3 Spurenelemente und deren Bedeutung für die Entwicklung, Gesundheit und das Überleben neuronalen Gewebes.....	12
1.4 Zielstellungen der Arbeit.....	13
2 Materialien & Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Studiendesign und –kollektiv.....	14
2.1.2 Studienpopulationen und Anthropometrie.....	16
2.1.3 Chemikalien.....	21
2.1.1 Puffer.....	21
2.1.2 ELISA.....	22
2.1.3 Geräte.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Probengewinnung und externe Analysen.....	23
2.2.2 Spurenelementanalytik mittels TXRF.....	23
2.2.3 Serumbiomarker.....	24
2.3 Statistische Analysen.....	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Bestimmung der Selenbiomarker.....	28
3.1.1 Selen.....	28
3.1.2 Selenoprotein P.....	29
3.1.3 Multivariates Vorhersagemodell neurologischer Remission.....	30
3.2 Bestimmung der Kupferbiomarker.....	31

3.2.1	Kupfer	31
3.2.2	Ceruloplasmin.....	33
3.2.3	Multivariates Vorhersagemodell aus Parametern des Cu- und Se- Status.....	34
3.3	Analyse der Konzentrationen des Selen- bindenden Proteins 1.....	35
3.3.1	Relation zur Ausprägung der neurologischen Funktionsstörungen und dem klinischen Outcome	35
3.3.2	Analysen der Zytokine, Matrix-Metalloproteinasen und Interleukine	37
3.3.3	Explorative Korrelationsanalysen.....	39
4	Diskussion	41
4.1	Spurenelemente als prognostische Instrumente für das Remissionspotenzial	41
4.2	SELENBP1 als Biomarker für hypoxischen Zelluntergang nach TSCI	43
4.3	SELENBP1 – kein Parameter des Se-Status bei Patient*innen nach TSCI	45
4.4	Supplementierung als möglicher adjuvanter Therapieansatz	46
4.5	Schwächen der Arbeit	47
5	Zusammenfassung.....	48
	Literaturverzeichnis	49
	Eidesstattliche Versicherung	54
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	55
	Seelig J, Heller RA, Haubruck P, Sun Q, Georg Klingenberg J, Hackler J, Crowell HL, Daniel V, Moghaddam A, Schomburg L, Biglari B. Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury. Front Neurosci. 2021 May 28;15:680240.....	58
	Seelig J, Heller RA, Hackler J, Haubruck P, Moghaddam A, Biglari B, Schomburg L. Selenium and copper status -potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury. J Trace Elem Med Biol. 2020 Jan;57:126415	76
	Heller RA, Seelig J, Bock T, Haubruck P, Grützner PA, Schomburg L, Moghaddam A, Biglari B. Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury. J Trace Elem Med Biol. 2019 Jan;51:141-149	88
	Lebenslauf.....	99
	Publikationsliste.....	101
	Danksagung	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der ASIA Impairment Scale (AIS), dem Scoring System der amerikanischen Vereinigung für Rückenmarksverletzungen (ASIA). Abgewandelt aus Seelig et al. (58)	9
Tabelle 2. Übersicht der Charakteristika des Studienkollektivs und der Subgruppen G0, G1 und C der Pilotstudie zur Analyse des Se-Status bei Patient*innen nach TSCI. Abgewandelt von Tabelle 2 aus Heller et al. [62].....	18
Tabelle 3. Übersicht der Charakteristika des Studienkollektivs und der Subgruppen G0, G1 und C der Aufbaustudie zur Analyse der Se- und Cu-Parameter bei Patient*innen nach TSCI. Abgewandelt von Tabelle 2 aus Seelig et al. [64].	19
Tabelle 4. Eigenschaften des Studienkollektivs und der Subgruppen zur Analyse zirkulierender SELENBP1-, Zytokin-, Matrix-Metalloproteinase- und Interleukin-Konzentrationen. Abgewandelt von Tabelle 2 von Seelig et. al [63]	20

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die Höhe des Querschnitts bestimmt das Ausmaß der Lähmungen.....	7
Abbildung 2. Darstellung des Blutentnahme-Schemas.....	15
Abbildung 3. Darstellung des Studienkollektivs der vorgestellten Arbeiten.....	17
Abbildung 4. Grundprinzipien eines Sandwich-ELISA	24
Abbildung 5. Konzentrationsdynamiken des Selens.....	29
Abbildung 6. Konzentrationsdynamiken des Selenoprotein P.....	30
Abbildung 7. Multivariates Modell der Se-Parameter zur Vorhersage einer Remission der neurologischen Funktionen anhand der Änderungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme des Patienten.....	31
Abbildung 8. Darstellung der dynamischen Veränderungen der Cu-Konzentrationen. 32	
Abbildung 9. Darstellung der dynamischen Veränderungen der CP Konzentrationen. 33	
Abbildung 10. Multivariates Modell aus Parametern des Cu- und Se- Status zur Vorhersage einer neurologischen Remission.. ..	34
Abbildung 11. Konzentrationen des Selen-bindenden Proteins 1 in Relation zum klinischen Outcome und dem Ausmaß der neurologischen Funktionsdefizite.....	36
Abbildung 12. Heatmap zum Vergleich von Zytokinen, Matrix-Metalloproteinasen, Interleukinen, Spurenelementen und derer assoziierter Proteine	38
Abbildung 13. Korrelationsanalysen zwischen zirkulierenden SELENBP1 Konzentrationen zu etablierten Biomarkern des Se-Status und potenziellen Kovariablen bei TSCI	40
Abbildung 14. Simplifizierte Zusammenfassung der Studienergebnisse.. ..	48

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AIS	ASIA Impairment Scale/ Klassifizierungsskala für neurologische Defizite
ASIA	American Spinal Injury Association
AK	Antikörper
AO	Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
CCL1-4	CC-chemokine ligand 1-4
CNTF	Ziliärer Neurotropher Faktor
COX	Cytochrom- C- Oxidase
CP	Ceruloplasmin
Cu	Kupfer
CV	Variationskoeffizient
DRKS	Deutsches Register Klinischer Studien
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
GPx	Glutathionperoxidase
HRP	Horseradish-Peroxidase/ Meerrettich Peroxidase
IL-8/10	Interleukin-8/10
IQR	Interquartilsabstand
LOX	Lsyloxidase
MMP-2/8	Matrix- Metalloproteinasen-2/8
MW	arithmetisches Mittel
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NLI	Neurological level of injury, Höhe des verletzten Rückenmarks
OD	Optische Dichte
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SELENBP1	Selenium Binding Protein 1
SELENOP	Selenoprotein P
SOD	Superoxiddismutase
SOP	Standard Operating Procedure, Standardvorgehensweisen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TSCI	Traumatic Spinal Cord Injury/ Traumatische Rückenmarksverletzungen
TXRF	Total reflection X-ray fluorescence
TXNRD	Thioredoxinreduktase
UTN	Universal Trial Number
Zn	Zink

Zusammenfassung

Hintergrund: Traumatische Rückenmarksschädigungen (TSCI) sind schwerwiegende Verletzungen, welche zum Verlust aller sensiblen und motorischen Funktionen unterhalb des Verletzungsniveaus führen können. Durch primäre und sekundäre Mechanismen wird das betroffene neuronale Gewebe massivem oxidativen Stress ausgesetzt. Die Spurenelemente Selen (Se) und Kupfer (Cu) sind von zentraler Bedeutung für die antioxidative Abwehr.

Methodik: Von 2011 bis 2018 wurden in einer prospektiven Beobachtungsstudie des Querschnittszentrums Ludwigshafen von 144 Patient*innen nach TSCI klinische Daten und Blutproben zusammengetragen. Anhand der ASIA Impairment Scale (AIS) erfolgten dabei die Quantifizierung und Schweregradeinteilung (AIS A-D) der resultierenden neurologischen Defizite. Als Remission wurde eine Verbesserung des AIS Scores innerhalb von 3 Monaten definiert und die Patient*innen dementsprechend in eine Remissionsgruppe G1 und eine Nicht-Remissionsgruppe G0 eingeteilt. Als Kontrollgruppe dienten 10 Individuen mit isolierten Wirbelfrakturen ohne neurologische Defizite. Am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin Berlin erfolgten die Analysen der Spurenelemente mittels Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalysen (TXRF), der Selenoprotein P (SELENOP) und Ceruloplasmin (CP) Konzentrationen mittels ELISA und des Selen-bindenden-Protein 1 (SELENBP1) durch einen Immuno-lumineszenz Assay. Zusätzlich erfolgte die Detektion eines Zytokinprofils am Universitätsklinikum Heidelberg via Multiplex-Immunoassay Verfahren.

Ergebnisse: Innerhalb der ersten 24 Stunden (h) fielen die Se-Konzentrationen in der Remissionsgruppe G1 von 71,9 µg/L auf 48,3 µg/L ab, während sie in der Nicht-Remissionsgruppe G0 nahezu stabil blieben (58,5 µg/L vs. 60,6 µg/L) ($\Delta G1$ vs. $\Delta G0$ $p = 0,044$). Die SELENOP Konzentrationen sanken in G1 nach 12 h ($p < 0,05$) signifikant ab, während die Unterschiede in G0 marginal ausfielen ($p > 0,05$). Die Dynamiken der Cu-Konzentrationen divergierten nach 12 h ($p < 0,001$) und nach 24 h ($p = 0,023$). Die Analysen der CP-Konzentrationen ergaben keine Gruppenunterschiede. Die SELENBP1 Analysen zeigten sowohl im Hinblick auf das klinische Outcome (G0 vs. G1, $p = 0,019$) als auch in Abhängigkeit vom Ausmaß der neurologischen

Beeinträchtigungen (AIS A vs. AIS B-D, $p = 0.011$) signifikante Unterschiede auf. Anhand binärer logistischer Regressionsanalysen wurden Vorhersagemodelle für das Remissionspotenzial ermittelt, deren Genauigkeit in Abhängigkeit der ausgewählten Parameter variiert: 90,0 % (67,4 – 100,0 %) für Se + SELENOP; 87,7 % (75,1 – 100,0 %) für Se + Cu + CP.

Schlussfolgerung: Frühe Konzentrationsänderungen der Spurenelementparameter liefern diagnostische Einsichten in die Verletzungsschwere und das individuelle Remissionspotential der Patient*innen nach TSCI. Peripher reduzierte Dynamiken könnten eine für die Regenerationsprozesse vorteilhafte Umverteilung der Spurenelemente zum Ort des Verletzungsgeschehens aufzeigen.

Abstract

Background: Traumatic spinal cord injuries (TSCI) can lead to loss of all sensory and motor functions below the injury level. Due to primary and secondary pathophysiological mechanisms, the affected neuronal tissue is exposed to massive oxidative stress. The trace elements selenium (Se) and copper (Cu) are crucial for antioxidant defence.

Methods: From 2011 to 2018, in a prospective observational study of the Paraplegic Centre Ludwigshafen, blood samples and clinical data were collected from 144 patients after TSCI. The ASIA Impairment Scale (AIS) was used to grade the accompanying neurological deficits into severity levels (AIS A-D). An improvement of the AIS within three months was defined as remission and patients accordingly divided into a remission group G1 or a non-remission group G0. Ten individuals with isolated vertebral fractures without neurological deficits served as control. Trace elements were detected by total reflection X-ray fluorescence analysis (TXRF), Selenoprotein P (SELENOP) and Ceruloplasmin (CP) by ELISA and selenium-binding-protein 1 (SELENBP1) by immunoluminescence assay at the Institute for Experimental Endocrinology, Charité Universitätsmedizin Berlin. In addition, a cytokine profile was detected at Heidelberg University Hospital via multiplex immunoassay.

Results: Within the first 24 hours, Se concentrations in the remission group G1 decreased from 71,9 µg/L to 48,3 µg/L, while they remained almost stable in the non-remission group G0 (58,5 µg/L vs. 60,6 µg/L) ($\Delta G1$ vs. $\Delta G0$ $p = 0.044$). These significantly divergent dynamics were also apparent Cu- analyses, after 12 hours (G1 vs. G0 $p < 0.001$) and after 24 hours (G1 vs. G0 $p = 0.023$). SELENOP concentrations decreased significantly in G1 after 12 hours ($p < 0.05$), whereas the differences in G0 appeared marginal ($p > 0.05$). The CP analyses showed no group differences. SELENBP1 analyses revealed significant differences both in terms of clinical outcome (G0 vs. G1, $p = 0.019$) and relation to the extent of neurological impairments (AIS A vs. AIS B-D, $p = 0.011$). Binary logistic regression analyses were used to determine prediction models for the remission potential. The accuracy varies depending on the selected parameters: 90.0 % (67.4 % – 100.0 %) for Se + SELENOP, 87.7 % (75.1 % – 100.0 %) for Se + Cu parameters.

Conclusion: Early concentration changes of trace element parameters provide insights into the injury severity and the individual remission potential of patients after TSCI. Peripherally reduced dynamics may indicate a beneficial redistribution of trace elements to the site of injury for regeneration processes.

1 Einleitung

1.1 Traumatische Rückenmarksverletzungen

Das menschliche Rückenmark ist Bestandteil des zentralen Nervensystems und mit seinem komplexen Geflecht aus afferenten und efferenten Nervenfasern essentiell für die Informationsverarbeitung sensibler Wahrnehmungen aus der Peripherie und unabdingbar für die muskuläre Willkürmotorik des gesamten Bewegungsapparates [1]. Traumatische Verletzungen des Rückenmarks (TSCI), welche mit einer Querschnittssymptomatik einhergehen, bedeuten substanzielle Einschnitte in die Lebensqualität und die Lebenserwartung der betroffenen Patient*innen. Auch wenn auf dem westeuropäischen Kontinent die Inzidenz einer solchen Verletzung mit etwa 16-19 dokumentierten Fällen pro eine Million Einwohner*innen wenig erscheint, stellen sie das Gesundheitssystem, die betroffenen Patient*innen und deren Umfeld dennoch vor große Herausforderungen [2; 3]. Denn trotz intensiver Forschungsbemühungen und sich in den letzten Jahrzehnten signifikant verbesserten supportiven Therapieoptionen existiert noch immer kein kurativer Therapieansatz, so dass permanente motorische und/oder sensorische Funktionseinschränkungen weiterhin das vordergründige Leitsymptom traumatischer Rückenmarksverletzungen darstellen [4]. Das Ausmaß dieser Beeinträchtigungen wird dabei maßgeblich von der Höhe des Querschnitts bestimmt. Ein vollständiger Funktionsverlust eines oder mehrerer Rückenmarksegmente im Bereich der Halswirbelsäule bewirken den Ausfall aller motorischen und sensorischen Qualitäten der oberen und unteren Extremitäten, des Rumpfes und des Beckens, i.e. eine komplette Tetraplegie. Im Gegensatz dazu bleiben bei paraplegischen Erscheinungsbildern die Funktionen der oberen Extremitäten durch Verletzungen auf thorakaler oder lumbaler Ebene noch erhalten. Inkomplette Tetra- bzw. Paraplegien mit noch teilweise erhaltenen motorischen und/oder sensorischen Funktionen resultieren dahingegen aus einem unvollständigen Untergang des entsprechenden Rückenmarksegmentes (**Abbildung 1**) [5].

Neben den unmittelbar resultierenden Funktionseinschränkungen sind eine große Anzahl der betroffenen Patient*innen oftmals im Verlauf von Folgeerscheinungen wie chronischen Schmerzen, Kontrakturen, Spastiken, Störungen des Verdauungs- und urogenitalen Systems sowie Schluck- und Atemeinschränkungen betroffen, welche die

Rehabilitation erheblich erschweren und die Lebensqualität zusätzlich mindern. Gleichzeitig besteht ein permanent erhöhtes Risiko für lebensbedrohliche Komplikationen wie Thrombosen, Lungenembolien, fulminante Infektionen, Sepsis oder Suizid [2; 6]. Die Beeinträchtigungen gehen jedoch weit über die rein körperlichen Einschränkungen bzw. medizinischen Aspekte hinaus. Die Teilhabe an alltäglichen Aktivitäten und gesellschaftlichen Ereignissen, die Ausübung eines Berufs oder die bloße Aufrechterhaltung sozialer Kontakte unterliegen großen Hürden und sind oftmals trotz tiefgreifender Veränderungen in allen Lebensbereichen nur schwer zu bewältigen [4; 7].

Die zugrundeliegende Pathophysiologie traumatischer Rückenmarksverletzungen ist komplex und aktueller Forschungsinhalt vieler Studien sowohl im klinischen- als auch im Grundlagenbereich [8; 9; 10; 11; 12]. Grundsätzlich können dabei zwei Phasen unterschieden werden. Die erste, primäre Phase wird durch den ursächlichen Verletzungsmechanismus, das eigentliche Trauma abgebildet. Mechanische Kräfte wirken auf die knöchernen und ligamentären Strukturen ein und führen zu Frakturen, Kompressionen, Distractionen, Gefäßverletzungen und Gewebeerreißen, welche das Rückenmark direkt oder indirekt schädigen [13]. In Folge dieser gefäß- und membranzerstörenden Einwirkungen kann sich aufgrund des plötzlichen Verlustes der vegetativen Regulierungsmechanismen ein lebensbedrohlicher spinaler Schock manifestieren, welcher mit hämodynamischen Dysregulationen wie einem massiven Abfall des Blutdruckes und der Herzfrequenz sowie Störungen der Temperaturregulation einhergehen kann [14]. Hauptursachen der zugrundeliegenden Traumata sind in den meisten Fällen Verkehrsunfälle und Stürze, gefolgt von Sportunfällen und Verletzungen durch Gewaltdelikte, was in Summe Anhaltspunkte dafür liefern könnte, weshalb weltweit betrachtet vor allem eher jüngere und in der Mehrzahl männliche Patienten von solchen Verletzungen betroffen sind [15].

Im Anschluss an diese kurze, primäre Phase erfolgt innerhalb weniger Minuten der Übergang in eine sekundäre Phase, welche über Tage, oder Wochen bis Monate persistieren kann und durch massiven Zelluntergang des neuronalen Gewebes gekennzeichnet ist [16]. In dieser Phase werden vielfältige inflammatorische, zellrekrutierende und immunologische Prozesse ausgelöst. Die daraus resultierenden hypoxischen/ischämischen Zustände, die Akkumulationen von Neurotransmittern, Lipidperoxidationen, sowie die Bildung freier Radikale erzeugen massiven oxidativen

Stress auf das betroffene Gewebe [13; 17]. In den folgenden Wochen bis Monaten bildet sich eine funktionslose, multizelluläre Narbe am Ort des Verletzungsgeschehens, welche im Kontext der subakuten und chronischen Mechanismen durch infiltrierende Zellen wie Astrozyten, Immunzellen und Fibroblasten sowie durch Demyelinisierungs- und axonale Umbauprozesse gebildet wird [18].

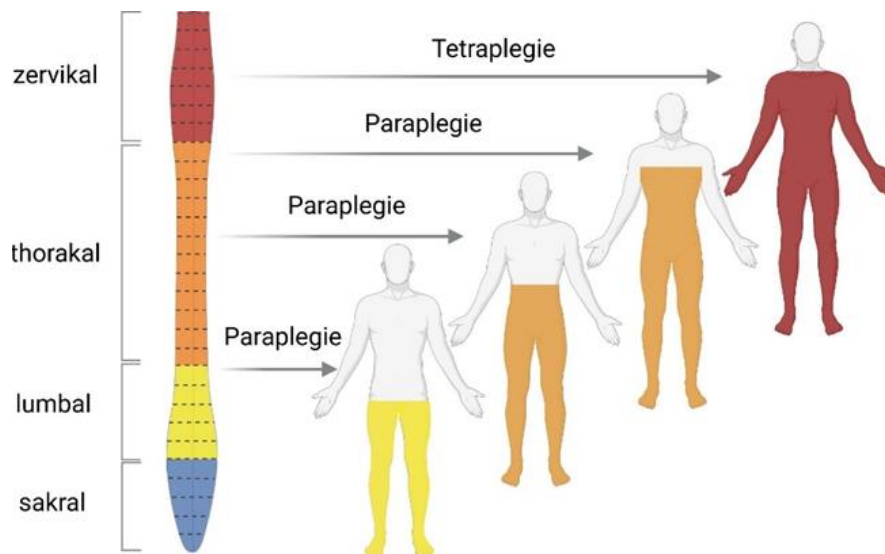


Abbildung 1. Die Höhe des Querschnitts bestimmt das Ausmaß der Lähmungen. Eine Schädigung des Rückenmarks auf Höhe der Halswirbelsäule kann in eine Tetraplegie münden, dem Verlust aller neurologischen Funktionen der oberen und unteren Extremitäten, des gesamten Rumpfes und des Beckens unterhalb des Verletzungsniveaus (rot). Bei einer Paraplegie bleiben die Funktionen der oberen Extremitäten erhalten. Die Einschränkungen betreffen je nach Verletzungshöhe die unteren Extremitäten und Teile des Rumpfes (orange – gelb). Erstellt mit BioRender.com.

1.1.1 *Initiales klinisches Assessment*

Das übergeordnete Ziel des aktuellen Behandlungskonzeptes für Patient*innen nach TSCI besteht darin, die einsetzende Kaskade sekundärer pathophysiologischer Mechanismen bestmöglich abzumildern, um die Entstehung der irreversiblen Umbauprozesse so möglicherweise verhindern zu können [19]. Nach der präklinischen Stabilisierung und der unmittelbaren Verlegung in ein spezialisiertes Versorgungszentrum sind hierbei eine zielführende Diagnostik und die schnelle Einleitung notwendiger Interventionen innerhalb der ersten 24 Stunden maßgebend für das Überleben und das langfristige Outcome der Patient*innen [16]. In der klinischen Erstbeurteilung werden die aus der Rückenmarksschädigung

resultierenden, neurologischen Defizite anhand der etablierten ASIA Impairment Scale (AIS), dem Scoring-System der amerikanischen Vereinigung für Rückenmarksverletzungen (ASIA), ausführlich evaluiert und quantifiziert. Die detaillierten motorischen und sensorischen Untersuchungen erlauben eine schnelle Orientierung im Hinblick auf die Höhe der Verletzung und das Ausmaß der neurologischen Defizite (AIS A-D) (**Tabelle 1**). Bewusstseins Einschränkungen, präklinische Sedierungen und zusätzliche Verletzungen stellen die untersuchenden Personen dabei jedoch oftmals vor große Herausforderungen [19]. Zur bildgebenden Quantifizierung des lokalen Verletzungsausmaßes stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) den Goldstandard dar. Mithilfe der MRT-Schnittbilder können Schädigungen intra- und extramedullärer Strukturen abgeschätzt und potenziell rückenmarkskomprimierende Prozesse wie Einblutungen, Ödeme, Frakturen oder Instabilitäten detektiert werden. Über die sich im Verlauf entwickelnden neurodegenerativen Veränderungen der betroffenen Rückenmarkssegmente liefern die konventionellen MRT-Sequenzen jedoch nur wenige Informationen [20; 21]. Die Limitierungen der rein klinischen Evaluation des neurologischen Funktionsstatus und die eingeschränkte Aussagekraft der bildgebenden Verfahren lassen eine verlässliche Aussage über die Prognose bzw. das individuelle Remissionspotenzial der Patient*innen oftmals erst nach Wochen bis Monaten zu. Es besteht ein großer Bedarf an der Identifikation zusätzlicher objektiver Parameter/Biomarker, welche frühzeitig in der Lage sind, weitere Einblicke in die komplexen biochemischen und zellulären Prozesse zu liefern und Aussagen über den Krankheitsverlauf zu erlauben.

Tabelle 1. Übersicht der ASIA Impairment Scale (AIS), dem Scoring System der amerikanischen Vereinigung für Rückenmarksverletzungen (ASIA). Abgewandelt aus Seelig et. al (58)

AIS Klassifikation	Lähmung	Klinisches Ausmaß der neurologischen Defizite
A	Komplett	Funktionsverlust aller motorischen und sensiblen Qualitäten unterhalb des Verletzungsniveaus inklusive der sakralen Segmente S4-S5
B	Inkomplett	sensible Funktionen teilweise erhalten, motorische Funktionen unterhalb des Verletzungsniveaus komplett erloschen, inklusive der Segmente S4 S5
C	Inkomplett	sensible und motorische Funktionen unterhalb des Verletzungsniveaus teilweise erhalten, Muskelkraft der Kennmuskeln geringer als Kraftgrad 3
D	Inkomplett	sensible und motorische Funktionen unterhalb des Verletzungsniveaus weitestgehend erhalten, Muskelkraft der Kennmuskeln größer Kraftgrad 3
E	Keine	motorische und sensible Funktionen sind normal

1.2 Essenzielle Spurenelemente

Essenzielle Spurenelemente sind chemische Substanzen, welche der menschliche Organismus täglich in sehr geringen Mengen über die Nahrung zu sich nimmt, um die Homöostase vieler lebenswichtiger Prozesse aufrecht erhalten zu können [22; 23; 24]. Zu diesen unverzichtbaren Mikronährstoffen zählen unter anderem Kupfer (Cu), Selen (Se) und Zink (Zn) [25]. Als Bestandteil bioaktiver Proteine sind diese Elemente verantwortlich für die spezifischen Koordinierungs-, Katalyse- oder Elektronentransfereigenschaften vieler Makromoleküle und so unmittelbar an enzymatischen Reaktionen, immunologischen Mechanismen und Organfunktionen beteiligt [26]. Defizite in der Versorgung mit diesen Elementen führen zu unterschiedlichen Mangelerscheinungen und können die Entstehung eines breiten Spektrums an Krankheiten begünstigen [27; 28; 29]. Expositionen durch zu hohe, toxische Konzentrationen dieser chemischen Substanzen können jedoch ebenso gesundheitsschädlich sein [30].

1.2.1 Selen und Selenoprotein P

Die Aufnahme des Selens (Se) kann über anorganische Verbindungen wie Natriumselenit, aber auch über organische Verbindungen wie Selenomethionin oder Selenocystein erfolgen, wobei diese in Pflanzen- und Fleischprodukten, Meeresfrüchten oder Milchprodukten zu finden sind [31]. Als Selenocystein (Sec) wird Se für die Biosynthese von 25 verschiedenen humanen Selenoproteinen benötigt, welche eine Vielzahl essenzieller Aufgaben im Organismus übernehmen. Die bekanntesten Vertreter dieser Selenoproteine sind die Glutathionperoxidasen (GPx 1-4), die Deiodasen (Dio1-3) und die Thioredoxinreduktasen (TXNRD). Sie sind substanziell für die antioxidative Abwehr, eine suffiziente Immunantwort sowie an der Produktion von Schilddrüsenhormonen beteiligt [23; 32]. Des Weiteren kontrollieren sie Zellproliferations-, Apoptose- und Transkriptionsprozesse [31; 33]. Der Einbau der meisten Selenocysteinaminosäuren erfolgt in das Transportprotein des Selens, das Selenoprotein P (SELENOP). Das hauptsächlich in der Leber synthetisierte Protein ist für die Verteilung des Se im gesamten Organismus verantwortlich. Zusätzlich verfügt es über antioxidative Fähigkeiten und konnte auf zellulärer Ebene als entscheidender Faktor für das Überleben neuronalen Gewebes identifiziert werden [34; 35]. Ein insuffizienter Se-Status wurde in verschiedenen Studien als Risikofaktor für das Auftreten schwerer kardiovaskulärer Ereignisse, die Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen, sowie als nachteilig für die Überlebenswahrscheinlichkeit nach polytraumatischen Verletzungen oder septischen Infektionsgeschehen beschrieben [36; 37]. Im Mittel liegen die Se-Blutkonzentrationen bei Erwachsenen auf dem westeuropäischen Kontinent bei 82,1 µg/L (52,1 µg/L – 125,1 µg/L) und für SELENOP bei 4,3 mg/L (2,9 mg/L – 6,1 mg/L) [38].

1.2.2 Selen-bindendes-Protein 1

Das erstmals 1989 in der Mausleber beschriebene Selen-bindende-Protein 1 (SELENBP1) stellt einen weniger intensiv charakterisierten Vertreter der Selenoproteine dar [39]. Das hauptsächlich intrazellulär vorkommende Protein ist in den meisten humanen Geweben exprimiert und liegt unter physiologischen Umständen teilweise im Komplex mit der Glutathionperoxidase 1 (GPx1) vor. Als enzymatische Aktivität des Proteins wird das Katalysieren der Oxidation von

Methanthiol zu Signalmolekülen der Zelldifferenzierung beschrieben [40; 41]. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass SELENBP1 an Prozessen der Zellmotilität, Proteindegradation und Redox-Modulation beteiligt sein könnte [42; 43]. In Tumorgewebe wurden Assoziationen zwischen reduzierten Konzentrationen des SELENBP1 mit einem ausgeprägten Tumorprogress und einem erhöhten Mortalitätsrisiko beschrieben [44; 45; 46]. Am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin zu Berlin konnten in Myokardinfarkt-Patientenseren erhöhte SELENBP1-Konzentrationen nachgewiesen werden. In diesen Untersuchungen konnte eine positive Korrelation der zirkulierenden Konzentrationen von SELENBP1 mit dem Ausmaß der Myokardschädigungen, bedingt durch die Ischämie, beschrieben werden [47; 48].

1.2.3 Kupfer und Ceruloplasmin

Nach Zn und Fe ist Cu das dritthäufigste Spurelement im menschlichen Organismus und muss, ebenso wie Se oder andere essenzielle Mikronährstoffe, regelmäßig über die Nahrung zugeführt werden. Die Aufnahme von Cu erfolgt unter anderem beim Verzehr von Nüssen, Hülsenfrüchten, Muscheln oder Fischprodukten [49]. Von der deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) wird dabei für Erwachsene eine tägliche Zufuhr von etwa 1 mg - 1,5 mg empfohlen, sodass sich unter normalen Ernährungsverhältnissen in der adulten europäischen Bevölkerung im Durchschnitt eine Cu-Serumkonzentration von etwa 635 µg/L - 1398 µg/L ergibt [50; 51]. Aufgrund der einzigartigen Fähigkeit des Cu zwei verschiedene Redoxzustände einnehmen zu können - den oxidierten (Cu^{2+}) und den reduzierten (Cu^+) Zustand, dient Cu als wichtiger katalytischer Faktor in einer Vielzahl bioaktiver Proteine [24]. In Form der Superoxiddismutase (SOD), Cytochrom- C-Oxidase (COX) und Lysyloxidase (LOX) ist Cu unter anderem an Mechanismen zur Abwehr oxidativen Stresses, der Zellatmung oder der Modulation extrazellulären Gewebes entscheidend beteiligt [52]. Eine unzureichende nutritive Zufuhr und eine damit verbundene insuffiziente Verfügbarkeit der Cu-abhängigen bioaktiven Proteine könnte dementsprechend eine erhöhte Anfälligkeit für oxidative Schädigungen, Funktionseinschränkungen zirkulierender Blut- und Immunzellen bis hin zu osteoporotischen Zuständen und neurologischen Funktionsdefiziten führen [24; 49]. Der Hauptanteil des Cu wird jedoch an das hepatisch synthetisierte Protein Ceruloplasmin (CP) gebunden, welches physiologisch

in Serumkonzentrationen von 180 mg/L – 450 mg/L vorkommt. CP verfügt über ferrooxidative Eigenschaften und schützt das Gewebe unter anderem vor eisenvermittelten reaktiven Sauerstoffradikalen [24; 53]. Eine Erhöhung intravasaler CP-Konzentrationen wurden vor allem bei systemischen Infektionsgeschehen und im Rahmen ausgeprägter Zellschädigungen beobachtet. Eine Erniedrigung hingegen manifestiert sich vor allem bei hereditären Erkrankungen wie Morbus Wilson [28; 54].

1.3 Spurenelemente und deren Bedeutung für die Entwicklung, Gesundheit und das Überleben neuronalen Gewebes

Eine unzureichende maternale Nutrition und damit einhergehende insuffiziente fetale Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen kann schwerwiegende Auswirkungen auf die embryonale Entwicklung und die Ausbildung funktionsfähigen neuronalen Gewebes haben [55]. In einem murinen Depletionsmodell zu fehlenden bzw. funktionseingeschränkten Selenoproteinen verstarben die Tiere oftmals bereits während der Embryonalphase oder präsentierten postnatal schwerwiegende morphologische und neurologische Defizite [35]. Unter normalen Entwicklungsbedingungen nehmen die Spurenelemente eine zentrale Rolle in der Abwehr (traumatisch bedingter) hypoxischer und oxidativer Schädigungen ein. Im Kontext hämorrhagischer Schlaganfälle konnte aufgezeigt werden, dass Neurone auf lipidperoxidative oder ferroptotische Stimuli mit der Induktion von Selenoproteinen wie der GPx4 reagieren, um die Zellen damit effektiv vor dem Untergang zu schützen [56]. Die Cu-abhängige SOD wurde in posttraumatischen Mäusehirnen als weiteres Instrument in der Abwehr von reaktiven Sauerstoffradikalen und in der Vorbeugung mitochondrialer Dysfunktion identifiziert [57]. Im Rahmen traumatischer Rückenmarksverletzungen hat ein CP-Mangel bei Mäusen zu einem signifikant vermehrten neuronalen Gewebsverlust geführt [58]. Eine Se-Supplementierung konnte wiederum eine Verbesserung der Regeneration neurologischer Funktionen bewirken [59]. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze können die Resultate nicht konsequent auf den Menschen übertragen werden. Oftmals konnten sich die im Tiermodell vorteilhaft erschienenen Therapie- oder Interventionsansätze in der Anwendung an Patient*innen nicht bestätigen [60]. Deshalb besteht ein großer Bedarf darin, die Veränderung der Spurenelementkonzentrationen nach TSCI am humanen Modell zu evaluieren, um so Erkenntnisse über ihre potenzielle Rolle in der

Pathophysiologie im Menschen gewinnen und mögliche Interventionsansätze entwickeln zu können.

1.4 Zielstellungen der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Konzentrationen zirkulierender Spurenelemente (Cu, Se und Zn) und derer assoziierter Proteine (SELENOP und CP) in Serumproben von Patient*innen nach traumatischer Rückenmarksverletzung zu detektieren und diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den klinischen Untersuchungsbefunden und dem individuellen Outcome der Patient*innen zu analysieren. Anhand eines engmaschigen Blutentnahmeprotokolls sollten potenzielle Biomarker identifiziert werden, welche eine frühzeitige Aussage über das individuelle Remissionspotential ermöglichen und das klinische Assessment der Patient*innen verbessern könnten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Konzentration des zirkulierenden SELENBP1 abhängig vom Ausmaß des Gewebeschadens ist. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so könnte SELENBP1 als möglicher additiver und objektiver Parameter des lokalen zellulären Untergangs dienen und so eine frühzeitige Abschätzung des neuronalen Schadens und der Remissionswahrscheinlichkeit ermöglichen.

2 Materialien & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Studiendesign und –kollektiv

Die klinische Beobachtungsstudie (Fall-Kontroll-Studie) wurde im Zeitraum von 2011 bis 2018 in der Abteilung für Querschnittgelähmte der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Ludwigshafen in Rheinland-Pfalz zur prospektiven Datenerhebung von Patient*innen nach traumatischer Rückenmarksverletzung (TSCI) durchgeführt. Die Überprüfung und Genehmigung zur Durchführung der Studie erfolgte durch den Ethikrat des Universitätsklinikums Heidelberg und der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (837.188.12 / 8289-F). Die Registrierung der Studie im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS) erfolgte am 23.03.2016 (Studien-ID: DRKS00009917; Universal Trial Number (UTN): U1111-1179-1620). Alle in die Studie eingeschlossenen Patient*innen haben nach zuvor erfolgter ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben. In jeder Aufklärung wurde darüber informiert, dass die Patient*innen jederzeit ohne Angabe eines Grundes dieses Einverständnis widerrufen können und das Recht haben, dass ihre Daten aus der Studie ausgeschlossen werden, ohne nachteilige Konsequenzen erwarten zu müssen. Die Erfassung und Verarbeitung aller erhobenen Daten sind gemäß der guten klinischen Praxis und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki erfolgt.

Insgesamt konnten 144 Patient*innen in das klinische Studienregister der BG Klinik Ludwigshafen aufgenommen werden. Als Einschlusskriterien galten dabei das Auftreten von mindestens einer traumatisch bedingten Wirbelsäulenfraktur und begleitende sensomotorische Defizite aufgrund einer Rückenmarksschädigung. Ausschlusskriterien für eine Aufnahme in die Studie waren das Vorhandensein nicht-traumatischer Verletzungen des Rückenmarks, Schädel-Hirn-Traumata, traumatische Amputationen von Extremitäten, Komata oder jegliches andere schwere Trauma neben der Verletzung des Rückenmarks. Die Beobachtung und Datenerhebung erfolgten nach der Krankenhausaufnahme jeweils für drei Monate. Innerhalb dieses Zeitraumes hat keiner der ausgewählten Patient*innen Methylprednisolon oder andere

experimentelle Therapien erhalten. Die klinischen Untersuchungen der Patient*innen zur Beurteilung des Vorhandenseins neurologischer Funktionseinschränkungen erfolgten gemäß internationaler Standards [61] innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Hospitalisierung und wurden drei Monate danach wiederholt. Die Quantifizierung und Schweregradeinteilung der detektierten Defizite erfolgte anhand der ASIA Impairment Scale (AIS), dem Scoring-System der amerikanischen Vereinigung für Rückenmarksverletzungen (ASIA) (**Tabelle 1**). Des Weiteren wurde den Proband*innen nach einem standardisierten Schema über den gesamten Beobachtungszeitraum an elf definierten Zeitpunkten Blut abgenommen. Das Schema sah dabei Abnahmen zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme (0 Stunden), 4, 9, 12 und 24 Stunden danach, sowie 3, 7, 14 Tage und 1, 2 und 3 Monate nach der Hospitalisierung vor (**Abbildung 2**). Aufgrund der komplexen medizinischen Versorgungssituation der Patient*innen und durch Verluste während des Observationszeitraumes lagen nicht für alle Proband*innen zu jedem der definierten Zeitpunkte Probenmaterial für die Analysen vor. Für die Kontrollgruppe standen Proben für die Zeitpunkte 0, 4, 9, 12 und 24 Stunden sowie Tag 3 und 7 nach der Hospitalisierung zur Verfügung.

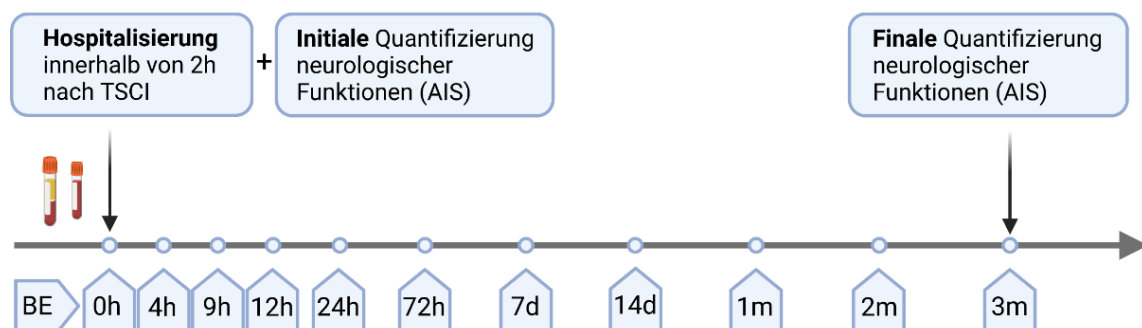


Abbildung 2. Darstellung des Blutentnahmeschemas. Im Rahmen des 3-monatigen Observationszeitraumes wurde den Patient*innen mit traumatischen Rückenmarksverletzungen (TSCI) nach der Krankenhausaufnahme (Zeitpunkt 0 Stunden) nach 4, 9, 12 und 24 Stunden, nach 3, 7 und 14 Tagen sowie nach 1, 2 und 3 Monaten Blut für die Analyse abgenommen. Abkürzungen: TSCI: traumatic spinal cord injury; AIS ASIA Impairment Scale: ASIA American Spinal Injury Association; BE: Blutentnahme. Abgewandelt aus Heller et. al von 2018 [62]. Erstellt mit BioRender.com.

Die Untersuchungsergebnisse der Erst- und Letztevaluierung des neurologischen Status, welche in Summe das klinische Outcome abbilden, stellten die Grundlage der retrospektiven Einteilung der Patient*innen in zwei Subgruppen dar. Studienteilnehmer*innen, welche innerhalb von drei Monaten eine Verbesserung der

neurologischen Funktionen und somit eine Verbesserung in der AIS Klassifikation erzielen konnten, wurden in der Remissionsgruppe G1 zusammengefasst. Studienteilnehmer*innen bei denen keine Remission der neurologischen Funktionen innerhalb von drei Monaten festgestellt werden konnte, bildeten die Nicht-Remissionsgruppe G0. Die Individuen mit traumatischen Frakturen der Wirbelsäule ohne begleitende neurologische Defizite wurden als Kontrollgruppe C zusammengefasst. Über diese Einteilung hinaus erfolgte in der Arbeit zur Analyse der SELENBP1 Konzentrationen eine zusätzliche Subgruppierung in zwei weitere Gruppen, in Abhängigkeit vom Ausmaß der neurologischen Funktionseinschränkungen [63]. Patient*innen, welche in der Ersteinschätzung der begleitenden neurologischen Defizite als AIS A (Maximalausprägung neurologischer Defizite) klassifiziert wurden, wurden in die Gruppe „AIS A“ aufgenommen. Proband*innen hingegen, welche als AIS B-D (teilweise erhaltene Funktionen) klassifiziert wurden, dementsprechend in die Gruppe „AIS B-D“.

2.1.2 Studienpopulationen und Anthropometrie

Die Studie unterlag zu jedem Zeitpunkt einem explorativen Charakter, weshalb sich in Abhängigkeit von der Fragestellung, der Verfügbarkeit analysierbaren Probenmaterials und des Entwicklungsstandes neuer Testmethoden die Fallzahlen und Subgruppierungen innerhalb der veröffentlichten Arbeiten unterscheiden (**Abbildung 3**). In der zuerst publizierten Pilotstudie zur Analyse des Se-Status bei Patient*innen nach TSCI konnten von den ursprünglich 144 ins Studienregister aufgenommenen Proband*innen mittels statistischer Matching-Methoden zur Minimierung von Einflussgrößen wie Alter, Geschlecht, Höhe der Rückenmarksschädigung etc. und unter der Prämisse, dass mindestens 75 % der zu den definierten Zeitpunkten abgenommenen Serumproben zur Verfügung standen, 29 Individuen (G1 = 10, G0 = 9, C = 10) in die Analysen eingeschlossen werden [62]. In der zweiten, aufbauenden Studie zur Analyse der Kupfer-Parameter erfolgte eine Fokussierung auf die ersten 24 Stunden, mit der Zielstellung möglichst viele Patient*innen zusätzlich einschließen zu können. Unter der Maßgabe, dass mindestens drei von fünf Proben vorhanden sein sollten, konnten 23 weitere Individuen eingeschlossen und das Kollektiv auf $n = 52$ Patient*innen (G1 = 21, G0 = 21, C = 10) erweitert werden [64]. In der dritten Arbeit zur Analyse zirkulierender SELENBP1

Konzentrationen sollten unsere Ergebnisse der Spurenelement-, SELENOP-, und CP-Analysen mit den Analysen der Zytokine CCL-2, CCL-3 und CCL-4 (CC-chemokine ligand 2, 3 und 4), der Matrixmetalloproteinasen 2 und 8 (MMP-2, MMP-8), sowie der Interleukine 8 und 10 (IL-8, IL-10) aus Heidelberg zusammengeführt und die SELENBP1 Dynamiken vor dem Hintergrund dieser gemeinsamen Ergebnisse diskutiert werden. Von den zuvor eingeschlossenen 52 Individuen verfügten n = 8 über keine Daten zu den Zytokinen, sodass sie ausgeschlossen werden mussten und sich die Studienpopulation dieser Arbeit somit auf n = 44 Proband*innen reduzierte [63].

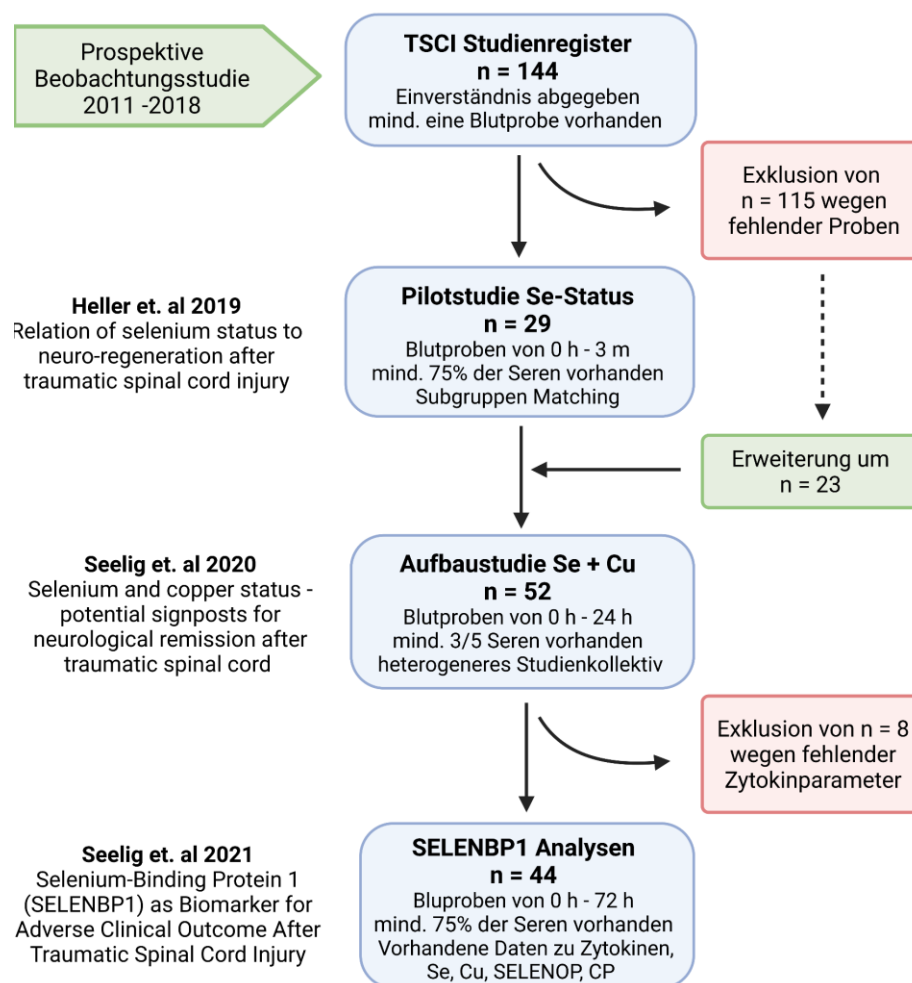


Abbildung 3. Darstellung des Studienkollektivs der vorgestellten Arbeiten. Von den 144 in das Studienregister eingeschlossenen Patient*innen, konnten in der Pilotstudie zur Analyse des Selen (Se)-Status (Se + Selenoprotein P) n = 29 Individuen in die Analysen einbezogen werden, da von ihnen innerhalb des Beobachtungszeitraumes mindestens zu 75 % der Blutentnahmezeitpunkte Probenmaterial zur Verfügung stand. In der Aufbaustudie zur zusätzlichen Analyse der Kupfer- (Cu) Parameter (Cu + Ceruloplasmin) konnte unter der Umstellung des Analysefokus auf die ersten 24 Stunden das Kollektiv um n = 23 weitere Patient*innen auf n = 52 erweitert werden. In der dritten Arbeit zur Analyse der SELENBP1 Konzentrationen im Kontext von Spurenelement und Zytokin- Parametern mussten n = 8 Patient*innen ausgeschlossen werden, da keine Daten zu den Zytokin-Parametern vorlagen und eine Nachbestimmung nicht mehr möglich war. Erstellt mit BioRender.com.

Die unterschiedlichen Fallzahlen, Zusammensetzungen der Subkohorten und die Darlegung der Patient*innencharakteristika wie Alter, Geschlechtsverteilung, initiale und finale AIS Klassifikation, Unfallursache, Höhe des verletzten Rückenmarkssegments und die AO Klassifikation der Wirbelsäulenfrakturen sind in der Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 für die einzelnen Studienkollektive aufgeführt.

Tabelle 2. Übersicht der Charakteristika des Studienkollektivs und der Subgruppen G0, G1 und C der Pilotstudie zur Analyse des Se-Status bei Patient*innen nach TSCI. Abgewandelt von Tabelle 2 aus Heller et al. [62].

	Studien- population (n = 29)	Gruppe G0 (n = 9)	Gruppe G1 (n = 10)	Kontrollgruppe (n = 10)	p - Wert
Alter Median (IQR)	48,0 (32,0; 59,0)	49,0 (41,0; 60,0)	49,5 (27,5; 59,0)	41,0 (34,0; 57,3)	p = 0,898
Geschlecht weiblich männlich	10 (34 %) 19 (66 %)	2 (22 %) 7 (78 %)	3 (30 %) 7 (70 %)	5 (50 %) 5 (50 %)	p = 1,000
AIS initial A B C D E	10 (34 %) 5 (17 %) 4 (14 %) 0 (0 %) 10 (34 %)	7 (78 %) 2 (22 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	3 (30 %) 3 (30 %) 4 (40 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 10 (100 %)	p = 0,056
AIS final A B C D E	7 (24 %) 4 (14 %) 2 (7 %) 6 (21 %) 10 (34 %)	7 (78 %) 2 (22 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 2 (20 %) 2 (20 %) 6 (60 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 10 (100 %)	p = 0,002
Ätiologie Sturz Verkehrsunfall andere	9 (31 %) 16 (55 %) 4 (14 %)	2 (22 %) 5 (56 %) 2 (22 %)	4 (40 %) 4 (40 %) 2 (20 %)	3 (30 %) 7 (70 %) 0 (0 %)	p = 0,695
NLI ohne zervikal thorakal lumbal	10 (34 %) 7 (24 %) 9 (31 %) 3 (10 %)	0 (0 %) 2 (22 %) 6 (67 %) 1 (11 %)	0 (0 %) 5 (50 %) 3 (30 %) 2 (20 %)	10 (100 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	p = 0,276
AO A B C	21 (72 %) 6 (21 %) 2 (7 %)	5 (56 %) 2 (22 %) 2 (22 %)	8 (80 %) 2 (20 %) 0 (0 %)	7 (70 %) 3 (30 %) 0 (0 %)	p = 0,266

Tabelle 3. Übersicht der Charakteristika des Studienkollektivs und der Subgruppen G0, G1 und C der Aufbaustudie zur Analyse der Se- und Cu-Parameter bei Patient*innen nach TSCI. Abgewandelt von Tabelle 2 aus Seelig et al. [64].

	Studien- population (n = 52)	Gruppe G0 (n = 21)	Gruppe G1 (n = 21)	Kontrollgruppe C (n = 10)	p - Wert
Alter Median (IQR)	43,5 (26,8; 59,3)	49,0 (36,0; 64,0)	34,0 (23,0; 59,0)	41,0 (34,0; 57,3)	p = 0,140
Geschlecht weiblich männlich	13 (25 %) 39 (75 %)	4 (19 %) 17 (81 %)	4 (19 %) 17 (81 %)	5 (50 %) 5 (50 %)	p = 1,000
AIS initial A B C D E	23 (44 %) 10 (19 %) 7 (13 %) 2 (4 %) 10 (19 %)	18 (86 %) 1 (5 %) 0 (0 %) 2 (10 %) 0 (0 %)	5 (24 %) 9 (43 %) 7 (33 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 10 (100 %)	p < 0,001
AIS final A B C D E	18 (35 %) 3 (6 %) 9 (17 %) 12 (23 %) 10 (19 %)	18 (86 %) 1 (5 %) 0 (0 %) 2 (10 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 2 (10 %) 9 (43 %) 10 (48 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 10 (100 %)	p < 0,001
Ätiologie Sturz Verkehrsunfall andere	30 (57 %) 17 (33 %) 5 (10 %)	12 (57 %) 7 (33 %) 2 (10 %)	11 (52 %) 7 (33 %) 3 (14 %)	7 (70 %) 3 (30 %) 0 (0 %)	p = 0,170
NLI ohne zervikal thorakal lumbal	10 (19 %) 16 (31 %) 20 (38 %) 6 (12 %)	0 (0 %) 6 (29 %) 14 (67 %) 1 (5 %)	0 (0 %) 10 (48 %) 6 (29 %) 5 (24 %)	10 (100 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	p = 0,020
AO A B C	33 (63 %) 8 (15 %) 11 (21 %)	10 (48 %) 4 (19 %) 7 (33 %)	16 (76 %) 1 (5 %) 4 (19 %)	7 (70 %) 3 (30 %) 0 (0 %)	p = 0,140

Tabelle 4. Eigenschaften des Studienkollektivs und der Subgruppen zur Analyse zirkulierender SELENBP1-, Zytokin-, Matrix-Metalloproteinase- und Interleukin-Konzentrationen. Abgewandelt von Tabelle 2 aus Seelig et. al [63] .

	Gruppe G0 (n = 15)	Gruppe G1 (n = 19)	p - Wert	AIS A (n = 15)	AIS B-D (n = 19)	p - Wert
Alter Median (IQR)	47,0 (21,0; 77,0)	32,0 (15,0; 75,0)	p = 0,107	44,0 (21,0; 75,0)	34,0 (15,0; 77,0)	p = 0,238
Geschlecht weiblich männlich	3 (20 %) 12 (80 %)	5 (26 %) 14 (74 %)	p = 1,000	4 (27 %) 11 (73 %)	4 (21 %) 15 (79 %)	p = 1,000
AIS initial A B C D	11 (73 %) 1 (7 %) 1 (7 %) 2 (13 %)	4 (21 %) 5 (26 %) 10 (53 %) 0 (0 %)	p = 0,001	15 (100 %) 0 (0 %) 0 (0 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 6 (32 %) 11 (57 %) 2 (11 %)	p < 0,001
AIS final A B C D	11 (73 %) 1 (7 %) 1 (7 %) 2 (13 %)	0 (0,0 %) 2 (11 %) 5 (26 %) 12 (63 %)	p < 0,001	11 (74 %) 2 (13 %) 2 (13 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 1 (5 %) 4 (21 %) 14 (74 %)	p < 0,001
Ätiologie Sturz Verkehrsunfall andere	9 (60 %) 4 (27 %) 2 (13 %)	11 (58 %) 7 (37 %) 1 (5 %)	p = 0,588	9 (60 %) 4 (27 %) 2 (13 %)	11 (58 %) 7 (37 %) 1 (5 %)	p = 0,588
NLI zervikal thorakal lumbal	4 (27 %) 9 (60 %) 2 (13 %)	9 (47 %) 4 (21 %) 6 (32 %)	p = 0,083	4 (27 %) 9 (60 %) 2 (13 %)	9 (47 %) 4 (21 %) 6 (32 %)	p = 0,083
AO A B C	5 (36 %) 4 (28 %) 5 (36 %)	15 (79 %) 1 (5 %) 3 (16 %)	p = 0,039	6 (40 %) 5 (33 %) 4 (27 %)	14 (78 %) 0 (0 %) 4 (22 %)	p = 0,015

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, T844.4
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany
K ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, P749.2
KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, 6781.1
KH ₂ PO ₄	Thermo Fisher Scientific, Germany, P/4800/63
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, 3957.1
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, 6366.1
Schwefelsäure	IEE-Charité, Germany*
Skim Milk Powder	Merck, Germany, 70166-500G
TMB	Surmodics IVD Inc., USA, TMBW-1000-01
TritonX100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, 3051.1
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany, 9127.1

2.1.1 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
CP- Assay Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ (K ₂ HPO ₄ :KH ₂ PO ₄ =76:24) 100 mM KCL 0,05 % (w/v) TWEEN 20 0,5 % (w/v) BSA pH 7,4	IEE-Charité, Germany*
CP-BSA-Lösung	25 % (w/v) BSA 20 mM K ₂ HPO ₄ (K ₂ HPO ₄ :KH ₂ PO ₄ =76:24) pH 7,5	IEE-Charité, Germany*
CP-Blocking-Puffer	20 mM K ₂ HPO ₄ (K ₂ HPO ₄ :KH ₂ PO ₄ =76:24) 0,5 % (w/v) BSA 0,05 % TWEEN 20 pH 7,5	IEE-Charité, Germany*
CP-Coating-Puffer	20 mM K ₂ HPO ₄ (K ₂ HPO ₄ :KH ₂ PO ₄ = 76:24) pH 7,5	IEE-Charite, Germany*
CP-Stock	4,01 mg/mL Ceruloplasmin	Lee Biosolutions Inc., USA, 187-51
CP-Wasch-Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ (K ₂ HPO ₄ :KH ₂ PO ₄ = 76:24) 100 mM KCL 0,05 % (w/v) TWEEN 20 pH 7,4	IEE-Charite, Germany*
SELENBP1-Basis-Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ 100 M NaCL pH 6,5	IEE-Charité, Germany*
SELENBP1-Blocking Puffer	Basis- Puffer + 0,1 % v/v TritonX ₁₀₀ 5 % w/v Skim Milk Powder	IEE-Charité, Germany*
SELENBP1- Proben-Puffer	Basis- Puffer +10 % v/v Glycerol 1 % w/v BSA	IEE-Charité, Germany*

SELENBP1-Wasch-Puffer	Basis- Puffer +0,1 % v/v TritonX ₁₀₀	IEE-Charité, Germany*
SELENBP1-Coating-Solution	Basis- Puffer + 0,000208 % w/v SELENBP1- Antikörper 1	IEE-Charité, Germany*
SELENBP1-Tracer-Puffer	Basis- Puffer + 0,1 % v/v TritonX ₁₀₀ 5 % w/v Skim Milk Powder 0,0375 % v/v Tracer-Antikörper	IEE-Charité, Germany*

* erstellt in der Arbeitsgruppe von technischen Mitarbeiter*innen nach SOP Vorgaben.

2.1.2 ELISA

Bezeichnung	Hersteller
selenOtest ELISA, SELENOP-ELISA	selenOmed GmbH, Germany
Ceruloplasmin-Antikörper-1	InVivo BiotechServices GmbH, Germany
Ceruloplasmin-Antikörper-2 (HRP-gekoppelt)	InVivo BiotechServices GmbH, Germany
96-Well-Platte aus PP, Vorverdünnung	Greiner-Bio-One GmbH, Germany, 650201
96-Well-Platten aus PS, CP- ELISA-Platten	Greiner-Bio-One GmbH, Germany, 655080
Microseal 'B' seal	Bio-Rad, UK, MSB1001
96-Well- Platte aus PS, SELENBP1 ELISA-Platten	Greiner-Bio-One GmbH, Germany, 655074
SELENBP1-Antikörper 1	InVivo BiotechServices GmbH, Germany
SELENBP1-Antikörper 2	InVivo BiotechServices GmbH, Germany

2.1.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Hydro Flex Washer	Tecan, USA
Infinite M200 Pro Photometer	Tecan, USA
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und externe Analysen

Nach der Abnahme wurden die Vollblutproben für 20 Minuten koaguliert, bei 3000 Umdrehungen (1500 x RCF) pro Minute zentrifugiert, das Serum aliquotiert und dann bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt. Die Kühlkette wurde bei Transportprozessen nicht unterbrochen. Die Proben wurden pseudonymisiert, so dass während der Analysen keine Rückschlüsse auf Patient*innen- oder klinische Daten möglich waren. In den Laboren des Universitätsklinikums Heidelberg erfolgte die Bestimmung der Gesamtkonzentrationen der Zytokine CCL-2, CCL-3 und CCL-4, der Matrixmetalloproteinasen 2 und 8, sowie der Interleukine 8 und 10 durch ein auf magnetische Polystyrolkugeln basierendes Multiplex-Immunoassay-Verfahren (R&D Systems, Minneapolis, MN, Vereinigte Staaten). Für die Analysen wurden kommerzielle Test-Kits (Luminex Performance Human High- Sensitivity Cytokine Panels) genutzt und die Analysen gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2 Spurenelementanalytik mittels TXRF

Für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung der Gesamtkonzentrationen der Spurenelemente Zink (Zn), Kupfer (Cu) und Selen (Se) wurden 10 µL des zu analysierenden humanen Serums nach dem Auftauen und kurzer Zentrifugation mit 10 µL eines Gallium-Standards (Konzentration 500 µg/L, Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Für Doppelbestimmungen erfolgte die zweifache Auftragung von jeweils 8 µL des Proben-Standard-Gemisches auf polierte Quarzglas-Proben-träger, welche anschließend bei 37°C für 12 Stunden getrocknet wurden. Für die Analyse wurde ein Röntgenfluoreszenz-Spektrometer (PicoFox S2, Bruker Nano, Berlin, Deutschland) zur Messung der von den verschiedenen Elementen bei Röntgenanregung emittierten, spezifischen Fluoreszenzspektren verwendet. Als interne Qualitätskontrolle wurde jedem Messdurchlauf ein kommerziell erworbener, humaner Serumstandard beigefügt (Sero AS, Seronorm, Billingstad, Norwegen). Der Intra- und Interassay Variationskoeffizient war dabei stets < 15 %.

2.2.3 Serumbiomarker

Selenoprotein P und Ceruloplasmin

Für die Detektion der SELENOP Konzentrationen wurden validierte, kommerzielle ELISA-Testkits (Selenotest™, InVivo Biosciences, Hennigsdorf, Berlin) verwendet. Die Grundlagen dieses Analyseverfahrens wurden bereits ausführlich in anderen Arbeiten dargestellt [36; 37]. Der generelle Ablauf und Aufbau des verwendeten Sandwich-ELISAs soll, aus Gründen der besseren Verständlichkeit, kurz mittels des folgenden Fließschemas dargestellt werden (**Abbildung 4**).

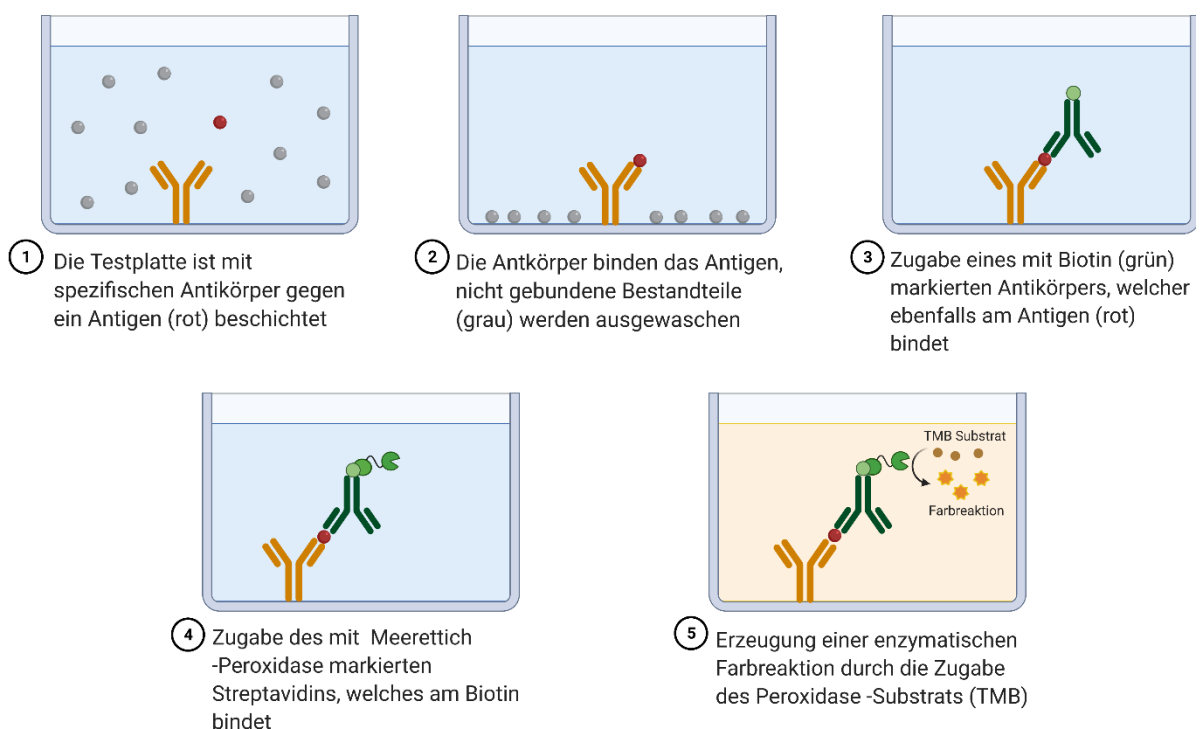


Abbildung 4. Grundprinzipien eines Sandwich-ELISA. Die Antigene werden mithilfe spezifischer, enzymgekoppelter Antikörper nachgewiesen. Nach der Probenzugabe erfolgte die Antigenbindung durch die Antikörper mit der Erzeugung einer Farbreaktion (1-5). Das Ausmaß des absorbierten Lichtspektrums, das durch die enzymatische Reaktion entstandenen Farbstoffes, steht dabei in direkter Beziehung zur Konzentration des in der Probe vorhandenen Antigens. Erstellt mit BioRender.com.

Die Durchführung der Analysen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. In einer Vorverdünnungsplatte (Greiner, bio-one, U-shape Microplatte 650201, Deutschland, Frickenhausen) wurden zunächst 5 µL des zu analysierenden humanen Serums mit 160 µL eines Probenpuffers in einem Verhältnis von 1:33 verdünnt und für 30 Sekunden bei 600 Umdrehungen pro Minute auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler

(Heidolph Titramax 4000) vermengt. Die Bestimmung der Serum SELENOP-Konzentrationen erfolgte in Doppelbestimmung. Es wurden 100 μL der verdünnten Proben auf, die mit Antikörper beschichteten, 96-well Messplatte überführt. Mit einer Abdeckfolie verschlossen wurden die Testplatten dann bei 600 rpm für 60 Minuten auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (Schritt 1+2 **Abbildung 4**). Nach der Inkubation wurden die Platten mittels eines Mikrotiterplatten-Waschapparates (Tecan Hydroflex) 4-fach gewaschen, auf saugfähigem Papier ausgeklopft und mit einem zweiten mit Biotin markierten monoklonalen SELENOP-Antikörper (Detektionsantikörper) versetzt und für weitere 60 Minuten inkubiert (Schritt 3). Es erfolgte die Zugabe von 100 μL des Detektionsenzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt mit Streptavidin. Nach einem wiederholten Waschschrift und der Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) inkubierte die Messplatte ein letztes Mal für 60 min bei RT (Schritt 4+5). Zuletzt wurden 100 μL verdünnter Schwefelsäure aufgetragen, um die TMB-Substratumsatzreaktion zu stoppen und gleichzeitig einen Farbumschlag ins Gelbe zu erzeugen. Die sich unmittelbar anschließende Vermessung der Platten wurde in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Plate Photometer Model 3550 Micoplate Reader) bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ durchgeführt. Die gemessene Lichtabsorption stand dabei in direkter Beziehung zur in den humanen Serumproben vorkommenden SELENOP-Konzentrationen.

Die Messungen der CP-Konzentrationen wurden nach einem ähnlichen Testprinzip anhand eines neu entwickelten Sandwich-ELISAs durchgeführt [65]. Hier dienten ein Paar monoklonaler Antikörper und ein kommerziell erworbener humaner CP-Standard (Lee BioSolutions), welcher in einer Konzentration 0,2 bis 25,0 mg/L aufgetragen wurde, als Grundlage des Messaufbaus. Die photometrische Analyse der Proben erfolgte dabei ebenfalls bei 450 nm.

Die abschließende Quantifizierung der Proteinkonzentrationen von SELENOP und CP erfolgte anhand der mitgeführten Standards und der gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) anhand einer logistischen Regressionsanalyse (vier Parameter logistische Regression). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte dabei mittel der Software Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Der Intra- und Interassay Variationskoeffizient war dabei stets $< 12 \%$.

Selen-bindendes Protein 1

Die Analyse der SELENBP1 Konzentrationen erfolgte mithilfe eines neu entwickelten Immuno-Assays (LIA) [47]. In Zellkultur erzeugtes rekombinantes SELENBP1-Protein, welches bereits im Institut vorhanden war, und neu generierte spezifisch bindende monoklonale Antikörper bildeten dabei die Grundlage des Assays. Der erste Antikörper wurde für die Analyse auf weiße 96-well Messplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) in pH 6,5 adjustierter Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgetragen und bei +4°C für 12 h inkubiert. Die zu untersuchenden humanen Serumproben wurden in PBS in einem Verhältnis von 1:6,7 verdünnt und 100 µL dieser Verdünnung in die Messplatte aufgetragen. Der rekombinante SELENBP-1 Standard wurde für die Standardisierung parallel in einer Konzentration von 3,91 ng/mL bis 2000 ng/mL mitgeführt und für 60 min bei RT unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. Analog zu den CP- und SELENOP-ELISA Protokollen erfolgte im Anschluss ein Waschvorgang. Nach dem die nicht gebundenen Bestandteile durch diese Prozedur entfernt wurden, wurde der mit einem Chemilumineszenzfarbstoff gekoppelte Detektionsantikörper (markiert mit einem Acridiniumester-Derivat, MACN) hinzugegeben und die Messplatte erneut bei RT für 60 Minuten inkubiert. Einem abermaligen Auswaschen ungebundener Komponenten folgte die Platzierung der Messplatte in einem Luminometer (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland). Unter Zugabe von 0,06 %igen Wasserstoffperoxid und 0,2 mol/L Natriumhydroxid erfolgte die Analyse der RLU bei einer Wellenlänge von 430 nm für 1 sec. Anhand der mitgeführten Kalibratoren und detektierten RLU wurden anhand einer logistischen Regressionsanalyse die Konzentrationen des SELENBP1 in den zu untersuchenden Proben ermittelt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte dabei mittel der Software Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Der Intra- und Interassay Variationskoeffizient war dabei stets < 15 %.

2.3 Statistische Analysen

Für die Durchführung der statistischen Analysen wurde das frei verfügbare Statistikprogramm R (Versionen 3.2.3 - 4.0.3) verwendet. Die Abbildungen wurden mittels des "ggplot2" Pakets erstellt [66]. Für alle Datenpunkte erfolgte eine Überprüfung auf Normalverteilung anhand des Shapiro-Wilks-Tests. Bei dem Vorliegen einer Normalverteilung wurde zum Vergleich der Mittelwerte der zweiseitige T-Test für abhängige und unabhängige Stichproben verwendet. Im Falle des Nichtvorhandenseins einer Normalverteilung erfolgte die Bewertung von Gruppenunterschieden anhand des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests. Kategoriale Variablen wurden durch den Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Die Darstellung der zeitaufgelösten Analysen erfolgt mittels des Mittelwertes und des Standardfehlers. Zur Prüfung der Korrelationen von Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Alle verwendeten Tests und p-Werte sind in den Abbildungen und Tabellen angegeben. Da es sich dabei um eine explorative Post-hoc-Analyse handelt, sind alle p-Werte deskriptiv zu interpretieren. Für die multiplen Testverfahren wurden keine Anpassungen vorgenommen. Um den Einfluss von verschiedenen Kovariablen auf das Ergebnis zu untersuchen, wurden univariate und multiple logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Die durch diese Analysen erzeugten Modelle wurden anhand des Akaike-Informationskriteriums (AIC) und des Bayes-Informationskriteriums (BIC) bewertet. Das primäre Maß für die prädiktive Vorhersageleistung der erzeugten logistischen Regressionsmodelle wurde dabei durch die Fläche unter der Kurve (AUC, abgekürzt aus dem Englischen für area under the curve) der jeweiligen Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analyse ausgedrückt. Die ROC-Analysen wurden mittels des "pROC" Pakets durchgeführt [67]. Die schrittweise Modellauswahl anhand des AIC- und BIC- Vergleichs erfolgte unter Verwendung des Pakets "MASS" [68]. Statistische Signifikanz wurde definiert als $p < 0,05$ und wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits in zuvor veröffentlichten Publikationen beschrieben [62; 63; 64].

3.1 Bestimmung der Selenbiomarker

3.1.1 Selen

Die Analysen der Se-Serumkonzentrationen (Mittelwert \pm Standardabweichung) ergaben divergierende Konzentrationsdynamiken innerhalb der Remissionsgruppe G1 und der Nicht-Remissionsgruppe G0 sowie der Kontrollgruppe C (**Abbildung 5**). In der Gruppe G1 fielen die initialen Se-Konzentrationen ($71,9 \mu\text{L} \pm 6,6 \mu\text{L}$) innerhalb der ersten 24 Stunden auf ein Minimum ab ($48,3 \mu\text{L} \pm 15,4 \mu\text{L}$), während sie in G0 ($58,5 \pm 20,3 \mu\text{L}$ vs. $60,6 \pm 20,1 \mu\text{L}$) und C ($61,2 \mu\text{L} \pm 15,9 \mu\text{L}$ vs. $61,6 \mu\text{L} \pm 12,4 \mu\text{L}$) nahezu unverändert blieben (A). Für die Gruppe G1 wurden im Gegensatz zur Gruppe G0 signifikant reduzierte Konzentrationen zum Ausgangswert nach 4, 12, 24 Stunden und nach 3 Tagen festgestellt ($p < 0,05$) (B). Dementsprechend zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen Konzentrationsdynamiken der Subgruppen G1, G0 und C innerhalb der ersten 24 Stunden (G1 vs. G0 $p = 0,044$ und G1 vs. C $p = 0,025$) (C).

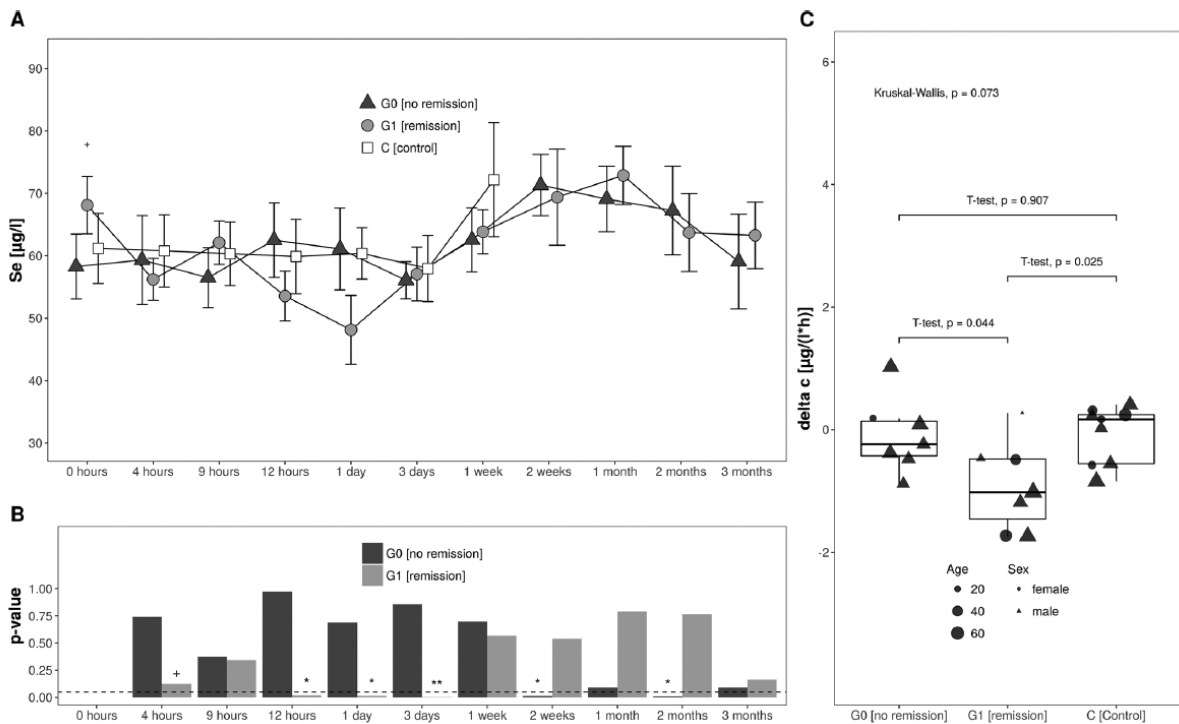


Abbildung 5. Konzentrationsdynamiken des Selen. Zeit-aufgelöste Darstellung der Serumselenkonzentrationen der Gruppen G1 (Remission), G0 (Nicht-Remission) und C (Kontrolle) **(A)**. In der Gruppe G1 fallen die Konzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden auf ein Minimum ab, während sie in den Gruppen G0 und C nahezu stabil blieben. In G1 ergaben sich signifikant reduzierte Konzentrationen zum Ausgangswert nach 4, 12 und 24 Stunden sowie nach 3 Tagen ($p < 0.05$) **(B)**. Die Konzentrationsdynamiken innerhalb der ersten 24 Stunden (ausgedrückt als größte Konzentrationsänderung zum Ausgangswert, delta) unterschied sich zwischen den Gruppen G1 vs. G0 $p = 0,044$ sowie zwischen G1 vs. C $p = 0,025$ signifikant **(C)**. Alle Daten sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Die resultierenden p-Werte sind wie folgt angegeben: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; und ***, $p < 0,001$. Modifizierte Abbildung 3 aus Heller et. al [62].

3.1.2 Selenoprotein P

Die Analysen der SELENOP-Serumkonzentrationen (Mittelwert \pm Standardabweichung) ergaben initial in der Gruppe G1 ($5,4 \pm 1,2$ mg/L) im Vergleich zu den Gruppen G0 ($4,3 \pm 1,5$ mg/L) und C ($4,7 \pm 1,3$ mg/L) die höchsten Konzentrationen **(Abbildung 6)**. Analog zu den Veränderungen des Se sanken die Konzentrationen des SELENOP innerhalb der ersten 72 Stunden auf ein Minimum ab **(A)**. Für die Gruppe G1 ergaben sich dabei nach 12 und 72 Stunden signifikante Unterschiede zum initialen 0 Stundenwert ($p < 0,05$) **(B)**. Die Analyse der jeweiligen Konzentrationsdynamiken innerhalb der ersten 24 Stunden zwischen den Subgruppen ergaben im Gegensatz zum Se keine statistisch signifikanten Unterschiede **(C)**.

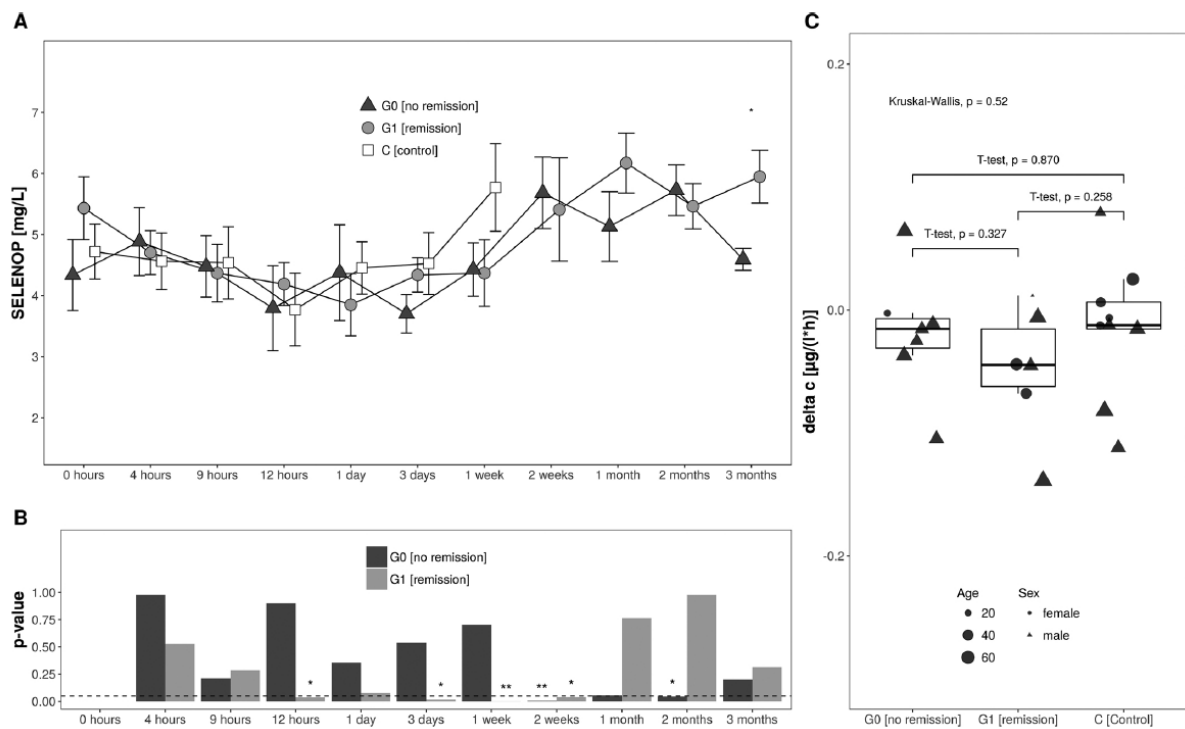


Abbildung 6. Konzentrationsdynamiken des Selenoprotein P. Zeit-aufgelöste Serum-SELENOP-Konzentrationen der Gruppen G1 (Remission), G0 (nicht-Remission) und C (Kontrolle) (A). Innerhalb der ersten 72 Stunden fallen die Serumkonzentrationen innerhalb der Subgruppen auf ein Minimum ab, wobei sich für die Gruppe G1 nach 12 Stunden und nach 3 Tagen signifikante Unterschiede zum Ausgangswert ergeben ($p < 0,05$) (B). Die Konzentrationsdynamiken innerhalb der ersten 24 Stunden (ausgedrückt als größte Konzentrationsänderung zum Ausgangswert, delta) wies keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen G1, G0 und C auf (C). Alle Daten sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Die resultierenden p-Werte sind wie folgt angegeben: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; und ***, $p < 0,001$. Modifizierte Abbildung 4 aus Heller et. al [62].

3.1.3 Multivariates Vorhersagemodell neurologischer Remission

Um die prognostische Aussagekraft der dynamischen Veränderungen der Se- und SELENOP-Parameter im Hinblick auf die Vorhersage einer neurologischen Remission zu evaluieren, wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt und verschiedene uni- und multivariate Modelle entworfen. Das Modell mit der besten Vorhersageleistung enthält die Konzentrationsveränderungen des Se und SELENOP zwischen den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden und ist in der **Abbildung 7** als Grenzwertoptimierungskurve (ROC) dargestellt. Die Fläche unter der Kurve (AUC) entspricht einer Vorhersagegenauigkeit von 90 % (CI: 67,4 % – 100,0 %) für das Auftreten einer neurologischen Remission (**Abbildung 7**).

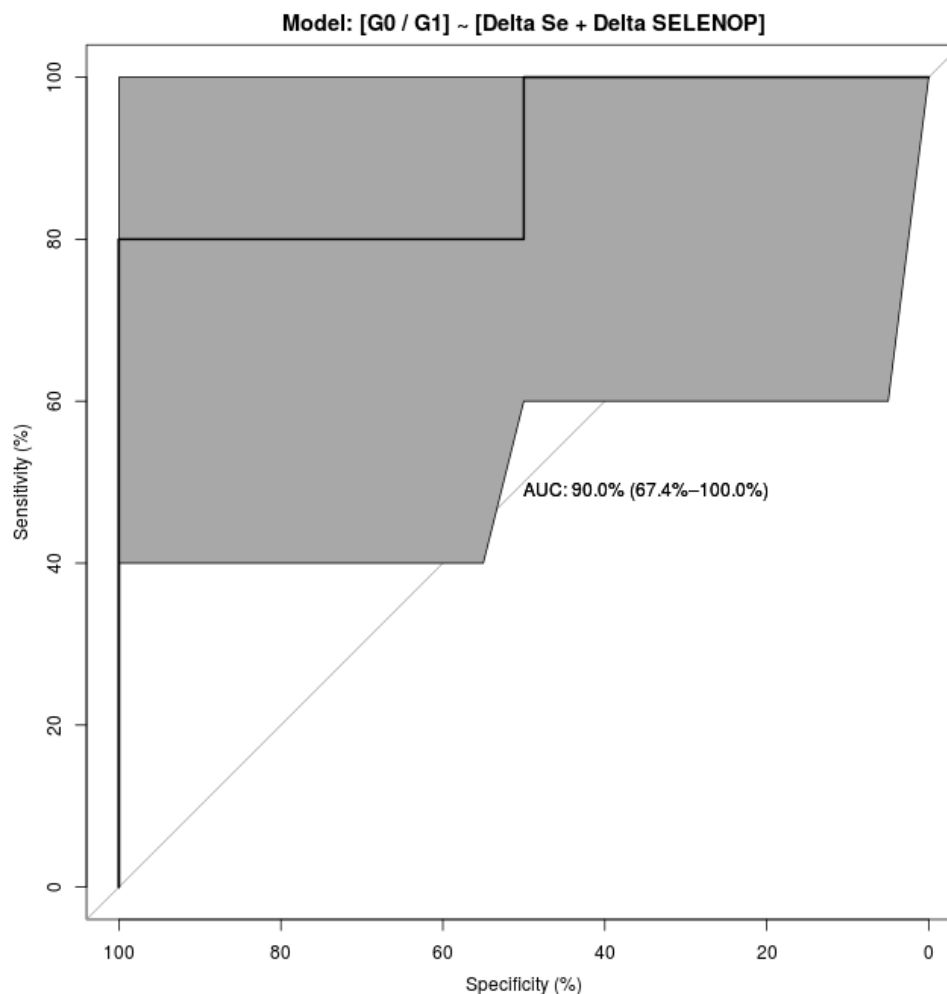


Abbildung 7. Multivariates Modell der Se-Parameter zur Vorhersage einer Remission der neurologischen Funktionen anhand der Änderungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme des Patienten. Darstellung des finalen multivariaten Modells mit den Parametern Δ Se und Δ SELENOP (Konzentrationsänderungen zwischen 0 und 24 Stunden) als ROC-Kurvenanalyse. Die Fläche unter der Kurve (AUC) entspricht einer Vorhersagegenauigkeit von 90 % (CI: 67,4 % – 100,0 %) für das Auftreten einer neurologischen Remission innerhalb des 3-monatigen Observationszeitraumes. Abgewandelt von Abbildung 6 aus Heller et. al [62].

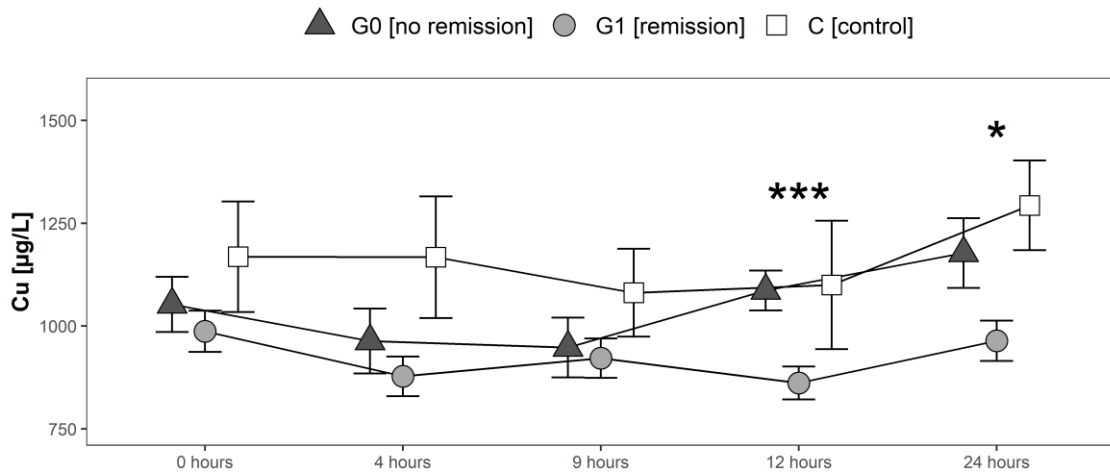
3.2 Bestimmung der Kupferbiomarker

3.2.1 Kupfer

Die Analysen der Cu-Gesamtkonzentrationen (Mittelwert \pm Standardabweichung) offenbarten zum Zeitpunkt 0 Stunden für die Remissionsgruppe G1 ($987,3 \pm 199,8$ μ g/L), Nicht-Remissionsgruppe G0 ($1052,7 \pm 276,1$ μ g/L) und Kontrollgruppe C ($1168,5 \pm 379,7$ μ g/L) ähnliche Konzentrationsniveaus (**Abbildung 8A**). In den Gruppen G0 und C stiegen die Konzentrationen innerhalb von 24 Stunden auf ein

Maximum an, während sie in der Gruppe G1 nahezu unverändert blieben. Die divergierenden Dynamiken resultierten in signifikant unterschiedlichen Cu-Gesamtkonzentrationen nach 12 Stunden ($p < 0,001$) sowie 24 Stunden ($p = 0,023$) (A). Innerhalb der Subgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cu-Konzentrationen von 0 Stunden und nach 24 Stunden detektiert (B).

A



B

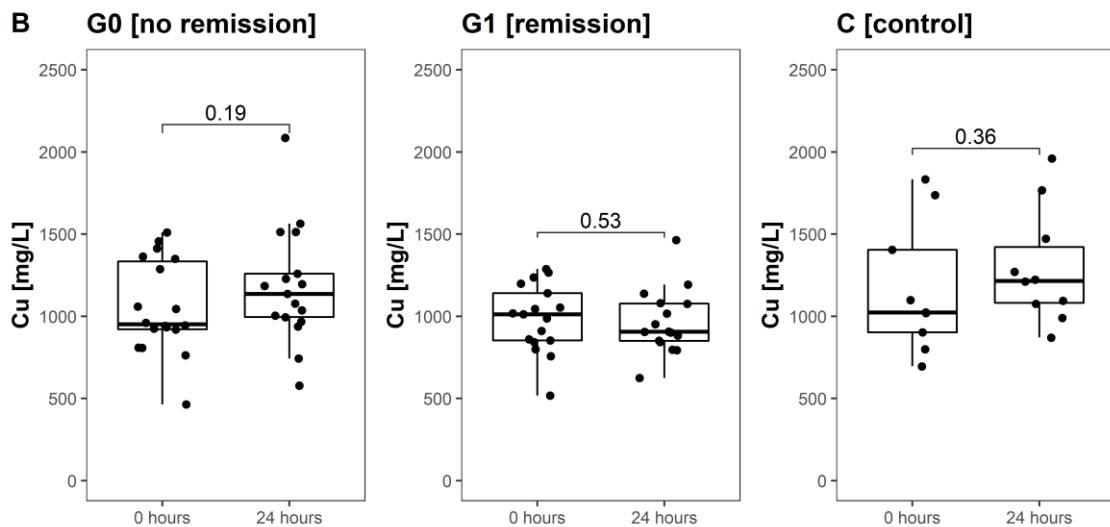


Abbildung 8. Darstellung der dynamischen Veränderungen der Cu-Konzentrationen. Die zeitaufgelöste Darstellung der Cu-Konzentrationen offenbart einen Anstieg in der Nicht-Remissionsgruppe G0 und der Kontrollgruppe C auf ein Maximum nach 24 Stunden, während die Cu-Konzentrationen in G1 nahezu unverändert blieben. Diese divergierenden Dynamiken resultierten in signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen nach 12 ($p < 0,001$) sowie 24 Stunden ($p = 0,023$) (A). Innerhalb der Subgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cu-Konzentrationen von 0 und nach 24 Stunden detektiert (B). Alle Daten sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ausgedrückt als $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). Abgewandelt aus Abbildung 4 von Seelig et. al [64].

3.2.2 Ceruloplasmin

Die CP-Analysen (Mittelwert \pm Standardabweichung) ergaben für die Remissionsgruppe G1 ($561,1 \pm 437,6$ mg/L) initial höhere Konzentration im Vergleich zur Gruppe G0 ($469,7 \pm 339,2$ mg/L) und der Kontrollgruppe C ($441,8 \pm 170,4$ mg/L) ($p > 0,05$) (**Abbildung 9A**). Durch einen schnellen Abfall in G1 erfolgte nach 4 Stunden der Angleich der Konzentrationsniveaus (A). Die Analyse der dynamischen Veränderungen nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt der Hospitalisierung ergab keine signifikanten Veränderungen zum Ausgangswert (B).

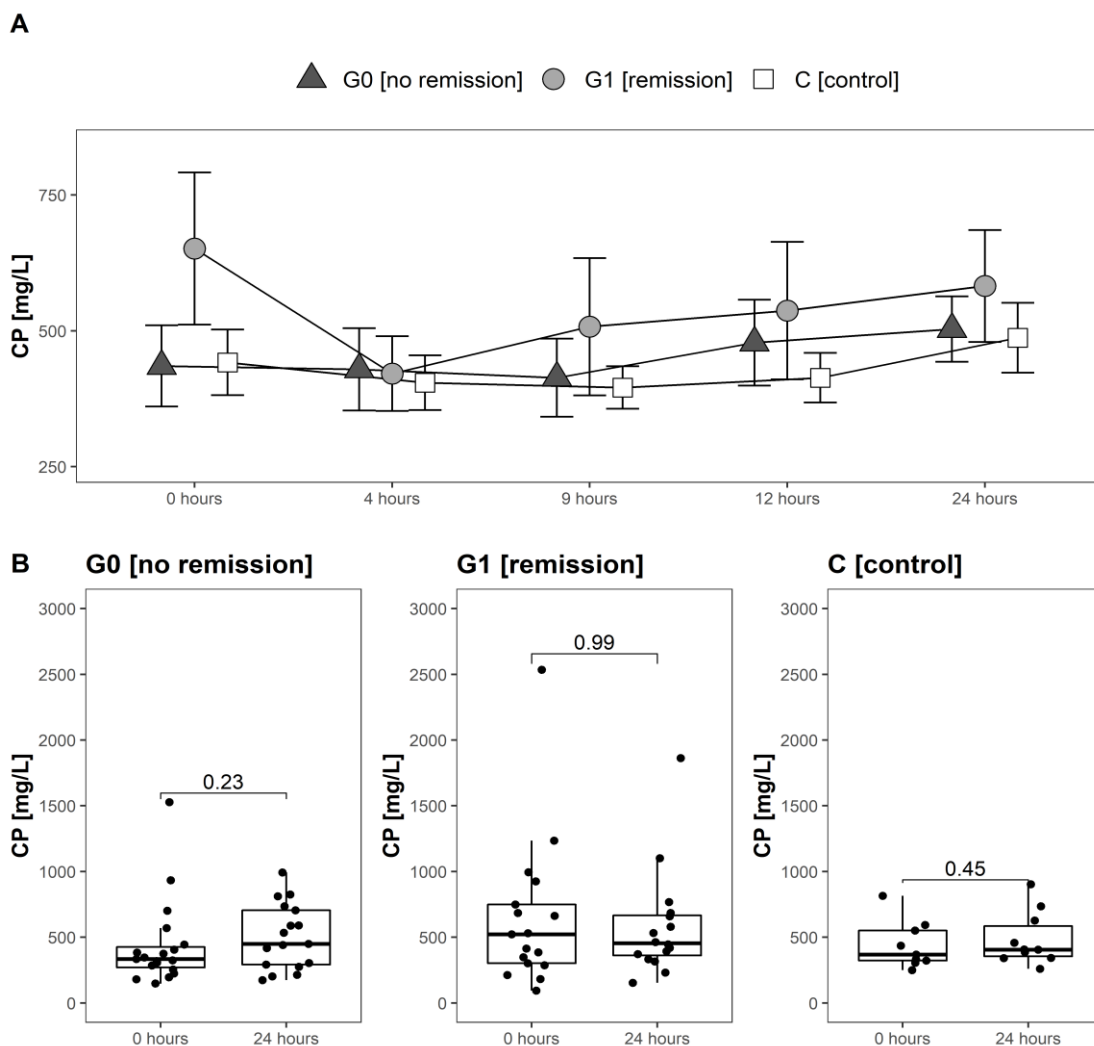


Abbildung 9. Darstellung der dynamischen Veränderungen der CP-Konzentrationen. Die zeitaufgelöste Darstellung der CP-Konzentrationen zeigte initial höhere Konzentrationen in der Remissionsgruppe G1 ($522,9$ mg/L) im Vergleich zur Nicht-Remissionsgruppe G0 ($334,4$ mg/L) und der Kontrollgruppe C auf. Nach einem schnellen Abfall nach 4h Stunden gleichen sich die Konzentrationen an und weisen in den Subgruppen einen ähnlichen Verlauf auf (A). Im Vergleich der 0 und 24 Stunden Konzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (B). Alle Daten sind als $MW \pm SD$ dargestellt. Abgewandelt von Abbildung 5 aus Seelig et. al [64].

3.2.3 Multivariates Vorhersagemodell aus Parametern des Cu- und Se-Status

Für das Erweiterungskollektiv wurden in identischer Vorgehensweise zur Se-Studie univariate und multivariate Modelle zur Vorhersage einer neurologischen Remission generiert. Das finale multivariate Modell beinhaltet die Konzentrationen für Cu und Se zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme (0 Stunden) und die Werte für CP und Se nach 24 Stunden. Die ROC-Kurve des finalen logistischen Regressionsmodells offenbart eine Vorhersagegenauigkeit (entspricht der AUC) von 87,7 % (CI: 75,1 %–100,0 %) für das Auftreten einer Remission der neurologischen Funktionen.

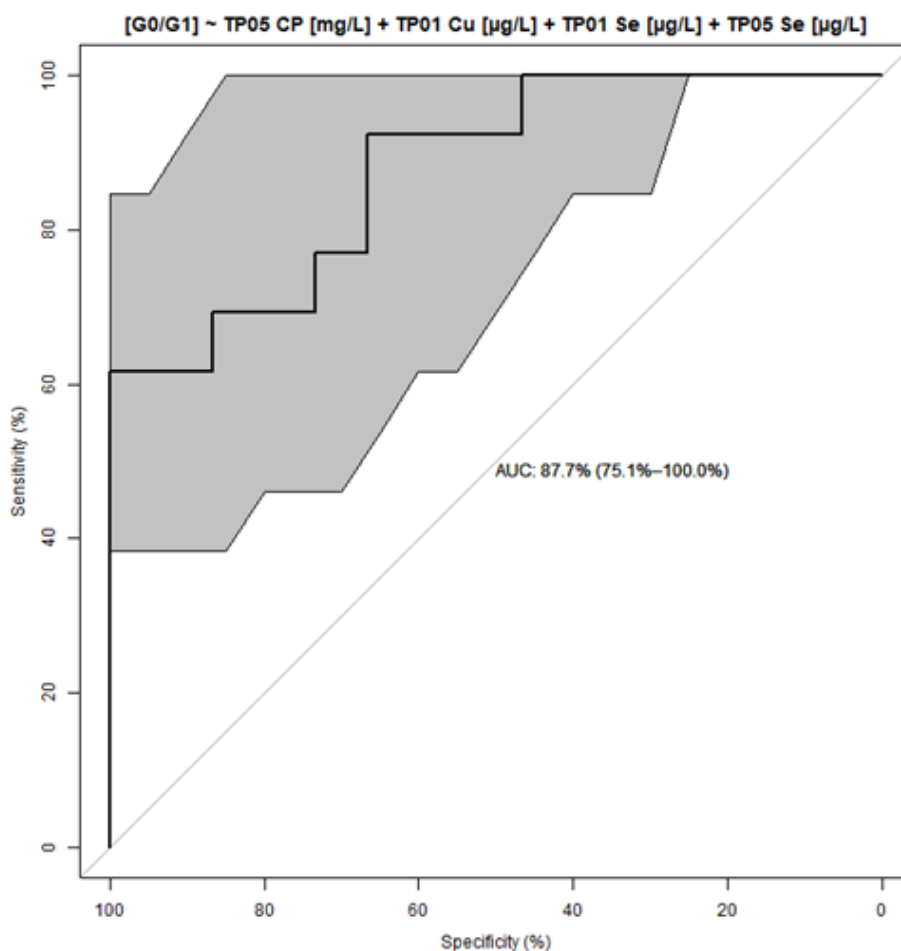


Abbildung 10. Multivariates Modell aus Parametern des Cu- und Se-Status zur Vorhersage einer neurologischen Remission. Darstellung des finalen multivariaten Modells mit den Parametern Se + Cu zum Zeitpunkt 0 Stunden und CP + SELENOP nach 24 Stunden als ROC- Kurvenanalyse. Die Fläche unter der Kurve (AUC) entspricht einer Vorhersagegenauigkeit von 87,7 % (CI: 75,1 % – 100,0 %) für das Auftreten einer neurologischen Remission innerhalb des 3-monatigen Observationszeitraumes. Abgewandelt von Abbildung 6 aus Seelig et. al [64].

3.3 Analyse der Konzentrationen des Selen-bindenden Proteins 1

3.3.1 Relation zur Ausprägung der neurologischen Funktionsstörungen und dem klinischen Outcome

In der zeitaufgelösten Analyse der SELENBP1-Konzentrationen (Mittelwert [95% Konfidenzintervall]) wies die Nicht-Remissionsgruppe G0 (32,1 µg/L [13.37, 50.78]), insbesondere zum Zeitpunkt der Hospitalisierung, höhere Konzentrationen als die Remissionsgruppe G1 (14,9 µg/L [11.12, 18.61]) auf (**Abbildung 11**). Die als gestrichelte Linie dargestellte Kontrollgruppe C lag im Mittel bei 16,2 µg/L. Innerhalb der ersten neun Stunden nahmen die erhöhten SELENBP1 Konzentrationen der Gruppe G0 stetig ab, während sie in der Gruppe G1 für den gesamten Beobachtungszeitraum auf konstant niedrigem Niveau blieben (B). AIS A klassifizierte Individuen, unabhängig davon, ob sie der Gruppe G0 und G1 angehörten, wiesen ebenfalls zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme und in den folgenden Stunden erhöhte SELENBP1-Konzentrationen im Vergleich zu Patient*innen mit teilweise erhaltenen neurologischen Funktionen (AIS B - D) auf (A). Dementsprechend ergaben die Analysen der SELENBP1-Dynamiken (0 h, 4 h, 9 h vs. 12 h, 24 h, 72 h) signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Gruppen G0 und G1 ($p = 0,019$) als auch zwischen den Gruppen AIS A und AIS B - D ($p = 0,011$) (C+D). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde ein optimaler Grenzwert (30,2 µg/L) berechnet, welcher mit einer Sensitivität von 98,7 %, einer Spezifität von 12,3 % und einer Genauigkeit von 58,6 % eine Zuordnung der Patient*innen in die Gruppe G0 oder G1 erlaubte. Bei Überschreiten des Grenzwerts lag das Quotenverhältnis (Odds Ratio) bei 10,4 für das Ausbleiben einer neurologischen Funktionsverbesserung. Die durchgezogene Linie in den Abbildungen entspricht diesem berechneten, diagnostischen Grenzwert.

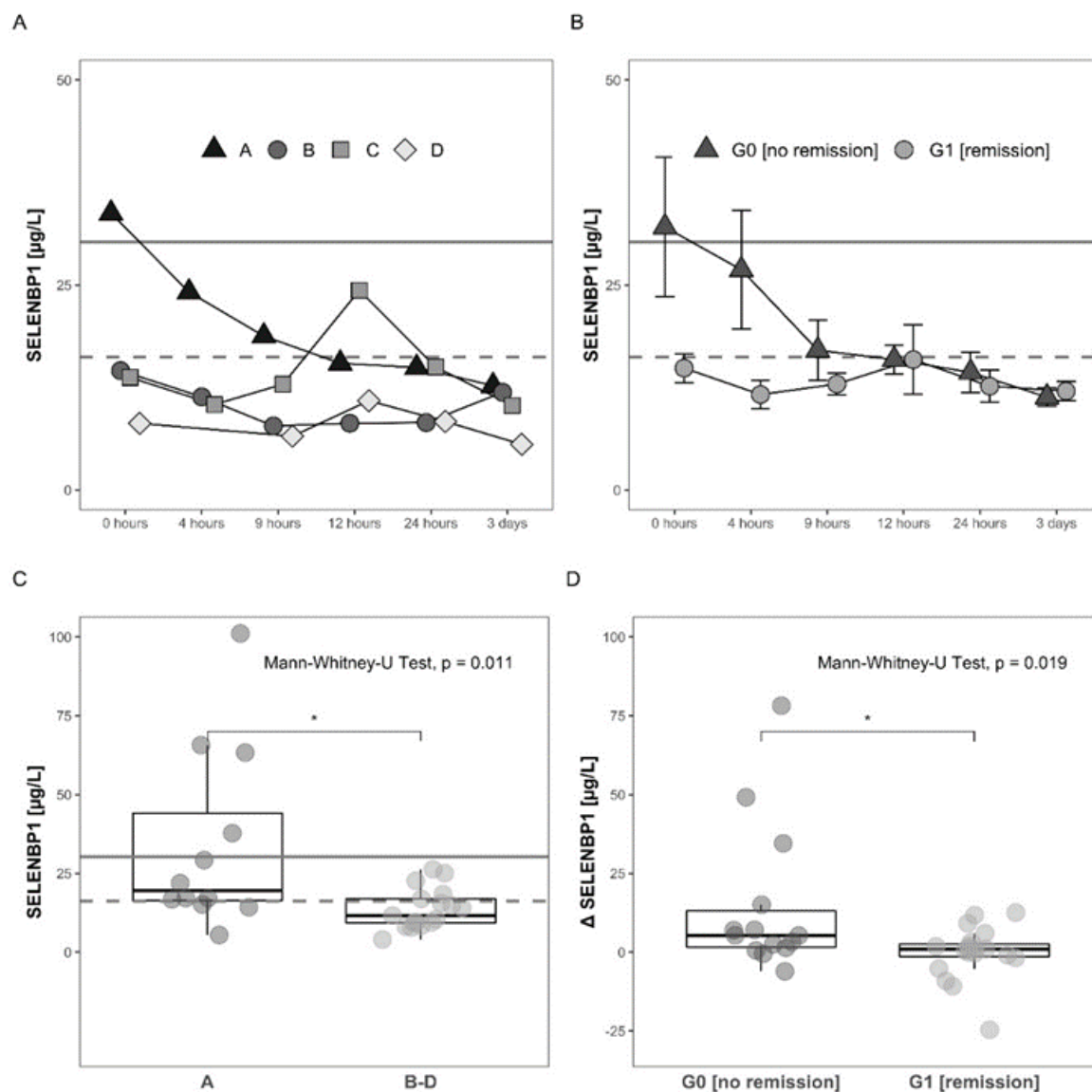


Abbildung 11. Konzentrationen des Selen-bindenden Proteins 1 in Relation zum klinischen Outcome und dem Ausmaß der neurologischen Funktionsdefizite. Die Veränderungen der SELENBP1-Konzentrationen sind für die Remissionsgruppe G1, Nicht-Remissionsgruppe G0, sowie den Subgruppen AIS A (schwerste neurologische Einschränkungen) und AIS B-D (teilweise erhaltene Funktionen) als zeitaufgelöstes Liniendiagramm dargestellt (A, B). Die Unterschiede der Dynamiken zwischen den Gruppen wurden durch den Vergleich der Zeitpunkte 0 h, 4 h, 9 h vs. 12 h, 24 h, 72 h analysiert (C, D). Der berechnete Grenzwert (30,2 $\mu\text{g/L}$) für SELENBP1 als diagnostisches Instrument zur Einschätzung des Remissionspotentials ist als durchgezogene Linie dargestellt. Die Daten sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. Statistische Signifikanz wurde definiert als $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). Modifizierte Abbildung 4 aus Seelig et. al [63].

3.3.2 Analysen der Zytokine, Matrix-Metalloproteinasen und Interleukine

Die Resultate der Serumanalysen der Zytokine CCL-2, CCL-3, CCL-4, Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-8 sowie der Interleukine 8 und 10 Konzentrationen sind in der **Abbildung 12** in Bezug auf das klinische Outcome und das Ausmaß der initialen neurologischen Defizite (als AIS-Klassifikation) dargestellt. Zusätzlich wurden die Spurenelemente Se, Cu, Zn und die assoziierten Proteine SELENOP, SELENBP1 und CP in die Grafik aufgenommen. Durch statistische Standardisierung wurde für jede Variable ein vergleichbarer Z-Wert ermittelt und anschließend anhand einer Heatmap orientierend zusammengetragen. Die gestufte Farbcodierung zeigt die relativen Konzentrationsunterschiede der einzelnen Serumparameter zwischen den Gruppen G0 (keine Remission) und G1 (Remission) und für die AIS-Klassifikationsstufen an.

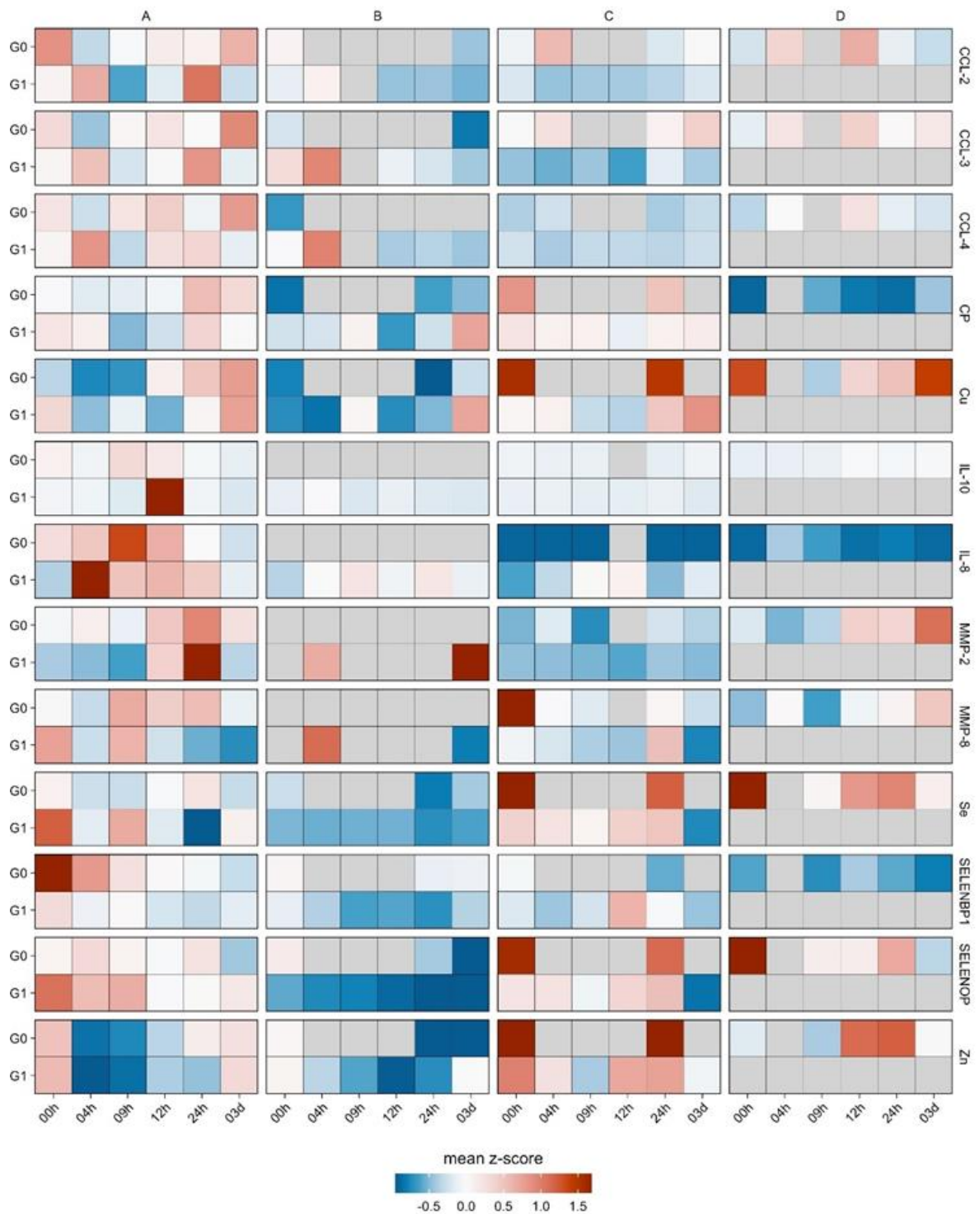


Abbildung 12. Heatmap zum Vergleich von Zytokinen, Matrix-Metalloproteinasen, Interleukinen, Spurenelementen und derer assoziierter Proteine. Die Zytokine CCL-2, CCL-3, CCL-4, die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-8, Interleukine 2 und 8, Spurenelemente Cu, Se und Zn und die assoziierten Proteine CP, SELENOP und SELENBP1 wurden nach z-Standardisierung in Bezug auf eine Remission (G1) oder nicht-Remission (G0) analysiert. Zusätzlich erfolgte die Darstellung im Hinblick auf das Ausmaß der initial festgestellten neurologischen Defizite in Form der entsprechenden AIS A-D. Die mittleren z-Werte geben als abgestufte Farbkodierung die relativen Konzentrationsunterschiede der Parameter zwischen den Gruppen an. Graue Felder implizieren fehlende Daten. Abgewandelt aus Abbildung 3 von Seelig et. al von 2021 [63].

3.3.3 Explorative Korrelationsanalysen

Um potenzielle statistische Zusammenhänge zwischen den Konzentrationsdynamiken des SELENBP1 zu Zytokinen, Matrix-Metalloproteinasen, Interleukinen oder Spurenelementen zu detektieren wurde eine explorative Korrelationsanalyse durchgeführt. Die dabei als signifikant identifizierten Korrelationen und die Analysen zu den Parametern des Se-Status wurden in der **Abbildung 13** dargelegt. Für das Gesamtkollektiv (G1 + G0) wurden zwischen den SELENBP1 Konzentrationen zum Se ($R = -0,012$) sowie zum SELENOP ($R = 0,110$) keine signifikanten Korrelationen detektiert. In Relation zum klinischen Outcome ließen sich jedoch gegensätzliche Tendenzen feststellen. Für die Remissionsgruppe G1 ergab sich im Gegensatz zur Gruppe G0 eine signifikante Korrelation zwischen den SELENOP und SELENBP1 Konzentrationen ($p < 0,001$) (A, B). Die Gesamtserumkonzentrationen des Se und SELENOP wiesen dahingegen für beide Gruppen eine starke lineare Wechselbeziehung auf ($R = 0,76$, $p < 0,001$) (C). In Relation zu den dynamischen Veränderungen der SELENBP1-Konzentrationen (Δ SELENBP1; 72 h – 0 h) konnten signifikante Korrelationen zu CCL-2 für den Zeitpunkt 0 h ($p = 0,007$), zu Zn nach 9 h ($p = 0,027$) und zu CCL-3 nach 72 h ($p = 0,014$) identifiziert werden. In der Betrachtung der Subgruppen ergaben sich dabei die stärkeren statistischen Zusammenhänge zu CCL-2 ($R = 0,66$, $p = 0,024$) und Zn ($R = -0,71$, $p = 0,028$) für die Gruppe G0 (D- F).

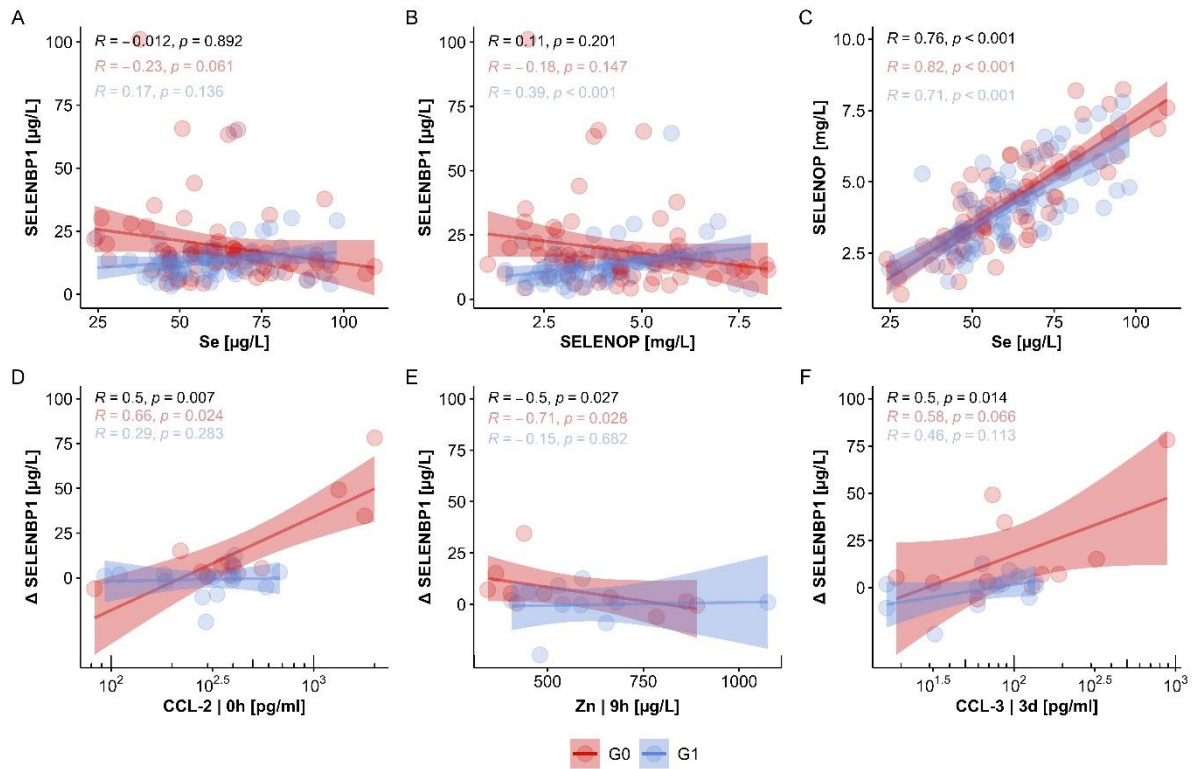


Abbildung 13. Korrelationsanalysen zwischen zirkulierenden SELENBP1-Konzentrationen zu etablierten Biomarkern des Se-Status und potenziellen Kovariablen bei TSCI. Für die Gesamtkonzentrationen des Se (A) und des SELENOP (B) konnten keine signifikanten Korrelationen zu den SELENBP1 Konzentrationen bestimmt werden. Für die Parameter Se und SELENOP bestand eine enge lineare Wechselbeziehung (C). CCL-2, Zn und CCL-3 präsentierten signifikante Korrelationen zu den dynamischen Veränderungen der SELENBP1-Konzentrationen (Δ SELENBP1; 72 h – 0 h) (D-F). Die Ergebnisse für das Gesamtkollektiv (Gruppe G0 + G1) sind in schwarz und für die beiden Subgruppen G0 in rot und G1 in blau dargelegt. R gibt den Korrelationskoeffizienten nach Pearson an. Modifiziert aus Abbildung 6 von Seelig et. al [63].

4 Diskussion

Die Analysen der Spurenelemente Se, Cu und derer assoziierter Biomarker SELENOP, SELENBP1 und CP in den Serumproben von Patient*innen nach traumatischen Rückenmarksverletzungen offenbarten signifikant divergierende Veränderungen der peripheren Konzentrationsdynamiken zwischen den Studiengruppen G1 (Remission) und G0 (keine Remission). In Abhängigkeit von den frühen Konzentrationsänderungen und der bioaktiven Verfügbarkeit dieser Parameter konnten entweder vorteilhafte oder nachteilige Assoziationen zum klinischen Outcome nach 3 Monaten sowie der initialen Verletzungsschwere identifiziert werden.

4.1 Spurenelemente als prognostische Instrumente für das Remissionspotenzial

Die divergierenden Dynamiken der Spurenelemente zwischen den Patient*innen mit einer Verbesserung der neurologischen Funktionen (Gruppe G1) und den Proband*innen ohne eine Erholung der sensorischen und oder motorischen Qualitäten (Gruppe G0) waren vor allem durch die signifikante Abnahme der zirkulierenden Biomarker-Konzentrationen in der Gruppe G1, im Gegensatz zu nahezu stabil verbleibenden Konzentrationen in der Gruppe G0, gekennzeichnet. Die Assoziationen der frühen abfallenden peripheren Konzentrationen mit einem besseren klinischen Outcome nach 3 Monaten eröffnen die Frage, ob diesen Beobachtungen potenziell vorteilhafte Umverteilungsmechanismen zum Ort des Verletzungsgeschehens zugrunde liegen könnten. Für diese Annahme sprechen die Erkenntnisse aus vorangegangenen tierexperimentellen Studien zu den begünstigenden Effekten des Se und Cu auf die Regenerationsprozesse geschädigten neuronalen Gewebes [13].

In Untersuchungen zu akut induzierten Rückenmarksverletzungen und Hirnschädigungen an Nagetieren wurden verschiedene Se-abhängige Mechanismen zum Schutz des gefährdeten neuronalen Gewebes detektiert. Besonders substanziiell erscheint dabei die Protektion vor reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), die Vorbeugung von Lipidperoxidationen und die Suppression der Ferroptose, einer nicht-apoptotischen Form des Zelltods [69; 70]. Als Reaktion kann auf zellulärer Ebene dafür unter anderem die Hochregulierung anti-apoptotischer und anti-degenerativer

Faktoren wie des ziliaren neurotrophen Faktors (CNTF) und seines Rezeptors (CNTFR-alpha) beobachtet werden [59]. Als weiterer Regulierungsmechanismus wird eine Steigerung der Expression von Selenoproteinen wie der GPx4 und des SELENOP beschrieben [56]. Tiere, welche dazu nicht in der Lage sind, weisen im Verlauf einen konsekutiv erhöhten Verlust neuronalen Gewebes auf [71].

Für Cu und CP deuten die vorhandenen Daten aus der Literatur ebenfalls auf eine wesentliche Rolle im Schutz des Nervengewebes vor zerstörenden Einflüssen hin. Die von Leslie M. Klevay aufgestellte „Kupfer-Mangel-Hypothese“ beschreibt die absolute Notwendigkeit suffizient verfügbarer Kupferkonzentrationen für die erfolgreiche Reparatur neuronalen Gewebes. Ein unzureichender Cu-Haushalt mache es unmöglich, Myelin und andere, die Neuronen umgebende, Strukturen zu synthetisieren und führe schlussendlich zu einem zellulären Untergang [72]. Darüber hinaus übernehmen die bioaktiven Cu-Proteine wesentliche Funktionen in der antioxidativen Abwehr. Die Cu- / Zn- abhängige Superoxiddismutase (SOD1) wird unter anderem als maßgeblich in der Abwehr von nach traumatischen Hirnverletzungen entstehenden ROS beschrieben [57]. In Maus-Modellen kann eine CP-abhängige "Eisen homöostatische Reaktion" beobachtet werden. Mit der Zunahme freier Radikale steigen gleichermaßen die lokalen CP-Konzentrationen, um dem zunehmenden eisenvermittelten oxidativen Stress entgegenzuwirken. Tiere mit unzureichenden CP-Konzentrationsanstiegen entwickeln signifikant größere Verluste von Motoneuronen und verzeichnen eine beeinträchtigte Erholung der neurologischen Funktionen [58]. Für eine Rekrutierung peripherer Cu-Konzentrationen zum Verletzungsort sprechen dabei die erhöhten Expressionen Cu-abhängiger Proteine durch eingewanderte Leukozyten sowie aktivierte Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten [73].

Insgesamt scheint aufgrund der pathophysiologischen Prozesse nach TSCI ein erhöhter Bedarf an Spurenelementen, in Form ihrer bioaktiven Proteine, am Ort des Verletzungsgeschehens zu entstehen. Eine Verschiebung zirkulierender Konzentrationen dieser Elemente könnte daher einen begünstigenden Einfluss auf den Regenerationserfolg haben. Da diese explorative Arbeit von einem rein beobachtenden Charakter geprägt war, konnten retrospektiv keine Kausalzusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Konzentrationsdynamiken und deren Assoziationen zum klinischen Outcome dargelegt werden. Dennoch offenbarten die Detektionen der Spurenelementdynamiken innerhalb der ersten 24

Stunden einen vielversprechenden Ansatz für die Abschätzung des individuellen Remissionspotenzials der Patient*innen nach TSCI. Mit einer Vorhersagesicherheit von etwa 90 % für die Se-Parameter und etwa 87,7 % für die Kombination von Se und Cu Variablen konnten die Individuen mit einer erhöhten Chance für eine Verbesserung der neurologischen Funktionen innerhalb der ersten 24 Stunden identifiziert werden.

Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zur aktuellen klinischen Realität. Eine belastbare Aussage über das Ausmaß verbleibender neurologischer Defizite kann durch die rein klinische Verlaufsbeurteilung oftmals erst nach Wochen bis Monaten getroffen werden. Unsere vorgeschlagenen Modelle könnten, nach zuvor erfolgten weiteren Studien und Validierungsprozessen, ein supportives Instrument für die Kliniker*innen in der Beurteilung der Patient*innen darstellen. Anhand von zwei Blutentnahmen, zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme und nach 24 Stunden, könnten aus weniger als 20 μ L Serum die relevanten Parameter bestimmt und innerhalb weniger Stunden erste Hinweise über das individuelle Remissionspotential der Patient*innen identifiziert werden. Dieser frühe Informationsgewinn könnte zukünftig Entscheidungen über zusätzliche bzw. alternative Therapieoptionen unterstützen oder als Parameter zur Validierung neuerlicher Therapiekonzepte fungieren. Darüber hinaus könnte die frühzeitige Perspektive eines erhöhten Remissionspotenzials auch für die betroffenen Individuen im Hinblick auf Compliance, Motivation und die Resilienz von großer Bedeutung sein.

4.2 SELENBP1 als Biomarker für hypoxischen Zelluntergang nach TSCI

Die Quantifizierung des neuronalen Schadens und die Klassifikation der resultierenden neurologischen Funktionsausfälle nach traumatischen Rückenmarksverletzungen erfolgt im klinischen Alltag mithilfe bildgebender Maßnahmen und etablierter klinischer Untersuchungsalgorithmen [8]. Die verfügbaren Instrumente zur Abschätzung des Schädigungsausmaßes, die Vorhersagemöglichkeiten klinischer Verläufe und die Zuverlässigkeit der Diagnose hängen jedoch maßgeblich von der Erfahrung und dem Wissen der Untersucher*innen und der Kooperationsbereitschaft der Patient*innen ab. Belastbare objektive Marker zur Quantifizierung des Gewebes Schadens konnten noch nicht identifiziert werden [74].

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Analysen zirkulierender SELENBP1-Konzentrationen ein zusätzliches Instrument zur klinischen Erstbeurteilung von Individuen nach traumatischen Rückenmarksverletzungen darstellen könnte. Die Untersuchungen der Serumproben ergaben signifikante Konzentrationsunterschiede, sowohl in Bezug auf das Ausmaß der initialen neurologischen Beeinträchtigungen (Subgruppe AIS A vs. AIS B - D) als auch in Relation zum klinischen Outcome nach 3 Monaten (Remission vs. Keine Remission). Die Patient*innen, welche in der initialen klinischen Untersuchung die schwerwiegendsten neurologischen Funktionseinschränkungen aufwiesen (AIS A klassifiziert), offenbarten in den Serumanalysen die höchsten SELENBP1-Konzentrationen. Überschritten die Konzentrationen dabei Werte von über 30,2 µg/L, konnte für keines der betroffenen Individuen eine Verbesserung der neurologischen Funktionen nach drei Monaten beobachtet werden. Die Verwendung dieses Grenzwertes erlaubte in der retrospektiven Analyse eine Vorhersage des individuellen Remissionspotenzials mit einer Sensitivität von 98,7 % und ergab einen Odds Ratio von 10,4 für das Ausbleiben einer neurologischen Funktionsverbesserung. Die Beobachtungen dieser engen Assoziation zwischen erhöhten zirkulierenden SELENBP1-Konzentrationen und den gravierendsten Verläufen nach TSCI drängt die Frage auf, ob dieses Protein möglicherweise einen Surrogat-Marker eines frühen, ausgeprägten hypoxischen Zelluntergangs am Ort des Verletzungsgeschehens darstellen könnte.

Diese Annahme wird durch Erkenntnisse vorangegangener Studien unterstützt. Im Kontext maligner Lebererkrankungen wird für das ubiquitär vorkommende Protein auf zellulärer Ebene unter anderem eine starke Beeinflussung des Expressionsverhaltens durch Hypoxie induzierte Faktoren beschrieben [75]. In tierexperimentellen Studien zu chemisch induzierten Nierenschädigungen erfolgt eine Hochregulierung der SELENBP1-Konzentrationen im Gewebe und eine konsekutiv erhöhte Ausscheidung des Proteins im Urin, in direkter Abhängigkeit von der Dosis der applizierten schädigenden Substanzen [76]. Im Rahmen von Untersuchungen zu den Auswirkungen ischämischer Zustände auf kardiales Gewebe wurden sowohl in Abhängigkeit von der Dauer der hypoxischen Verhältnisse als auch in Relation zum resultierenden zellulären Verlust signifikante Assoziationen zu den im Blut aufkommenden SELENBP1 Konzentrationen festgestellt [47; 48]. Ebenso scheinen die durchgeführten Korrelationsanalysen zu den peripheren CCI-2 Konzentrationen ($R = 0,66$) die Hypothese zusätzlich zu stützen. Das in neuronalen Geweben exprimierte

Zytokin wird durch Hypoxie induzierte Faktoren, wie HIF-1alpha, hochreguliert und führt zu einer entzündungsfördernden Migration, Differenzierung und Proliferation von Monozyten [77]. Frühere Studien zur Analyse peripherer Konzentrationen dieses Zytokins im Kontext des klinischen Outcomes nach traumatischen Rückenmarksverletzungen beschreiben eine ungünstige Prognose für Patient*innen, bei denen initial erhöhte Konzentrationen detektierbar sind [78].

Diesen Ergebnissen und den Erkenntnissen aus der Literatur folgend wäre es hochinteressant zu untersuchen, ob die im Serum nachgewiesenen SELENBP1-Konzentrationen mit einem erniedrigten lokalen Sauerstoffgehalt bzw. reduzierten Perfusionsdrücken zusammenhängen. In künftigen Studien könnten anhand von Überwachungstechniken wie der Nahinfrarotspektroskopie, intraspinalen Drucksonden und Perfusionsmessungen dezidierte Einsichten über Zusammenhänge lokaler Oxygenierungszustände des Gewebes, intraspinalen Druckverhältnissen, hämodynamischer Parameter zu den zirkulierenden Konzentrationen dieses Proteins gewonnen werden [79; 80; 81]. Darüber hinaus könnten SELENBP1-Bestimmungen aus dem Liquor sowie lokale Gewebeproben tiefere Einblicke gewähren. In Kombination zu den Überwachungsmethoden des intraspinalen und Rückenmarkperfusionendrucks sowie der Bestimmung lokaler Stoffwechselferhältnisse durch eine Oberflächen-Mikrodialyse könnte eine zusätzliche Überwachung der SELENBP1 Konzentrationen weitere Einblicke in die individuelle hypoxische Gesamtbelastungssituation auf zellulärer Ebene geben und so einen weiteren Schritt zu einer detaillierten, individualisierten klinischen Bewertungs- und Therapiestrategie nach TSCI darstellen [82].

4.3 SELENBP1 – kein Parameter des Se-Status bei Patient*innen nach TSCI

SELENBP1 wird in der Literatur als ein dem Spurenelement Se assoziiertes Protein beschrieben, dessen genaue Interaktionen noch nicht abschließend geklärt werden konnten [42]. In Zusammenschau der Se-Analysen bei TSCI lag deshalb die Annahme nah, dass die SELENBP1 Konzentrationen ein weiterer Marker, der sich verändernden Se-Homöostase darstellen könnte. Unsere Analysen ergeben jedoch keine signifikanten Wechselbeziehungen zwischen den SELENBP1-Konzentrationen und den Gesamtkonzentrationen des Se ($R = -0,012$, $p = 0,892$) und des SELENOP

($R = 0,110$, $p = 0,201$). Im Gegensatz dazu wiesen die etablierten Biomarker des Se-Status (Se und SELENOP) die erwartete enge Korrelation ($R = 0,76$, $p < 0,001$) auf. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass keine Dysregulationen oder Umverteilungen innerhalb der Parameter des Se-Status den SELENBP1-Dynamiken zugrunde liegen, sondern im direkten Zusammenhang zum Ausmaß des zellulären Untergangs stehen.

4.4 Supplementierung als möglicher adjuvanter Therapieansatz

Die engen Assoziationen der oben beschriebenen Spurenelementdynamiken mit dem günstigeren klinischen Outcome der Remissionsgruppe G1 nach 3 Monaten wirft die Frage auf, ob das klinische Outcome der Patient*innen durch eine Supplementierung zusätzlich positiv beeinflusst werden könnte. In den Fokus dieser Fragestellung rückt dabei vor allem das Selen. Denn in den Analysen des Studienkollektivs wurden sowohl in der Remissionsgruppe G1 als auch in der Nicht-Remissionsgruppe G0 unzureichende Se-Status detektiert, wobei die Defizite in der Gruppe G0 stärker ausgeprägt waren als in der Gruppe G1 (G1 vs. G0; $71,9 \mu\text{g/L}$ vs. $58,5 \mu\text{g/L}$). Ein ausreichender Versorgungszustand ist unabdingbar für eine suffiziente Synthese der bioaktiven Selenoproteine und in Zuständen erhöhten Bedarfs umso entscheidender. Die positiven Effekte einer Se-Supplementierung auf das klinische Outcome konnte bereits in einer zuvor durchgeführten tierexperimentellen Studie zu hämorrhagischen Hirnschädigungen nachgewiesen werden. Schon eine einmalige Zufuhr hirndurchdringender Selenopeptide hat in der Studie zu einer erhöhten Expression von Selenoproteinen, einer effektiven Hemmung ferroptotischer Mechanismen und damit einen wirksamen Schutz vor Zellschädigungen und folglich zu einem besseren klinischen Outcome bei den Versuchstieren geführt [83]. Aufgrund der nahezu kongruenten sekundären Verletzungsmechanismen könnten diese positiven Effekte auch auf traumatische Rückenmarksverletzungen zutreffen und sollten in weiteren Studien überprüft werden. Beim Menschen haben Se-Supplementierung vor allem bei kritisch kranken Patient*innen im Rahmen septischer oder kardiovaskulärer Erkrankungen Anwendung gefunden [84; 85]. Die Ergebnisse aus diesen Arbeiten könnten als Blaupause für Dosierungen und Applikationsschemata zukünftiger Studien dienen.

4.5 Schwächen der Arbeit

Zu den Schwächen dieser Arbeit gehört die geringe Fallzahl, welche in Anbetracht der Komplexität und Seltenheit des Auftretens traumatischer Rückenmarksverletzungen jedoch zu einem der größeren humanen Studienkollektiven zählt. Um den Herausforderungen der geringen Fallzahl begegnen zu können und die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, konnte unter der Adaptierung des Beobachtungszeitraumes und des Verzichts statistischer Matching-Methoden in den aufbauenden Arbeiten die Größe des Kollektivs erhöht werden. Diese Herangehensweise hat zu einem heterogeneren Kollektiv mit teilweise statistisch unterschiedlichen Patient*innencharakteristika innerhalb der Studiengruppen geführt. Trotz der Berücksichtigung in der statistischen Analyse könnten diese Divergenzen einen Einfluss auf die Ergebnisse der Arbeiten gehabt haben. Darüber hinaus können aufgrund des explorativen und beobachtenden Charakters keine Kausalzusammenhänge zwischen den detektierten peripheren Konzentrationsdynamiken der Spurenelement-Biomarker und deren Assoziationen zum klinischen Outcome dargelegt werden. Es sind weitere Studien notwendig, um die peripheren Konzentrationsänderungen der Spurenelemente mit den Veränderungen auf zellulärer Ebene oder innerhalb anderer Kompartimente wie dem Liquor ins Verhältnis zu setzen.

5 Zusammenfassung

Die explorative Arbeit zur Analyse von Spurenelementen und derer assoziierter Biomarker bei Patient*innen nach traumatischen Rückenmarksschädigungen liefert neue Einblicke in die Auswirkungen der primären und sekundären pathophysiologischen Verletzungsmechanismen auf die Homöostase der Mikroelemente. In Abhängigkeit vom klinischen Outcome ergaben sich divergierende Veränderungen peripherer Konzentrationen für Se, Cu, SELENOP und CP zwischen den Studiengruppen G1 (Remission) und G0 (keine Remission). Innerhalb der ersten 24 Stunden abfallende Konzentrationsdynamiken waren mit einem positiven klinischen Outcome, einer Remission der neurologischen Funktionen nach drei Monaten assoziiert. Durch die Analysen der Spurenelementdynamiken konnten multivariate Vorhersagemodelle generiert werden und eine frühe Einschätzung des individuellen Remissionspotentials erfolgen. SELENBP1 hat sich in den Analysen als ein von den restlichen Biomarkern des Se-Status unabhängiger Parameter dargestellt. Initial erhöhte SELENBP1-Konzentrationen waren mit den schwerwiegendsten neurologischen Funktionseinschränkungen (AIS A klassifizierte Patient*innen) als auch mit dem Ausbleiben einer neurologischen Remission assoziiert. Periphere SELENBP1-Konzentrationen könnten somit einen Surrogat-Marker für die individuelle hypoxische Gesamtbelastungssituation der Patient*innen auf zellulärer Ebene darstellen.

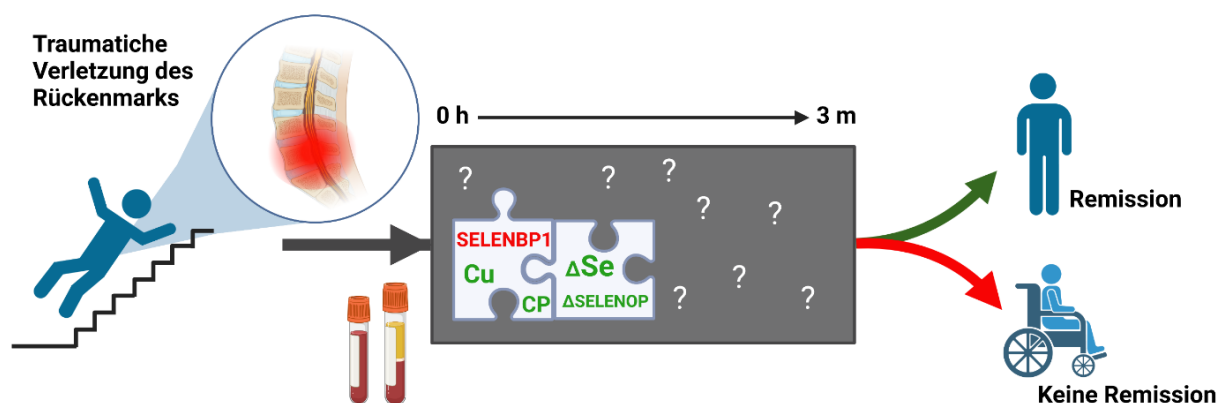


Abbildung 14. Simplifizierte Zusammenfassung der Studienergebnisse. Die Analysen der Spurenelementkonzentrationen offenbarten divergierende Dynamiken zwischen der Studiengruppe G1 (Remission) und der Gruppe G0 (keine Remission). Abfallende Selen (Se), Kupfer (Cu), Selenoprotein P (SELENOP) und Ceruloplasmin (CP) Konzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden waren mit einem vorteilhaften klinischen Outcome nach 3 Monaten assoziiert (grün). Initial erhöhte SELENBP1- Konzentrationen standen mit schwerwiegenden neurologischen Defiziten sowie einem nachteiligen klinischen Outcome nach 3 Monaten im Zusammenhang (rot). Abkürzungen: h, Stunden; m, Monate.

Literaturverzeichnis

- [1] O. Bican, A. Minagar, and A.A. Pruitt, The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin* 31 (2013) 1-18.
- [2] G. Scivoletto, M. Miscusi, S. Forcato, L. Ricciardi, M. Serrao, R. Bellitti, and A. Raco, The Rehabilitation of Spinal Cord Injury Patients in Europe. *Acta Neurochir Suppl* 124 (2017) 203-210.
- [3] C.S. Ahuja, S. Nori, L. Tetreault, J. Wilson, B. Kwon, J. Harrop, D. Choi, and M.G. Fehlings, Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery* 80 (2017) S9-S22.
- [4] L.D. Hachem, C.S. Ahuja, and M.G. Fehlings, Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *J Spinal Cord Med* 40 (2017) 665-675.
- [5] K. Nas, L. Yazmalar, V. Sah, A. Aydin, and K. Ones, Rehabilitation of spinal cord injuries. *World J Orthop* 6 (2015) 8-16.
- [6] G. Savic, M.J. DeVivo, H.L. Frankel, M.A. Jamous, B.M. Soni, and S. Charlifue, Suicide and traumatic spinal cord injury-a cohort study. *Spinal Cord* 56 (2018) 2-6.
- [7] D.S. Tulskey, P.A. Kisala, D. Victorson, D.G. Tate, A.W. Heinemann, S. Charlifue, S.C. Kirshblum, D. Fyffe, R. Gershon, A.M. Spungen, C.H. Bombardier, T.A. Dyson-Hudson, D. Amtmann, C.Z. Kalpakjian, S.W. Choi, A.M. Jette, M. Forchheimer, and D. Cella, Overview of the Spinal Cord Injury--Quality of Life (SCI-QOL) measurement system. *J Spinal Cord Med* 38 (2015) 257-69.
- [8] C. Rouanet, D. Reges, E. Rocha, V. Gagliardi, and G.S. Silva, Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arq Neuropsiquiatr* 75 (2017) 387-393.
- [9] A.A. Rabinstein, Traumatic Spinal Cord Injury. *Continuum (Minneapolis)* 24 (2018) 551-566.
- [10] M. Yousefifard, S. Nasser Maleki, S. Askarian-Amiri, A.R. Vaccaro, J.R. Chapman, M.G. Fehlings, M. Hosseini, and V. Rahimi-Movaghar, A combination of mesenchymal stem cells and scaffolds promotes motor functional recovery in spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Spine* 32 (2019) 269-284.
- [11] Q. Chen, Z. Zhao, G. Yin, C. Yang, D. Wang, Z. Feng, and N. Ta, Identification and analysis of spinal cord injury subtypes using weighted gene co-expression network analysis. *Ann Transl Med* 9 (2021) 466.
- [12] R. Rodriguez-Barrera, M. Rivas-Gonzalez, J. Garcia-Sanchez, D. Mojica-Torres, and A. Ibarra, Neurogenesis after Spinal Cord Injury: State of the Art. *Cells* 10 (2021).
- [13] A. Alizadeh, S.M. Dyck, and S. Karimi-Abdolrezaee, Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol* 10 (2019) 282.
- [14] I.A. Ruiz, J.W. Squair, A.A. Phillips, C.D. Lukac, D. Huang, P. Oxciانو, D. Yan, and A.V. Krassioukov, Incidence and Natural Progression of Neurogenic Shock after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 35 (2018) 461-466.
- [15] R. Hamid, M.A. Averbeck, H. Chiang, A. Garcia, R.T. Al Mousa, S.J. Oh, A. Patel, M. Plata, and G. Del Popolo, Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury. *World J Urol* 36 (2018) 1517-1527.
- [16] J.H. Badhiwala, C.S. Ahuja, and M.G. Fehlings, Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 30 (2018) 1-18.
- [17] C.A. Oyinbo, Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71 (2011) 281-99.
- [18] A.P. Tran, P.M. Warren, and J. Silver, The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol Rev* 98 (2018) 881-917.
- [19] C.D. Shank, B.C. Walters, and M.N. Hadley, Current Topics in the Management of Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurocrit Care* 30 (2019) 261-271.

- [20] P. Freund, M. Seif, N. Weiskopf, K. Friston, M.G. Fehlings, A.J. Thompson, and A. Curt, MRI in traumatic spinal cord injury: from clinical assessment to neuroimaging biomarkers. *Lancet Neurol* 18 (2019) 1123-1135.
- [21] V.M. Zohrabian, L. Parker, J.S. Harrop, A.R. Vaccaro, R.J. Marino, and A.E. Flanders, Can anatomic level of injury on MRI predict neurological level in acute cervical spinal cord injury? *Br J Neurosurg* 30 (2016) 204-10.
- [22] J. Kohrle, Selenium and the thyroid. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22 (2015) 392-401.
- [23] L. Schomburg, Dietary Selenium and Human Health. *Nutrients* 9 (2016).
- [24] A. Hordyjewska, L. Popiolek, and J. Kocot, The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals* 27 (2014) 611-21.
- [25] W. Mertz, Review of the scientific basis for establishing the essentiality of trace elements. *Biol Trace Elem Res* 66 (1998) 185-91.
- [26] Y. Zhang, Trace Elements and Healthcare: A Bioinformatics Perspective. *Adv Exp Med Biol* 1005 (2017) 63-98.
- [27] K. Demircan, Y. Bengtsson, Q. Sun, A. Brange, J. Vallon-Christersson, E. Rijntjes, M. Malmberg, L.H. Saal, L. Ryden, A. Borg, J. Manjer, and L. Schomburg, Serum selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 as predictors of mortality and recurrence following breast cancer diagnosis: A multicentre cohort study. *Redox Biol* 47 (2021) 102145.
- [28] D. Huster, [Wilson disease]. *Internist (Berl)* 59 (2018) 159-174.
- [29] M. Oropeza-Moe, H. Wisloff, and A. Bernhoft, Selenium deficiency associated porcine and human cardiomyopathies. *J Trace Elem Med Biol* 31 (2015) 148-56.
- [30] M. Mikulewicz, K. Chojnacka, B. Kawala, and T. Gredes, Trace Elements in Living Systems: From Beneficial to Toxic Effects. *Biomed Res Int* 2017 (2017) 8297814.
- [31] M.P. Rayman, Selenium and human health. *Lancet* 379 (2012) 1256-68.
- [32] J.C. Avery, and P.R. Hoffmann, Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients* 10 (2018).
- [33] M.A. Reeves, and P.R. Hoffmann, The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 2457-78.
- [34] J. Yan, and J.N. Barrett, Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P. *J Neurosci* 18 (1998) 8682-91.
- [35] M.W. Pitts, C.N. Byrns, A.N. Ogawa-Wong, P. Kremer, and M.J. Berry, Selenoproteins in nervous system development and function. *Biol Trace Elem Res* 161 (2014) 231-45.
- [36] D.J. Hughes, T. Duarte-Salles, S. Hybsier, A. Trichopoulou, M. Stepien, K. Aleksandrova, K. Overvad, A. Tjonneland, A. Olsen, A. Affret, G. Fagherazzi, M.C. Boutron-Ruault, V. Katzke, R. Kaaks, H. Boeing, C. Bamia, P. Lagiou, E. Peppas, D. Palli, V. Krogh, S. Panico, R. Tumino, C. Sacerdote, H.B. Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, D. Engeset, E. Weiderpass, C. Lasheras, A. Agudo, M.J. Sanchez, C. Navarro, E. Ardanaz, M. Dorronsoro, O. Hemmingsson, N.J. Wareham, K.T. Khaw, K.E. Bradbury, A.J. Cross, M. Gunter, E. Riboli, I. Romieu, L. Schomburg, and M. Jenab, Prediagnostic selenium status and hepatobiliary cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr* 104 (2016) 406-14.
- [37] V. Fedirko, M. Jenab, C. Meplan, J.S. Jones, W. Zhu, L. Schomburg, A. Siddiq, S. Hybsier, K. Overvad, A. Tjonneland, H. Omichessan, V. Perduca, M.C. Boutron-Ruault, T. Kuhn, V. Katzke, K. Aleksandrova, A. Trichopoulou, A. Karakatsani, A. Kotanidou, R. Tumino, S. Panico, G. Masala, C. Agnoli, A. Naccarati, B. Bueno-de-Mesquita, R.C.H. Vermeulen, E. Weiderpass, G. Skeie, T.H. Nost, L. Lujan-Barroso, J.R. Quiros, J.M. Huerta, M. Rodriguez-Barranco, A. Barricarte, B. Gylling, S. Harlid, K.E. Bradbury, N. Wareham, K.T. Khaw, M. Gunter, N. Murphy, H. Freisling, K. Tsilidis, D. Aune, E. Riboli, J.E. Hesketh, and D.J. Hughes, Association of Selenoprotein and Selenium Pathway Genotypes with Risk of Colorectal Cancer and Interaction with Selenium Status. *Nutrients* 11 (2019).

- [38] D.J. Hughes, V. Fedirko, M. Jenab, L. Schomburg, C. Meplan, H. Freisling, H.B. Bueno-de-Mesquita, S. Hybsier, N.P. Becker, M. Czuban, A. Tjonneland, M. Outzen, M.C. Boutron-Ruault, A. Racine, N. Bastide, T. Kuhn, R. Kaaks, D. Trichopoulos, A. Trichopoulou, P. Lagiou, S. Panico, P.H. Peeters, E. Weiderpass, G. Skeie, E. Dagrùn, M.D. Chirlaque, M.J. Sanchez, E. Ardanaz, I. Ljuslinder, M. Wennberg, K.E. Bradbury, P. Vineis, A. Naccarati, D. Palli, H. Boeing, K. Overvad, M. Dorronsoro, P. Jakszyn, A.J. Cross, J.R. Quiros, M. Stepien, S.Y. Kong, T. Duarte-Salles, E. Riboli, and J.E. Hesketh, Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer* 136 (2015) 1149-61.
- [39] M.P. Bansal, C.J. Oborn, K.G. Danielson, and D. Medina, Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10 (1989) 541-6.
- [40] H. Steinbrenner, M. Micoogullari, N.A. Hoang, I. Bergheim, L.O. Klotz, and H. Sies, Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is a marker of mature adipocytes. *Redox Biol* 20 (2019) 489-495.
- [41] A.M. Diamond, The subcellular location of selenoproteins and the impact on their function. *Nutrients* 7 (2015) 3938-48.
- [42] M. Elhodaky, and A.M. Diamond, Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci* 19 (2018).
- [43] P.W. Chang, S.K. Tsui, C. Liew, C.C. Lee, M.M. Waye, and K.P. Fung, Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J Cell Biochem* 64 (1997) 217-24.
- [44] N. Wang, Y. Chen, X. Yang, and Y. Jiang, Selenium-binding protein 1 is associated with the degree of colorectal cancer differentiation and is regulated by histone modification. *Oncol Rep* 31 (2014) 2506-14.
- [45] X. Tan, L. Liao, Y.P. Wan, M.X. Li, S.H. Chen, W.J. Mo, Q.L. Zhao, L.F. Huang, and G.Q. Zeng, Downregulation of selenium-binding protein 1 is associated with poor prognosis in lung squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 14 (2016) 70.
- [46] Y.J. Xia, Y.Y. Ma, X.J. He, H.J. Wang, Z.Y. Ye, and H.Q. Tao, Suppression of selenium-binding protein 1 in gastric cancer is associated with poor survival. *Hum Pathol* 42 (2011) 1620-8.
- [47] E.C. Kuhn, A. Slagman, E.C.D. Kuhn-Heid, J. Seelig, C. Schwiebert, W.B. Minich, C. Stoppe, M. Mockel, and L. Schomburg, Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *J Trace Elem Med Biol* 52 (2019) 247-253.
- [48] E.C.D. Kuhn-Heid, E.C. Kuhn, J. Ney, S. Wendt, J. Seelig, C. Schwiebert, W.B. Minich, C. Stoppe, and L. Schomburg, Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery. *Nutrients* 11 (2019).
- [49] D.G. Barceloux, Copper. *J Toxicol Clin Toxicol* 37 (1999) 217-30.
- [50] M. Ghayour-Mobarhan, A. Taylor, S.A. New, D.J. Lamb, and G.A. Ferns, Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Ann Clin Biochem* 42 (2005) 364-75.
- [51] M. Stepien, M. Jenab, H. Freisling, N.P. Becker, M. Czuban, A. Tjonneland, A. Olsen, K. Overvad, M.C. Boutron-Ruault, F.R. Mancini, I. Savoye, V. Katzke, T. Kuhn, H. Boeing, K. Iqbal, A. Trichopoulou, C. Bamia, P. Orfanos, D. Palli, S. Sieri, R. Tumino, A. Naccarati, S. Panico, H.B.A. Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, E. Weiderpass, S. Merino, P. Jakszyn, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, J.M. Huerta, A. Barricarte, S. Boden, B. van Guelpen, N. Wareham, K.T. Khaw, K.E. Bradbury, A.J. Cross, L. Schomburg, and D.J. Hughes, Pre-diagnostic copper and zinc biomarkers and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Carcinogenesis* 38 (2017) 699-707.
- [52] I. Scheiber, R. Dringen, and J.F. Mercer, Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci* 13 (2013) 359-87.

- [53] M.J. Lopez, A. Royer, and N.J. Shah, *Biochemistry, Ceruloplasmin*, StatPearls, Treasure Island (FL), 2021.
- [54] N.E. Hellman, and J.D. Gitlin, Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22 (2002) 439-58.
- [55] M.K. Georgieff, Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr* 85 (2007) 614S-620S.
- [56] Z. Zhang, Y. Wu, S. Yuan, P. Zhang, J. Zhang, H. Li, X. Li, H. Shen, Z. Wang, and G. Chen, Glutathione peroxidase 4 participates in secondary brain injury through mediating ferroptosis in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 1701 (2018) 112-125.
- [57] Y. Xiong, F.S. Shie, J. Zhang, C.P. Lee, and Y.S. Ho, Prevention of mitochondrial dysfunction in post-traumatic mouse brain by superoxide dismutase. *J Neurochem* 95 (2005) 732-44.
- [58] K.I. Rathore, B.J. Kerr, A. Redensek, R. Lopez-Vales, S.Y. Jeong, P. Ponka, and S. David, Ceruloplasmin protects injured spinal cord from iron-mediated oxidative damage. *J Neurosci* 28 (2008) 12736-47.
- [59] X.B. Chen, H. Yuan, F.J. Wang, Z.X. Tan, H. Liu, and N. Chen, Protective role of selenium-enriched supplement on spinal cord injury through the up-regulation of CNTF and CNTF-Ralpha. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19 (2015) 4434-42.
- [60] B.K. Kwon, F. Streijger, C.E. Hill, A.J. Anderson, M. Bacon, M.S. Beattie, A. Blesch, E.J. Bradbury, A. Brown, J.C. Bresnahan, C.C. Case, R.W. Colburn, S. David, J.W. Fawcett, A.R. Ferguson, I. Fischer, C.L. Floyd, J.C. Gensel, J.D. Houle, L.B. Jakeman, N.D. Jeffery, L.A. Jones, N. Kleitman, J. Kocsis, P. Lu, D.S. Magnuson, M. Marsala, S.W. Moore, A.J. Mothe, M. Oudega, G.W. Plant, A.S. Rabchevsky, J.M. Schwab, J. Silver, O. Steward, X.M. Xu, J.D. Guest, and W. Tetzlaff, Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies. *Exp Neurol* 269 (2015) 154-68.
- [61] S. Kirshblum, and W. Waring, 3rd, Updates for the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 25 (2014) 505-17, vii.
- [62] R.A. Heller, J. Seelig, T. Bock, P. Haubruck, P.A. Grutzner, L. Schomburg, A. Moghaddam, and B. Biglari, Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury. *J Trace Elem Med Biol* 51 (2019) 141-149.
- [63] J. Seelig, R.A. Heller, P. Haubruck, Q. Sun, J. Georg Klingenberg, J. Hackler, H.L. Crowell, V. Daniel, A. Moghaddam, L. Schomburg, and B. Biglari, Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Neurosci* 15 (2021) 680240.
- [64] J. Seelig, R.A. Heller, J. Hackler, P. Haubruck, A. Moghaddam, B. Biglari, and L. Schomburg, Selenium and copper status - potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury. *J Trace Elem Med Biol* 57 (2020) 126415.
- [65] S. Mehl, Q. Sun, C.L. Gorlich, J. Hackler, J.F. Kopp, K. Renko, J. Mittag, T. Schwerdtle, and L. Schomburg, Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol* 58 (2020) 126430.
- [66] H. Wickham, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer (2009).
- [67] X. Robin, N. Turck, A. Hainard, N. Tiberti, F. Lisacek, J.C. Sanchez, and M. Muller, pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12 (2011) 77.
- [68] W.N. Venables, and B.D. Ripley, *Modern applied statistics with S-PLUS*, Springer, 2013.
- [69] Y. Chen, S. Liu, J. Li, Z. Li, J. Quan, X. Liu, Y. Tang, and B. Liu, The Latest View on the Mechanism of Ferroptosis and Its Research Progress in Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2020 (2020) 6375938.
- [70] M. Naziroglu, N. Senol, V. Ghazizadeh, and V. Yuruker, Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat. *Cell Mol Neurobiol* 34 (2014) 895-903.
- [71] S. Seeher, B.A. Carlson, A.C. Miniard, E.K. Wirth, Y. Mahdi, D.L. Hatfield, D.M. Driscoll, and U. Schweizer, Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. *Biochem J* 462 (2014) 67-75.

- [72] L.M. Klevay, Myelin and traumatic brain injury: the copper deficiency hypothesis. *Med Hypotheses* 81 (2013) 995-8.
- [73] Y. Wu, L. Shen, R. Wang, J. Tang, S.Q. Ding, S.N. Wang, X.Y. Guo, J.G. Hu, and H.Z. Lu, Increased ceruloplasmin expression caused by infiltrated leukocytes, activated microglia, and astrocytes in injured female rat spinal cords. *J Neurosci Res* 96 (2018) 1265-1276.
- [74] B.K. Kwon, O. Bloom, I.B. Wanner, A. Curt, J.M. Schwab, J. Fawcett, and K.K. Wang, Neurochemical biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord* 57 (2019) 819-831.
- [75] C. Huang, G. Ding, C. Gu, J. Zhou, M. Kuang, Y. Ji, Y. He, T. Kondo, and J. Fan, Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1alpha to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin Cancer Res* 18 (2012) 3042-53.
- [76] E.K. Lee, Y.J. Shin, E.Y. Park, N.D. Kim, A. Moon, S.J. Kwack, J.Y. Son, S. Kacew, B.M. Lee, O.N. Bae, and H.S. Kim, Selenium-binding protein 1: a sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol* 91 (2017) 1635-1648.
- [77] J. Mojsilovic-Petrovic, D. Callaghan, H. Cui, C. Dean, D.B. Stanimirovic, and W. Zhang, Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J Neuroinflammation* 4 (2007) 12.
- [78] R.A. Heller, T.F. Raven, T. Swing, K. Kunzmann, V. Daniel, P. Haubruck, M. Akbar, P.A. Grutzner, G. Schmidmaier, B. Biglari, and A. Moghaddam, CCL-2 as a possible early marker for remission after traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord* 55 (2017) 1002-1009.
- [79] G. Hawryluk, W. Whetstone, R. Saigal, A. Ferguson, J. Talbott, J. Bresnahan, S. Dhall, J. Pan, M. Beattie, and G. Manley, Mean Arterial Blood Pressure Correlates with Neurological Recovery after Human Spinal Cord Injury: Analysis of High Frequency Physiologic Data. *J Neurotrauma* 32 (2015) 1958-67.
- [80] T.C. Ryken, R.J. Hurlbert, M.N. Hadley, B. Aarabi, S.S. Dhall, D.E. Gelb, C.J. Rozzelle, N. Theodore, and B.C. Walters, The acute cardiopulmonary management of patients with cervical spinal cord injuries. *Neurosurgery* 72 Suppl 2 (2013) 84-92.
- [81] T. Kurita, S. Kawashima, K. Morita, and Y. Nakajima, Spinal cord autoregulation using near-infrared spectroscopy under normal, hypovolemic, and post-fluid resuscitation conditions in a swine model: a comparison with cerebral autoregulation. *J Intensive Care* 8 (2020) 27.
- [82] S. Saadoun, and M.C. Papadopoulos, Targeted Perfusion Therapy in Spinal Cord Trauma. *Neurotherapeutics* 17 (2020) 511-521.
- [83] I. Alim, J.T. Caulfield, Y. Chen, V. Swarup, D.H. Geschwind, E. Ivanova, J. Seravalli, Y. Ai, L.H. Sansing, E.J. Ste Marie, R.J. Hondal, S. Mukherjee, J.W. Cave, B.T. Sagdullaev, S.S. Karuppagounder, and R.R. Ratan, Selenium Drives a Transcriptional Adaptive Program to Block Ferroptosis and Treat Stroke. *Cell* 177 (2019) 1262-1279 e25.
- [84] F. Landucci, P. Mancinelli, A.R. De Gaudio, and G. Virgili, Selenium supplementation in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care* 29 (2014) 150-6.
- [85] C. Benstoem, A. Goetzenich, S. Kraemer, S. Borosch, W. Manzanares, G. Hardy, and C. Stoppe, Selenium and its supplementation in cardiovascular disease--what do we know? *Nutrients* 7 (2015) 3094-118.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julian Seelig versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Spurenelement- und Biomarkeranalysen in Serumproben von Patient*innen nach traumatischen Rückenmarksverletzungen; Trace element and biomarker analyses in serum samples of patients after traumatic spinal cord injury selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Julian Seelig hatte folgenden Anteil an den dargestellten Publikationen:

1. **Julian Seelig** †, Raban Arved Heller†, Patrick Haubruck, Qian Sun, Jochen Georg Klingenberg, Julian Hackler, Helena Lucia Crowell, Volker Daniel, Arash Moghaddam, Lutz Schomburg, Bahram Biglari. *Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury*. *Frontiers in Neuroscience* 2021, 28;15:680240.
2. **Julian Seelig**, Raban Arved Heller, Julian Hackler, Patrick Haubruck, Arash Moghaddam, Bahram Biglari, Lutz Schomburg. *Selenium and copper status – potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2020, 57:126415.
3. Raban Arved Heller, **Julian Seelig**, Tobias Bock, Patrick Haubruck, Paul Alfred Grützner, Lutz Schomburg, Arash Moghaddam, Bahram Biglari. *Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2019, 51:141-149.

† gleichberechtigte Autoren

Publikation 1

Ich, Julian Seelig, war in Zusammenarbeit mit Prof. Lutz Schomburg und den Kooperationspartnern maßgeblich an der Entwicklung der Arbeitshypothese, welche der Arbeit zugrunde liegt, beteiligt. Die zu analysierenden Seren und die klinischen Daten der Patient*innen wurden durch den Kooperationspartner zusammengetragen. Zu meinen Hauptaufgaben zählten die Koordination der Probenzusammenstellung und -übermittlung an das Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin zu Berlin sowie die Verwaltung, Verarbeitung, Lagerung und Analyse des Probenmaterials. In selbstständiger Arbeit habe ich die laborchemischen Bestimmungen der Spurenelemente (Selen, Kupfer, Zink) anhand von Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalysen, die Detektionen der Biomarker Ceruloplasmin und Selenoprotein P via ELISA Verfahren und die Analysen der peripheren Konzentrationen des Selen- bindenden- Proteins 1 mittels lumineszierender Immunoassay Verfahren durchgeführt. Die Analysen des Zytokinprofils erfolgte am Universitätsklinikum Heidelberg durch den Kooperationspartner. Die primäre statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Raban Heller. Die Auswahl und die Erstellung der Abbildungen 1,3,4 und 5 erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit durch Raban Heller und mich. Die Abbildung 2 und das graphische

Abstract wurden durch mich erstellt. Des Weiteren habe ich nach entsprechender Literaturrecherche den primären Publikationsentwurf angefertigt, kontinuierlich angepasst und Änderungsvorschlägen von Mitautoren eingearbeitet. Abschließend war ich für die Auswahl des passenden Journals sowie dem Einreichungsprozess der finalen Publikationsschrift verantwortlich. Die Umsetzung der Änderungsvorschläge der Reviewer erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitautoren.

Publikation 2

Ich, Julian Seelig, war in Zusammenarbeit mit Prof. Lutz Schomburg und den Kooperationspartnern maßgeblich an der Entwicklung der Arbeitshypothese sowie den Planungen zur Erweiterung des Studienkollektivs entscheidend beteiligt. Die zu analysierenden Seren und die klinischen Daten der Patient*innen wurden durch den Kooperationspartner zusammengetragen. Zu meinen Hauptaufgaben zählten die Koordination der Probenzusammenstellung und -übermittlung an das Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin zu Berlin sowie die Verwaltung, Verarbeitung, Lagerung und Analyse des Probenmaterials. In selbstständiger Arbeit habe ich die laborchemischen Bestimmungen der Spurenelemente (Selen, Kupfer) anhand von Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalysen sowie die Detektionen der beschriebenen Biomarker Ceruloplasmin und Selenoprotein P via ELISA Verfahren durchgeführt. Die primäre statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Raban Heller. Die Auswahl und die Erstellung der Abbildungen und Tabellen erfolgte in Zusammenarbeit durch Raban Heller und mich. Nach der entsprechenden Literaturrecherche erfolgte durch mich die Anfertigung der primären Publikationsentwurfs. Die Rücksprachen zu den Mitautoren, die Einarbeitungen von Änderungsvorschlägen und die Editierung von Tabellen und Abbildungen erfolgten durch mich. Abschließend war ich nach der Auswahl des passenden Journals in Zusammenarbeit mit Prof. Schomburg für den Einreichungsprozess der finalen Publikationsschrift verantwortlich sowie zuständig für die Einarbeitung und Umsetzung der Anmerkungen der Reviewer.

Publikation 3

Durch den Kooperationspartner wurden die zu analysierenden Patientenserien und die klinischen Daten zusammengetragen. Zu meinen Hauptaufgaben zählten die Koordination der Probenzusammenstellung und -übermittlung an das Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin zu Berlin sowie die Verwaltung, Verarbeitung, Lagerung und Analyse des Probenmaterials. In selbstständiger Arbeit habe ich die laborchemischen Bestimmungen der Spurenelemente (Selen, Zink) anhand von Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalysen sowie die Detektionen der Selenoprotein P Konzentrationen via ELISA Verfahren durchgeführt. Die primäre statistische Auswertung erfolgte durch Raban Heller. Die Erstellung der Tabellen und der passenden Abbildungen erfolgte in Zusammenarbeit von Raban Heller und mir. Der Großteil des primären Publikationsmanuskripts wurde durch Raban Heller erstellt. Ich war verantwortlich für die Darstellungen der angewandten Methoden/ Analysen sowie kontinuierlich an der Überarbeitung des restlichen Skriptes, der Editierung der Abbildungen und Tabellen beteiligt, dem Einreichungs- und Reviewprozess beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Seelig et al. 2021

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 271 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	42,809	33.654	0.055400
2	NATURE NEUROSCIENCE	62,933	20.071	0.144390
3	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,395	17.333	0.008170
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,705	15.218	0.036050
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,537	14.528	0.009430
6	NEURON	95,056	14.415	0.199640
7	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,011	12.891	0.021220
9	Annual Review of Neuroscience	13,215	12.547	0.012740
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
11	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
13	BRAIN	53,282	11.337	0.067050
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	8,077	9.613	0.013000
15	Molecular Neurodegeneration	4,933	9.599	0.011840
16	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,791	9.371	0.011250
17	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,491	9.059	0.007050
18	ANNALS OF NEUROLOGY	37,304	9.037	0.044120
19	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	28,873	8.330	0.051900
20	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	2,232	7.724	0.008400
21	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	Neurobiology of Stress	1,055	7.197	0.003840
23	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
24	npj Parkinsons Disease	662	6.750	0.002500
25	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
26	Brain Stimulation	6,537	6.565	0.015580
27	NEUROSCIENTIST	5,188	6.500	0.007220
28	Acta Neuropathologica Communications	4,070	6.270	0.014730
29	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	14,959	6.267	0.028730
30	Alzheimers Research & Therapy	3,876	6.116	0.011650
31	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
32	GLIA	14,220	5.984	0.017250
33	NEUROIMAGE	102,632	5.902	0.125360
34	Annual Review of Vision Science	601	5.897	0.003700
35	Molecular Autism	2,510	5.869	0.007450
36	Journal of Neuroinflammation	13,709	5.793	0.025870
37	Translational Stroke Research	2,274	5.780	0.004520
38	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,492	5.681	0.024230
39	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	167,114	5.673	0.181170
40	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
41	Translational Neurodegeneration	1,030	5.551	0.002790
42	NEURAL NETWORKS	14,065	5.535	0.018910
43	PAIN	37,753	5.483	0.035730

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
44	Multiple Sclerosis Journal	11,792	5.412	0.019460
45	BIPOLAR DISORDERS	4,838	5.410	0.006610
46	Dialogues in Clinical Neuroscience	3,842	5.397	0.005280
47	Biological Psychiatry-Cognitive Neuroscience and Neuroimaging	1,361	5.335	0.005880
48	NEUROBIOLOGY OF DISEASE	17,200	5.332	0.023770
49	Brain Connectivity	2,431	5.263	0.005180
50	Journal of Parkinsons Disease	2,244	5.178	0.005810
51	CEREBRAL CORTEX	30,815	5.043	0.056030
52	Developmental Cognitive Neuroscience	3,177	4.966	0.010180
53	CEPHALALGIA	11,053	4.868	0.011970
54	NEUROPSYCHOLOGY REVIEW	3,114	4.840	0.004050
55	SLEEP	22,296	4.805	0.024610
56	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	3,898	4.797	0.007600
57	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	19,287	4.732	0.027100
58	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH	13,098	4.699	0.010490
59	EXPERIMENTAL NEUROLOGY	20,154	4.691	0.020070
60	Molecular Brain	2,785	4.686	0.006510
61	Current Neuropharmacology	4,178	4.668	0.006280
62	JOURNAL OF PAIN	10,887	4.621	0.015040
63	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	50,045	4.547	0.037090
64	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	11,015	4.516	0.017330
65	MOLECULAR NEUROBIOLOGY	15,297	4.500	0.031350

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
66	ACS Chemical Neuroscience	6,881	4.486	0.015300
67	Fluids and Barriers of the CNS	1,331	4.470	0.002240
68	NEUROPHARMACOLOGY	21,682	4.431	0.033110
69	HUMAN BRAIN MAPPING	23,094	4.421	0.042760
70	JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE	3,297	4.382	0.004290
71	Current Neurology and Neuroscience Reports	3,429	4.376	0.006810
72	Nature and Science of Sleep	728	4.375	0.001970
73	Frontiers in Aging Neuroscience	9,063	4.362	0.026120
74	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	11,179	4.361	0.013670
75	NEUROBIOLOGY OF AGING	23,002	4.347	0.032570
76	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,749	4.333	0.011150
77	Neuroscience Bulletin	2,338	4.326	0.004870
78	NEUROENDOCRINOLOGY	4,958	4.271	0.004820
79	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	5,437	4.207	0.008280
80	ASN Neuro	984	4.167	0.001580
81	Journal of Neural Engineering	7,240	4.141	0.011940
82	Journal of Neuroimmune Pharmacology	2,809	4.113	0.003520
83	CNS Neuroscience & Therapeutics	3,598	4.074	0.005870
84	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY	34,378	4.066	0.021840
85	Frontiers in Molecular Neuroscience	6,721	4.057	0.020190
86	NUTRITIONAL NEUROSCIENCE	2,110	4.028	0.002640
87	CORTEX	10,979	4.009	0.022870

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
88	Current Opinion in Behavioral Sciences	2,507	3.990	0.012580
89	Developmental Neurobiology	3,049	3.935	0.006120
90	Cognitive Neurodynamics	988	3.925	0.001690
91	Frontiers in Cellular Neuroscience	11,389	3.921	0.034000
92	JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE	23,214	3.909	0.048080
93	NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL	8,928	3.881	0.008010
94	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	7,597	3.853	0.013120
95	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	15,388	3.793	0.021530
96	Frontiers in Neuroscience	17,395	3.707	0.049650
97	HEARING RESEARCH	11,072	3.693	0.012480
98	PSYCHOPHYSIOLOGY	14,586	3.692	0.012670
99	Annals of Clinical and Translational Neurology	2,571	3.660	0.011170
100	JOURNAL OF SLEEP RESEARCH	5,945	3.623	0.007370
101	CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY	4,732	3.606	0.006190
102	Social Cognitive and Affective Neuroscience	7,347	3.571	0.019570
103	eNeuro	3,237	3.544	0.015940
104	Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation	5,164	3.519	0.008430
105	JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION	7,111	3.505	0.007930
106	EUROPEAN JOURNAL OF PAIN	7,579	3.492	0.009730
107	Journal of Neurodevelopmental Disorders	1,342	3.487	0.003300
108	HIPPOCAMPUS	8,587	3.404	0.010830
109	GENES BRAIN AND BEHAVIOR	3,639	3.397	0.005080



Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury

Julian Seelig^{1†}, Raban Arved Heller^{1,2,3†}, Patrick Haubruck^{2,4}, Qian Sun¹, Georg Jochen Klingenberg¹, Julian Hackler¹, Helena Lucia Crowell^{5,6}, Volker Daniel⁷, Arash Moghaddam⁸, Lutz Schomburg^{1*} and Bahram Biglari^{9*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jong-Min Kim,
Seoul National University Bundang
Hospital, South Korea

Reviewed by:

Tommaso Filippini,
University of Modena and Reggio
Emilia, Italy
Nafisa M. Jadaoui,
Midwestern University, United States

*Correspondence:

Lutz Schomburg
lutz.schomburg@charite.de
Bahram Biglari
bahram.biglari@bgu-ludwigshafen.de

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 13 March 2021

Accepted: 29 April 2021

Published: 28 May 2021

Citation:

Seelig J, Heller RA, Haubruck P,
Sun Q, Klingenberg GJ, Hackler J,
Crowell HL, Daniel V, Moghaddam A,
Schomburg L and Biglari B (2021)
Selenium-Binding Protein 1
(SELENBP1) as Biomarker
for Adverse Clinical Outcome After
Traumatic Spinal Cord Injury.
Front. Neurosci. 15:680240.
doi: 10.3389/fnins.2021.680240

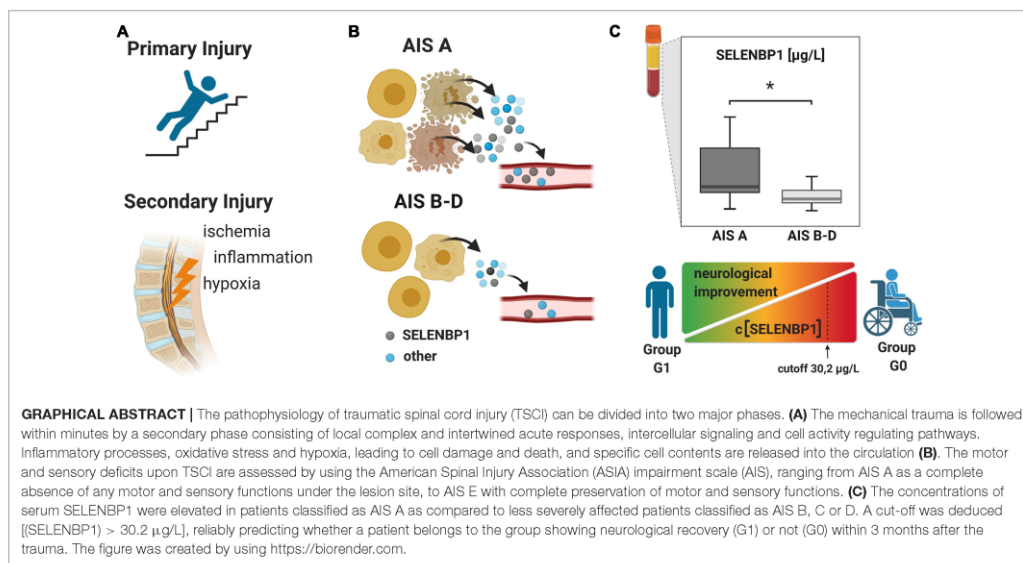
¹Institute for Experimental Endocrinology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, ²Heidelberg Trauma Research Group, Department of Trauma and Reconstructive Surgery, Centre for Orthopaedics, Trauma Surgery and Spinal Cord Injury, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany, ³Department of General Practice and Health Services Research, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany, ⁴Raymond Purves Bone and Joint Research Laboratories, Kolling Institute of Medical Research, Institute of Bone and Joint Research, University of Sydney, St Leonards, NSW, Australia, ⁵SIB Swiss Institute of Bioinformatics, University of Zurich, Zurich, Switzerland, ⁶Systems Biology Ph.D. Program, Life Science Zurich Graduate School, ETH Zürich and University of Zurich, Zurich, Switzerland, ⁷Transplantation Immunology, Institute of Immunology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany, ⁸Aschaffenburg Trauma and Orthopaedic Research Group, Centre for Orthopaedics, Trauma Surgery and Sports Medicine, Hospital Aschaffenburg-Alzenau, Aschaffenburg, Germany, ⁹Department of Paraplegiology, BG Trauma Centre Ludwigshafen, Ludwigshafen, Germany

Introduction: Traumatic spinal cord injury (TSCI) presents a diagnostic challenge as it may have dramatic consequences for the affected patient. Additional biomarkers are needed for improved care and personalized therapy.

Objective: Serum selenium binding protein 1 (SELENBP1) has been detected in myocardial infarction, reflecting hypoxic tissue damage and recovery odds. As SELENBP1 is usually not detected in the serum of healthy subjects, we tested the hypothesis that it may become detectable in TSCI and indicate tissue damage and regeneration odds.

Methods: In this prospective observational study, patients with comparable injuries were allocated to three groups; vertebral body fractures without neurological impairment (control “C”), TSCI without remission (“G0”), and TSCI with signs of remission (“G1”). Consecutive serum samples were available from different time points and analyzed for SELENBP1 by sandwich immunoassay, for trace elements by X-ray fluorescence and for cytokines by multiplex immunoassays.

Results: Serum SELENBP1 was elevated at admission in relation to the degree of neurological impairment [graded as A, B, C, or D according to the American Spinal Injury Association (AIS) impairment scale (AIS)]. Patients with the most severe neurological impairment (classified as AIS A) exhibited the highest SELENBP1 concentrations ($p = 0.011$). During the first 3 days, SELENBP1 levels differed between G0 and G1 ($p = 0.019$), and dynamics of SELENBP1 correlated to monocyte chemoattractant protein 1, chemokine ligand 3 and zinc concentrations.



Conclusion: Circulating SELENBP1 concentrations are related to the degree of neurological impairment in TSCI and provide remission odds information. The tight correlation of SELENBP1 with CCL2 levels provides a novel link between Se metabolism and immune cell activation, with potential relevance for neurological damage and regeneration processes, respectively.

Keywords: diagnostic biomarker, *in vitro* diagnostic test, trace element, neuroregeneration, neurotrauma

INTRODUCTION

Traumatic spinal cord injury (TSCI) remains one of the most severe injuries and affects predominantly young patients (Furlan et al., 2013; Spinal Cord Injury [SCI], 2016). On a pathophysiological level, the primary injury phase is characterized mainly by the mechanical disruption of the spinal cord (SC) due to shearing, laceration, acute stretching, and sudden acceleration-deceleration events (Baptiste and Fehlings, 2006; Rowland et al., 2008). Hereafter, a secondary injury phase is driven by complex inflammatory responses, involving excitotoxicity, ischemia/hypoxia, inflammation, increased spinal cord intraparenchymal pressure, and oxidative stress. Ultimately, these processes determine the extent of neuronal loss after the mechanical insult (Kwon et al., 2004; Shadgan et al., 2019). Finally, the chronic phase is characterized by adaptive processes, recovery, or autonomic dysregulations (Kwon et al., 2004; Norenberg et al., 2004; Rowland et al., 2008; Moghaddam et al., 2015). Due to the highly dynamic nature of these processes, an informative assessment of the remaining or regained neurological functions after TSCI can only be conducted after months, when a new balance is established. Objective and early biomarkers for

the extent of damage with potential relevance for remission and prognosis are urgently needed (Kwon et al., 2019).

The essential trace elements selenium (Se), copper (Cu), and zinc (Zn) are of crucial relevance for immune responses and neurological repair processes (Levenson, 2005; Ma et al., 2018; Zhang et al., 2020) partly due to trace element containing proteins with enzymatic or transport functions. Selenoprotein P (SELENOP) is a circulating Se transport protein with peroxidase activity, ceruloplasmin (CP) is an oxidoreductase and Cu transporter, and the intracellular Cu/Zn superoxide dismutase is an essential component of the antioxidative defense (Besold et al., 2016; Kielczykowska et al., 2018; Lewandowski et al., 2019). Thus, trace elements, when available to the organism in physiological concentrations, exert a beneficial influence on the regulation of various immune cells (Avery and Hoffmann, 2018), are facilitating in regeneration processes after injuries (Lansdown et al., 2007), or, in the form of SELENOP, influence the survival of neurons exposed to oxidative stress (Yan and Barrett, 1998).

Se-binding protein 1 (SELENBP1) is a poorly characterized parameter of Se metabolism, transport and intracellular accumulation. It can exert enzymatic activity, capable of oxidizing methanethiol (Pol et al., 2018), and it constitutes

a potential early biomarker of schizophrenia (Mohammadi et al., 2018). SELENBP1 is located intracellularly under normal conditions, partly in complex with Se-dependent glutathione peroxidase 1 (GPX1) (Diamond, 2015). Its expression is dysregulated in malignant tissue (Hughes et al., 2018; Schott et al., 2018), and it may serve as a biomarker of adipocyte differentiation (Steinbrenner et al., 2019). There are indications that the protein contributes to redox control, affecting cell differentiation and motility (Elhodaky and Diamond, 2018). Moreover, extracellular SELENBP1 can be detected in blood following myocardial infarction or during cardiac surgery, where serum SELENBP1 levels correlate to tissue damage and hypoxic stress (Kühn et al., 2019; Kuhn-Heid et al., 2019).

Based on these findings, we hypothesized that TSCI might be associated with an increase in circulating SELENBP1 concentrations and that elevated serum SELENBP1 at an early stage after injury may correlate to the severity and the neurological outcome of this devastating condition. Accordingly, the aim of this study was to determine circulating SELENBP1 concentrations and to analyze whether this parameter correlates to the extent of neurological impairment and clinical outcome after 3 months. In order to facilitate the evaluation of the analyses and to identify potential associations with other potentially relevant parameters, circulating chemokines, trace elements and associated biomarkers were analyzed in parallel.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

This clinical prospective observational study has been approved by the local ethics committee of the University of Heidelberg (S514/2011). It was registered (Study-ID: DRKS00009917/ Date of Registration: 23.03.2016/Universal Trial Number (UTN): U1111-1179-1620) at the German Clinical Trial Register (Deutsches Register Klinischer Studien—DRKS). Data collection and processing were performed according to good scientific practice, and the manuscript was composed according to the STROBE statement (von Elm et al., 2008). All study participants signed an informed consent form and agreed to participate. The patients were informed that they could choose to leave the study without reason at any time and that this decision will not affect further treatment in any way.

Source of Clinical Data

The clinical data were collected during the examinations and consecutively provided by the hospital database. Inclusion criteria were defined as the occurrence of at least one fracture of the spine with accompanying sensorimotor deficits resulting from TSCI. Fractures were classified according to the AO classification (Magerl et al., 1994) and the occurrence of sensorimotor deficits described as neurological level of injury (NLI). The NLI is defined as the lowest neurological level, where both motor and sensory functions are intact. Exclusion criteria were non-traumatic spinal cord injury (SCI), traumatic brain injury, severe abdominal trauma, traumatic amputation of extremities, coma, or any additional life-threatening trauma

apart from the SCI (Heller et al., 2020). During the study period, no methylprednisolone sodium succinate was provided to the participating patients. The patients included in the study were grouped into the study group S ($n = 34$), which was retrospectively divided into two subgroups G0 and G1 according to the clinical outcome after 3 months. G1 ($n = 19$) included patients with neurological remission, and group G0 ($n = 15$) consisted of patients without any improvement of the neurological functions within 3 months after injury. Ten subjects with vertebral fractures without neurological impairment were analyzed and served as the control group C ($n = 10$). The detailed patient allocation to the groups is visualized (Figure 1), and patient characteristics are provided (Tables 1, 2).

Source of Material

Venous blood samples were collected in the Department of Paraplegiology at the BG Trauma Center Ludwigshafen from TSCI patients from 2011 to 2018. Consecutive blood samples were drawn from patients at specific time points covering the period from the time of admission until 3 months after injury according to our study protocol (Figure 2). All blood samples were treated routinely according to the same standard procedure; 20 min of coagulation at room temperature, centrifugation at 3,000 rpm with an RCF of 1,000 g, aliquoting into sterile tubes and storing at -80°C until analysis or transport on dry ice. Missing samples in the protocol are mostly due to urgent interventions. The laboratory analyses for SELENBP1 and cytokine concentrations were conducted by staff blinded to patient identities and clinical data in the Institute for Experimental Endocrinology of the Charité-Universitätsmedizin Berlin and the Institute of Immunology at Heidelberg University Hospital, respectively.

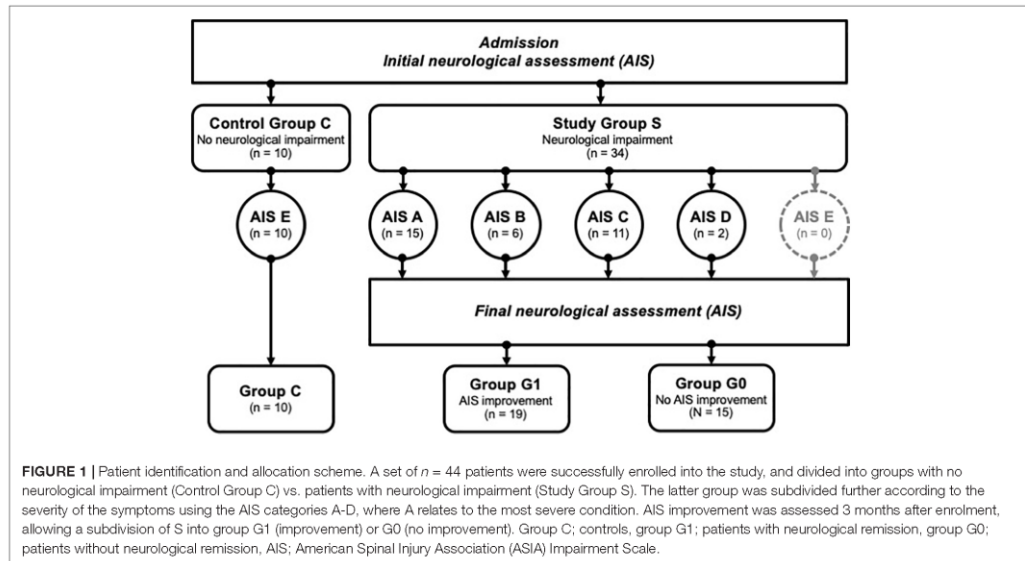
Sample Analysis

Trace Element Analyses

Trace element concentrations were determined by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) analysis, essentially as described (Hughes et al., 2016; Heller et al., 2019). Briefly, serum samples were diluted with a Gallium standard and applied to polished quartz glass discs. After drying, a benchtop TXRF device (PicoFox S2, Bruker Nano, Berlin, Germany) was used for recording the fluorescence spectra emitted from the elements upon X-ray excitation. An internal laboratory quality control was included in each measurement run, and all samples were measured in duplicate (Heller et al., 2020). The inter-assay coefficient of variation (CV) was below 10%, as determined with a commercial standard serum (Sero AS, Seronorm, Billingstad, Norway) (Hughes et al., 2016; Heller et al., 2019).

Ceruloplasmin (CP) and Selenoprotein P (SELENOP) Quantification by Sandwich Immunoassays

Serum samples were tested for SELENOP and CP concentrations. To this end, a validated enzyme-linked immunosorbent sandwich assay specific for human SELENOP (selenOtest™, ELISA) (Hybsier et al., 2017) was used according to the manufacturer's instructions (selenOmed GmbH, Berlin, Germany). Serum CP concentrations were determined by a sandwich ELISA using a



pair of specific monoclonal antibodies in combination with a commercial human CP standard (CP, catalog number 187-51, Lee BioSolutions, Maryland Heights, MO 63043, United States) as described earlier (Hackler et al., 2020).

Selenium Binding Protein 1 (SELENBP1) Quantification by LIA

Serum SELENBP1 concentrations were analyzed by a recently established luminometric immunoassay (LIA) (Kühn et al., 2019). Quality of measurements was verified by including two human serum standards in each assay run. Intra- and inter-assay variations of SELENBP1 concentrations were below 15% during the analyses.

Cytokine Quantification via Multiplex Bead-Based Immunoassays

Multiplex bead-based immunoassays were used to quantify a set of human chemokines and cytokines (Luminex Performance Human High-Sensitivity Cytokine Panels). Serum concentrations of CCL-2, CCL-4, MMP-2, MMP-8, IL-8, and IL-10 were assessed. The determination was performed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States).

Outcome

The American Spinal Injury Association (ASIA) impairment scale (AIS) was used to describe the functional impairment in TSCI patients. The neurological functions were graded as A, B, C, or D by experienced examiners applying the International Standards for Neurological Classification of SCI (ISNCSCI). To quantify the neurological deficit according to the AIS various

parameters such as sensitivity, motor function, muscle strength, and the level of the paraplegia are considered. Hence, AIS A grade represents the complete loss of all motor and sensory functions below the site of injury. Whereas AIS B-D constitute incomplete deficits with remaining sensory and/or motor qualities, with B containing the least and D the most functions. Physiological findings without neurologic impairment are classified as AIS E (Table 3). Initial examinations (AIS initial) were performed within 72 h after admission in awake and responsive patients, and final examinations (AIS final) took place at 3 months after the trauma (Burns and Ditunno, 2001). Neurological remission was defined as an improvement of AIS grades within 3 months after the trauma. The initial AIS is illustrated in Figure 1 and Tables 1, 2.

Predictors

The individual protein and trace element concentration patterns were analyzed concerning both the initial AIS and the presence or absence of neurological remission within 3 months after the injury (Table 3).

Sample Size

Serum samples from this observational study, along with the respective clinical data of the patients have already been analyzed for different parameters in other studies by our research groups. The explorative research studies have been performed with slightly different sets of patient samples, depending on the inclusion criteria combined with the respective availability of a sufficient quantity of serum samples stored in the biobank at the time of analysis. For this reason, the numbers of patients

TABLE 1 | Descriptive depiction of patient characteristics of subjects in the study group S and the control group C.

[A]	Study Group S (N = 34)	[B]	Control Group C (N = 10)
Age		Age	
Median	41.0	Median	41.0
(IQR)	(15.0, 77.0)	(IQR)	(27.0, 71.0)
Sex		Sex	
Female	8 (23.5%)	Female	5 (50.0%)
MALE	26 (76.5%)	Male	5 (50.0%)
AIS initial		Etiology	
A	15 (44.1%)	Fall	7 (70.0%)
B	6 (17.6%)	Traffic	3 (30.0%)
C	11 (32.4%)		
D	2 (5.9%)	AO	
		A	7 (70.0%)
AIS final		B	3 (30.0%)
A	11 (32.4%)		
B	3 (8.8%)		
C	6 (17.6%)		
D	14 (41.2%)		
Etiology			
Fall	20 (58.8%)		
Other	3 (8.8%)		
Traffic	11 (32.4%)		
NLI			
Cervical	13 (38.2%)		
Lumbar	8 (23.5%)		
Thoracic	13 (38.2%)		
AO*			
A	20 (60.6%)		
B	5 (15.2%)		
C	8 (24.2%)		

NLI, Neurological Level of Injury; AO, AO-Classification; AIS, ASIA (American Spinal Injury Association) Impairment Scale. Age is expressed as median years with their corresponding IQR. *One patient in the subgroup G0 suffered an isolated contusion of the spinal cord without vertebral fracture, so no AO classification was assessed.

and samples vary across the different analyses, according to availability, volumes, and the specific scientific issue.

Missing Data

The mean follow-up of available serum samples for analysis within the first 3 days was higher than 75%; missing values were excluded from the pairwise deletion (Kang, 2013).

Statistical Analysis

Non-parametric test methods were assessed to investigate location shifts between groups (Mann-Whitney *U*-test, Kruskal-Wallis test). Categorical variables were evaluated using Fisher's exact test.

As this is an exploratory *post-hoc* analysis, all *p*-values are to be interpreted descriptively, and no adjustment for multiple testing was adopted. The statistical tests are using an α -level of 0.05, and statistical significance was defined as $p > 0.05$ (n.s.), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.001$ (***). For SELENBP1

at admission, an optimal cut-off for the differentiation between G0 and G1 was estimated based on the Odds Ratio (OR). All statistical calculations were performed with R version 4.0.2 (R Development Core Team, 2015). Figures were created by using the package "ggplot2" (Wickham, 2009).

RESULTS

A total of 44 patients were eligible for the current study, including 34 patients with neurological impairment (study group S), divided into 19 patients with remission (group G1) and 15 patients without remission (group G0). The other 10 subjects with vertebral fracture without neurological impairment (group C) served as a control group (Figure 1).

Patients

Out of all 34 patients in the study group S (G0+G1), eight were female, and 26 were male with an average age of 41 years (IQR 15, 77 years). The TSCI was caused by a fall in 59% of cases, and by accident in 32% of cases. The injuries in the control group (including five males and five females with an average age of 41 years) resulted from a fall in about 70% of cases or from an accident in the remaining 30% of cases. Within the study group S, there were no significant differences regarding age, sex, etiology, NLI or AO classification between the patients with and without neurological remission. The distribution of AIS grades between the groups G0 and G1 differed significantly both at admission ($p = 0.001$) and at discharge ($p < 0.001$). An overview of the patients' characteristics is shown in Tables 1, 2.

Biochemical Analysis of the Serum Samples

The analysis of the serum samples indicated that Se, Zn, Cu, SELENOP, SELENBP1, CP, CCL-2, CCL-3, MMP-8, MMP-10, IL-8, and IL-10 were detectable in measurable concentrations. Most of the parameters analyzed displayed impairment-dependent concentration differences according to AIS grades A vs. B-D early in the post-injury period and differed in relation to injury when comparing the groups G0 and G1 vs. C (Figure 3).

Major Findings

Serum SELENBP1 Concentrations Are Elevated With the Severity of Impairment

Increased SELENBP1 concentrations were detected especially at early time points available for analysis, i.e., directly at admission to hospital (0 h). The patients with severe injury and an AIS classification of A exhibited relatively high concentrations of SELENBP1 as compared to the other patients, suggesting a relation of acute serum SELENBP1 elevations to the severity of neurological impairment (Figure 4A).

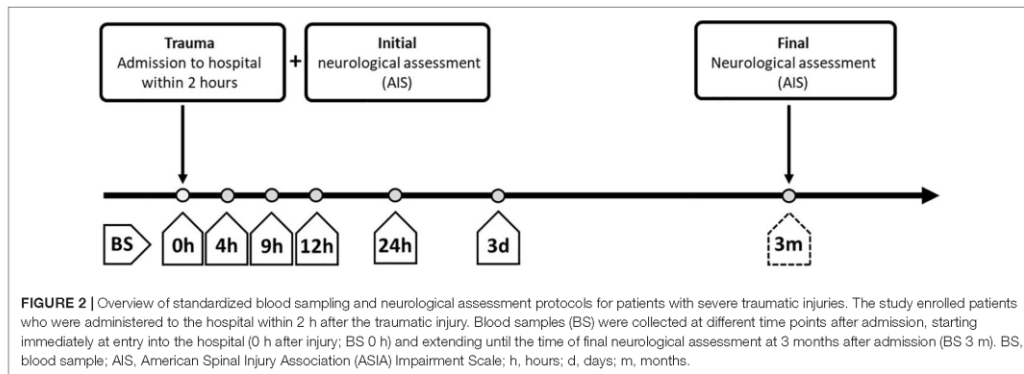
Dynamic Changes in Circulating SELENBP1 Are Related to Clinical Outcome

The SELENBP1 concentrations during the first 3 days in relation to the clinical outcome as assessed 3 months after injury differed significantly between the two groups of subjects with TSCI.

TABLE 2 | Clinical characteristics of subjects in the groups G0 (n = 15) and G1 (n = 19), and subgroups AIS A (n = 15) and AIS B-D (n = 19).

	G0 (n = 15)	G1 (n = 19)	p-value	AIS A (n = 15)	AIS B-D (n = 19)	p-value
Age			0.107			0.238
Median	47.0	32.0		44.0	34.0	
(IQR)	(21.0, 77.0)	(15.0, 75.0)		(21.0, 75.0)	(15.0, 77.0)	
Sex			1.000			1.000
Female	3 (20.0%)	5 (26.3%)		4 (26.7%)	4 (21.1%)	
Male	12 (80.0%)	14 (73.7%)		11 (73.3%)	15 (78.9%)	
AIS initial			0.001			< 0.001
A	11 (73.3%)	4 (21.1%)		15 (100.0%)	0 (0.0%)	
B	1 (6.7%)	5 (26.3%)		0 (0.0%)	6 (31.6%)	
C	1 (6.7%)	10 (52.6%)		0 (0.0%)	11 (57.9%)	
D	2 (13.3%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	2 (10.5%)	
AIS final			< 0.001			< 0.001
A	11 (73.3%)	0 (0.0%)		11 (73.3%)	0 (0.0%)	
B	1 (6.7%)	2 (10.5%)		2 (13.3%)	1 (5.3%)	
C	1 (6.7%)	5 (26.3%)		2 (13.3%)	4 (21.1%)	
D	2 (13.3%)	12 (63.2%)		0 (0.0%)	14 (73.7%)	
Etiology			0.588			0.588
Fall	9 (60.0%)	11 (57.9%)		9 (60.0%)	11 (57.9%)	
Other	2 (13.3%)	1 (5.3%)		2 (13.3%)	1 (5.3%)	
Traffic	4 (26.7%)	7 (36.8%)		4 (26.7%)	7 (36.8%)	
NLI			0.083			0.083
Cervical	4 (26.7%)	9 (47.4%)		4 (26.7%)	9 (47.4%)	
Lumbar	2 (13.3%)	6 (31.6%)		2 (13.3%)	6 (31.6%)	
Thoracic	9 (60.0%)	4 (21.1%)		9 (60.0%)	4 (21.1%)	
AO*			0.039			0.015
A	5 (35.7%)	15 (78.9%)		6 (40.0%)	14 (77.8%)	
B	4 (28.6%)	1 (5.3%)		5 (33.3%)	0 (0.0%)	
C	5 (35.7%)	3 (15.8%)		4 (26.7%)	4 (22.2%)	

The Kruskal-Wallis test for comparison of two independent samples and the Fisher's exact test were used to assess the differences in numeric and categorical variables. NLI, Neurological Level of Injury; AO, AO-Classification; AIS, ASIA (American Spinal Injury Association) Impairment Scale. Age is expressed as median years with their corresponding IQR. Neurological remission was defined as improvement in AIS within 3 months after the trauma. *One patient in the subgroup G0 suffered an isolated contusion of the lumbar spinal cord without vertebral fracture, so no AO classification was assessed.



Patients without remission in group G0 showed relatively high SELENBP1 concentrations at admission (0 h), as compared to the patients with remission in group G1, who had low concentrations throughout the full observation period. The elevated SELENBP1

concentrations in G0 decreased steadily within the first 9 h, while the low SELENBP1 levels in G1 remained constant (Figure 4B).

A direct comparison of serum SELENBP1 concentrations at the time of admission (0 h) highlights the significantly elevated

TABLE 3 | The American Spinal Injury Association Impairment Scale (AIS).

AIS grade		Clinical state
A	Complete	No motor or sensory function is preserved in the sacral segments S4-S5
B	Incomplete	Sensory but not motor function is preserved below the NLI and includes the sacral segments S4-S5
C	Incomplete	Motor function is preserved below the NLI, and more than half of key muscles below the NLI have a muscle grade less than 3
D	Incomplete	Motor function is preserved below the NLI, and at least half of key muscles below the NLI have a muscle grade of 3 or more
E	Normal	Motor and sensory function is normal

AIS grades from A to E are considering the completeness of paralysis and the motor and sensory function tests.

SELENBP1 levels in relation to the extent of the neurological impairment after TSCI, i.e., the patients with most severe injury classified by the AIS system as A displayed highest SELENBP1 (Figure 4C). The Mann-Whitney test indicated that when comparing the initial three samples with the later time points (0 h, 4 h, 9 h vs. 12 h, 24 h, 72 h) the dynamic decrease in SELENBP1 concentrations (Δ SELENBP1) was significantly greater for in G0 (no remission) (Median = 5.32) than G1 (remission) (Median = 0.99), $W = 197$, $p = 0.019$ (Figure 4D). Based on the data obtained for serum SELENBP1 concerning remission, a cut-off of 30.2 $\mu\text{g/L}$ was calculated for allocating patients either to G0 or to G1, providing 98.7% sensitivity, specificity of 12.3%, an accuracy of 58.6%, and an odds ratio of 10.4. This diagnostic cut-off is indicated as a solid line, whereas the SELENBP1 level of controls is indicated as a dashed line at 16.2 $\mu\text{g/L}$ (Figures 4A–C).

Correlation Analysis of SELENBP1 With Parameters of Se Status and Covariates in TSCI

SELENBP1 concentrations were not significantly related to the other Se status biomarkers. The interrelations were characterized by low correlation coefficients of $R = -0.012$ for SELENBP1 with total serum Se (Figure 5A), and $R = 0.110$ for SELENBP1 with SELENOP, respectively (Figure 5B). Concerning the outcome of neurological remission, the correlations of SELENBP1 with Se or SELENBP1 with SELENOP tended to point into opposite directions for patients in group G0 vs. G1 (Figures 5A,B). These findings suggest that serum SELENBP1 is not a surrogate marker of blood Se status in the patients. As expected, total serum Se and SELENOP showed the typically strong and linear interrelation with a correlation coefficient of $R = 0.76$ in the samples from patients with TSCI, irrespective of final remission (Figure 5C). Next, correlations between SELENBP1 concentrations and additional trace elements and cytokines were analyzed to identify other potential covariates. Three parameters correlated significantly with the SELENBP1 decline (Δ SELENBP1; delta 3 day–0 h), i.e., CCL-2 at 0 h ($p = 0.007$, Figure 5D), Zn at 9 h ($p = 0.027$, Figure 5E) and CCL-3 at 3 day ($p = 0.014$, Figure 5F). Concerning the clinical outcome 3 months after TSCI in the group of non-improving patients (G0), strong positive correlations of Δ SELENBP1 were observed for CCL-2 ($R = 0.66$) and CCL-3 ($R = 0.58$), and a negative correlation for Zn ($R = -0.71$). In contrast to these correlations, only moderate and non-significant interrelations

were observed in the group of recovering patients in G1 (Figures 5D–F).

Relation of Serum SELENBP1 Levels to Trace Elements and Cytokines

An explorative correlation analysis was conducted between the SELENBP1 concentrations with the analyzed trace element parameters and cytokine concentrations. A strong linear association between the initial SELENBP1 concentrations and the dynamics of SELENBP1 decline over the initial 3-day study period was observed (0 h; $R = 0.94$, 4 h; $R = 0.86$, 9 h; $R = 0.58$). To assess differences in all parameters between the groups G0 and G1 with respect to the initial AIS scores, the corresponding log-fold changes (logFC) for each point in time in G1/G0 were calculated. The analysis indicated a negative relationship between SELENBP1 and the group of chemotactic ligands CCL-2, CCL-3, and CCL-4. This interaction was most substantial when comparing the initial concentrations of the most severely impaired patients (AIS group A) in the group with remission (G1) vs. the group with no remission (G0) (Supplementary Figure 1).

DISCUSSION

The fundamental need for novel therapies improving the neurological recovery of patients who suffer from SCI remains an urgent research issue. However, specific treatments that appeared promising in a pre-clinical setting regrettably failed to show beneficial effects in clinical SCI trials (Tator, 2006). A reason for the controversial study results may be found in the underlying pathophysiological and biochemical processes that are setting in upon SCI and which may fundamentally differ in extent, dynamics and interrelation between the animal models used and the acutely injured human subjects (Kwon et al., 2015). This challenge is most difficult to address, given the paucity of molecular data on the intracellular signaling events, metabolic responses to trauma in patients and the lack of informative diagnostic biomarkers. In addition, the available instrumentation for estimating the extent of injury and predicting the outcome after a TSCI is limited, and reliability of both diagnosis and prognosis mainly depends on the experience and knowledge of the particular clinical examiner. In order to gain further insights and test candidate biomarkers, we have standardized some of

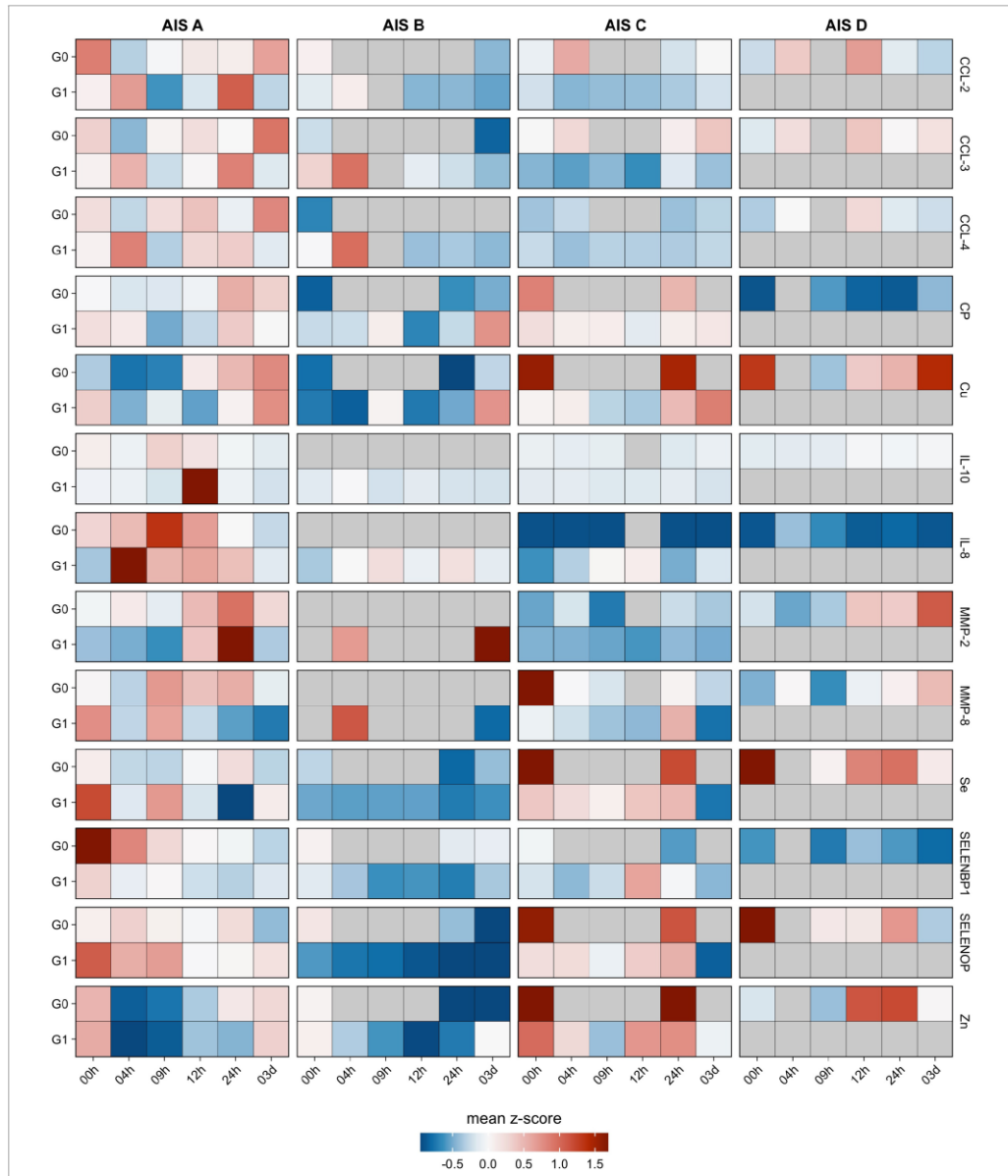
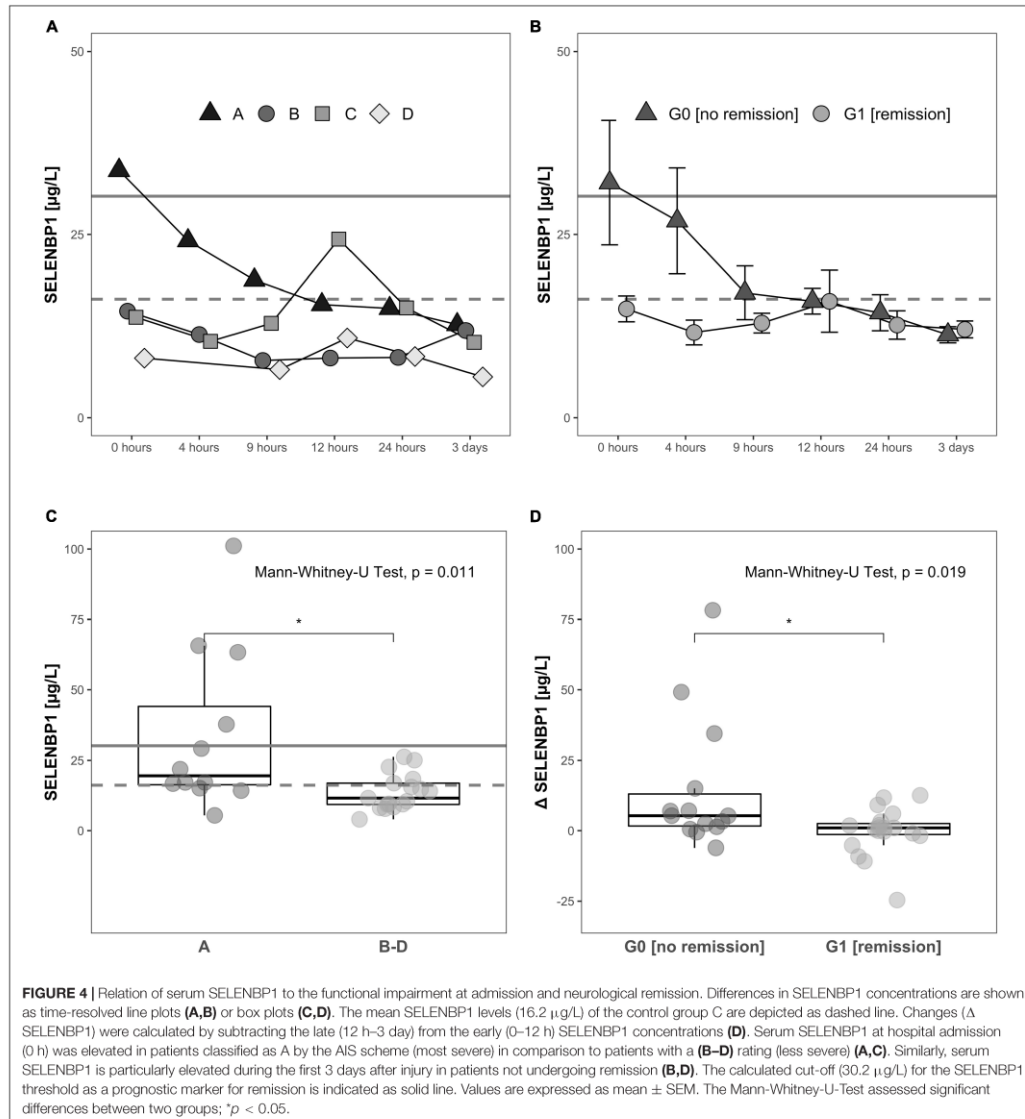


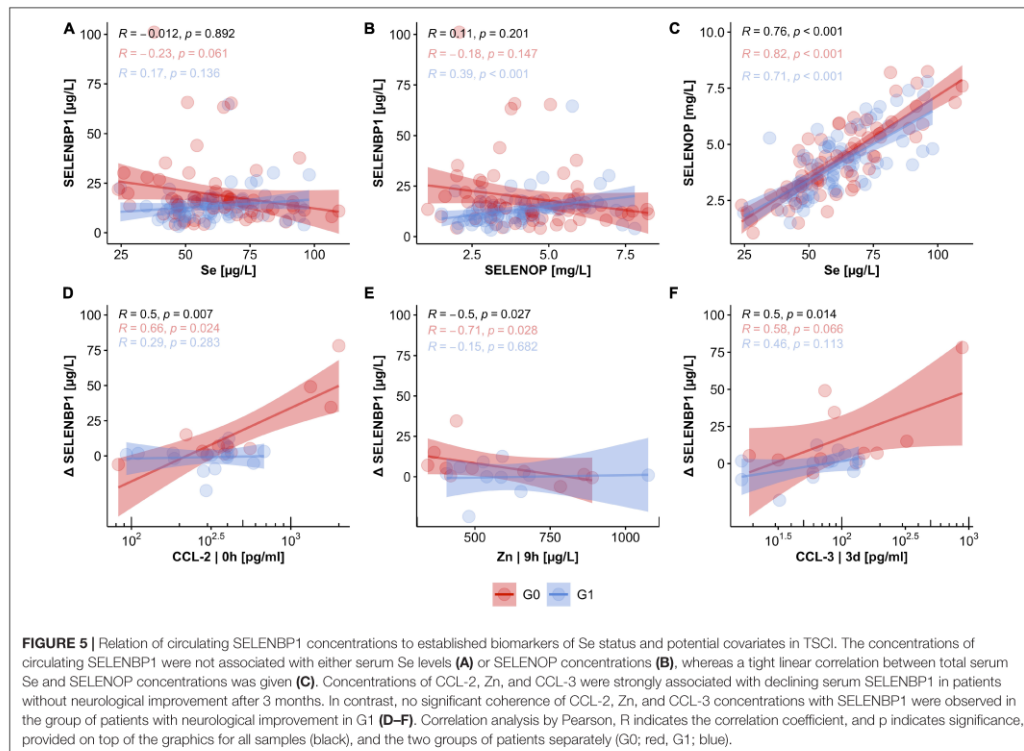
FIGURE 3 | Comparison of cytokines, metalloproteases, trace elements and related biomarkers in relation to neurological remission. The cytokines CCL-2, CCL-3, CCL-4 along with the metalloproteases MMP-2 and MMP-8 were analyzed from the serum samples of patients with TSCI in relation to remission (G1) or no remission (G0). In addition, the trace elements Cu, Fe, Se, and Zn as well as the Se-binding proteins SELENBP1 and SELENOP along with the Cu transporter CP were quantified in parallel. The heat maps indicate the relative concentration differences of these serum parameters in the two groups of TSCI patients (G0 and G1) in relation to the control group C. In addition, relative concentration differences are depicted in regard to the clinical severity of the neurological deficit, classified as AIS A–D according to the American Spinal Injury Association (AIS) impairment scale (AIS). Mean z-scores are indicated as color code.



the essential parameters and introduced a transparent blood sampling, clinical assessment and laboratory analysis scheme.

Our results suggest that the analysis of serum SELENBP1 may contribute to an improved initial clinical assessment after TSCI and may provide valuable insights into the pathophysiology and individual prognosis. Significant differences in SELENBP1 were detected with regards to degree of

neurological impairment (severe AIS A vs. AIS B-D), and with respect to the clinical outcome after 3 months (remission vs. no remission). The patients who displayed elevated serum SELENBP1 concentrations at admission (above the cut-off at 30.2 µg/L) presented with the most severe impairment (classified as AIS A) and were most unlikely to achieve neurological remission. The other severely impaired patients with the same classification



of AIS A, but with SELENBP1 below this threshold showed a high chance for recovery. Using this SELENBP1 threshold, a prediction for remission was enabled with a sensitivity of 98.7% and an odds ratio of 10.4, i.e., with a diagnostically valuable and acceptable degree of reliability.

Due to the observational nature of this study, causal interrelationships cannot be deduced. However, some knowledge of SELENBP1 is available from prior studies. SELENBP1 constitutes a highly conserved protein between species, that may be critical for specific physiological functions, potentially including cell differentiation, protein degradation, intra-Golgi vesicular transport, cell motility and redox modulation (Elhodaky and Diamond, 2018). Its expression is strongly affected by hypoxia, as shown in the context of cancer (Huang et al., 2012; Jeong et al., 2014) and cardiovascular research (Kühn et al., 2019; Kuhn-Heid et al., 2019). It would be highly interesting to study whether serum SELENBP1 is related to locally depressed oxygen levels, employing suitable monitoring techniques such as near-infrared spectroscopy (Casha and Christie, 2011; Ryken et al., 2013; Hawryluk et al., 2015). The assumption that increased SELENBP1 is related to hypoxia and cell death resulting from increased ischemia in TSCI is further supported by the positive correlation

with CCL-2 ($R = 0.66$), that is known as a hypoxia-responsive cytokine (Mojsilovic-Petrovic et al., 2007). It is also consistent with our prior study (Heller et al., 2017), where patients with no improvement in neurological function initially showed increased CCL-2 levels, with a resulting induction of monocyte migration, monocyte proliferation and differentiation (Kiguchi et al., 2010).

Previous studies indicated that peripheral trace element dynamics and concentration changes in the trace element biomarkers are associated with the clinical outcome after TSCI (Heller et al., 2019, 2020; Sperl et al., 2019; Seelig et al., 2020). It was thus hypothesized that there might be a close correlation between serum Se, SELENOP and SELENBP1 concentrations. Unexpectedly, no significant interrelation between SELENBP1 and the other Se status biomarkers was observed, neither in the group with non-remission nor in the remission group. This result highlights that SELENBP1 may not directly affect extracellular serum Se status, potentially due to its relatively low serum concentrations and the different origins of these proteins (mainly liver in case of SELENOP, kidney in case of GPX3 vs. damaged tissue in case of SELENBP1).

Due to the divergent degrees of injuries within AIS classes from A to E, SELENBP1 concentration dynamics may provide

a direct insight into the individual burden of hypoxic stress on a cellular level. Combined with additional diagnostic parameters, SELENBP1 monitoring might pave the way for a more detailed and quantitative clinical assessment strategy after TSCI, thereby supporting the established INSCCI examinations.

Future studies are required to test for a correlation of SELENBP1 dynamics with intraspinal pressure (Phang et al., 2015; Chen et al., 2018; Saadoun and Papadopoulos, 2020), and local tissue oxygenation at the injury site (Kurita et al., 2020). In addition to the sensor-derived data, SELENBP1 might also provide information about other tissues that are damaged or at-risk for degeneration, and remote from the sensor. The SELENBP1 concentrations may also reflect other sorts of injury, including micro-bleedings that might not be detectable by current imaging techniques such as MRI or CT scan. The relevance of these processes and their contribution to the global burden of injured neural tissue and the neuroinflammatory signaling in the second phase after TSCI still need to be evaluated. Recent findings support the importance of spinal cord perfusion pressure (SCPP) monitoring with respect to metabolic characteristics of the injured tissue concerning the chances of neurological remission after TSCI. The data indicate a close correlation between the individual SCPP and metabolic profiles at the injury site, estimated via tissue glucose, lactate, pyruvate, glutamate and glycerol by surface microdialysis (Saadoun and Papadopoulos, 2020). This information might support the identification of individuals with lower potential for remission, and aid in personalized therapy.

With a better characterization of the regulation and function of SELENBP1 in these tissues, its potential role in diseases such as TSCI may be better understood, and SELENBP1 may become a novel and valuable biomarker for diagnostic, monitoring, and prognostic purposes in acute and potentially also in chronic injuries.

Limitations

Despite the relevant and convincingly strong interrelations identified, the current study is not free from limitations. The sample size was relatively small, yet it was sufficient to deduce a cut-off for the early detection of patients with a high chance of neurological remission after TSCI by serum SELENBP1. Still, serum trace elements and their protein biomarkers may be surrogate markers, not necessarily affecting disease course directly or reliably reflecting the physiologically relevant intracellular trace element concentrations (Maret and Sandstead, 2006). Furthermore, the data are from an observational study, and are thus not suitable for deducing mechanistic insights. Finally, the pathophysiological and clinical heterogeneity within the AIS groups complicates the interpretation of the results and necessitates an independent verification of this newly identified biomarker in TSCI.

CONCLUSION

Our results indicate that the analysis of SELENBP1 concentrations in serum provides promising insights regarding

the early assessment of both the injury severity after TSCI in AIS A vs. B, C, or D and the individual chance of neurological remission. Monitoring serum SELENBP1 concentrations could assist clinicians in the initial assessment of patients after TSCI, especially in estimating the remission potential of severely injured patients classified as AIS A. Our results support the notion that SELENBP1 constitutes a promising marker for identifying and assessing cell damage and injury, and this potential should be investigated further in the context of other traumatic or degenerative diseases.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Local Ethics Committee of the University of Heidelberg (S514/2011). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RH, VD, AM, LS, and BB: conceptualization. JS, RH, QS, JH, LS, and BB: methodology. JS, RH, HC, and LS: software. JS, RH, PH, QS, GK, JH, HC, VD, AM, LS, and BB: visualization and data curation. JS, RH, VD, AM, LS, and BB: validation. JS, RH, HC, VD, AM, LS, and BB: formal analysis. VD, AM, LS, and BB: resources, supervision, and funding acquisition. JS, RH, LS, and BB: writing—original draft preparation. PH, QS, GK, JH, HC, VD, and AM: writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This specific project received no particular grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Analyses in the lab of LS are supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Research Unit FOR-2558 "TraceAge" (Scho 849/6-2), and CRC/TR 296 "Local control of TH action" (LocoTact, P17). We gratefully acknowledge the funding received toward the doctoral thesis of RH from the Oskar-Helene-Heim Foundation, Berlin, Germany, and the financial support by the Open Access Publication Fund of Charité—Universitätsmedizin Berlin.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martina Kutsche-Bauer, Regina Seemuth, Silja Petersen, Marion Miltz, Anja Brüchig, Christian Unterrainer,

Institute of Immunology, Heidelberg University Hospital, and Vartitér Seher, Gabriele Boehm, and Anja Fischbach, Institute for Experimental Endocrinology, Charité Berlin, for their excellent technical support. We would also like to acknowledge the patients and controls for participating in this study. Essential inspiration and intellectual support are provided by Eike Kühn and Patricio Lopez, Institute for Experimental Endocrinology, Charité Berlin. Valuable and inspiring colleagues from both the International Spinal Cord Society (ISCOs) and the International Society for Selenium

Research (ISSR) contributed to the interpretation in encouraging discussions. The presented results are part of the doctoral thesis of JS and RH.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.680240/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Avery, J. C., and Hoffmann, P. R. (2018). Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients* 10:1203. doi: 10.3390/nu10091203
- Baptiste, D. C., and Fehlings, M. G. (2006). Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J. Neurotrauma*. 23, 318–334. doi: 10.1089/neu.2006.23.318
- Besold, A. N., Culbertson, E. M., and Culotta, V. C. (2016). The yin and yang of copper during infection. *J. Biol. Inorg. Chem.* 21, 137–144. doi: 10.1007/s00775-016-1335-1
- Burns, A. S., and Ditunno, J. F. (2001). Establishing prognosis and maximizing functional outcomes after spinal cord injury: a review of current and future directions in rehabilitation management. *Spine (Phila Pa 1976)* 26 (Suppl. 24), S137–S145.
- Casha, S., and Christie, S. (2011). A systematic review of intensive cardiopulmonary management after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*. 28, 1479–1495. doi: 10.1089/neu.2009.1156
- Chen, S., Gallagher, M. J., Papadopoulos, M. C., and Saadoun, S. (2018). Non-linear dynamical analysis of intraspinal pressure signal predicts outcome after spinal cord injury. *Front. Neurol.* 9:493.
- Diamond, A. M. (2015). The subcellular location of selenoproteins and the impact on their function. *Nutrients* 7, 3938–3948. doi: 10.3390/nu7053938
- Elhodaky, M., and Diamond, A. M. (2018). Selenium-binding protein 1 in human health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3437. doi: 10.3390/ijms19113437
- Furlan, J. C., Sakakibara, B. M., Miller, W. C., and Krassioukov, A. V. (2013). Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. *Canad. J. Neurol. Sci. Le J. Canad. Des Sci. Neurol.* 40, 456–464.
- Hackler, J., Wisniewska, M., Greifenstein-Wiehe, L., Minich, W. B., Cremer, M., Bührer, C., et al. (2020). Copper and selenium status as biomarkers of neonatal infections. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 58:126437. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126437
- Hawrylyk, G., Whetstone, W., Saigal, R., Ferguson, A., Talbot, J., Bresnahan, J., et al. (2015). Mean arterial blood pressure correlates with neurological recovery after human spinal cord injury: analysis of high frequency physiologic data. *J. Neurotrauma*. 32, 1958–1967. doi: 10.1089/neu.2014.3778
- Heller, R. A., Raven, T. F., Swing, T., Kunzmann, K., Daniel, V., Haubruck, P., et al. (2017). CCL-2 as a possible early marker for remission after traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord*. 55, 1002–1009. doi: 10.1038/sc.2017.69
- Heller, R. A., Seelig, J., Bock, T., Haubruck, P., Grutzner, P. A., Schomburg, L., et al. (2019). Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 51, 141–149. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.10.006
- Heller, R. A., Sperl, A., Seelig, J., Haubruck, P., Bock, T., Werner, T., et al. (2020). Zinc concentration dynamics indicate neurological impairment odds after traumatic spinal cord injury. *Antioxidants (Basel)* 9:421. doi: 10.3390/antiox9050421
- Huang, C., Ding, G., Gu, C., Zhou, J., Kuang, M., Ji, Y., et al. (2012). Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 α to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin. Cancer Res.* 18, 3042–3053. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-12-0183
- Hughes, D. J., Duarte-Salles, T., Hybsier, S., Trichopoulou, A., Stepien, M., Aleksandrova, K., et al. (2016). Prediagnostic selenium status and hepatobiliary cancer risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 104, 406–414.
- Hughes, D. J., Kunická, T., Schomburg, L., Liška, V., Swan, N., and Souček, P. (2018). Expression of selenoprotein genes and association with selenium status in colorectal adenoma and colorectal cancer. *Nutrients* 10:1812. doi: 10.3390/nu10111812
- Hybsier, S., Schulz, T., Wu, Z., Demuth, I., Minich, W. B., Renko, K., et al. (2017). Sex-specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. *Redox Biol.* 11, 403–414. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.025
- Jeong, J. Y., Zhou, J. R., Gao, C., Feldman, L., and Sytkowski, A. J. (2014). Human selenium binding protein-1 (hSP56) is a negative regulator of HIF-1 α and suppresses the malignant characteristics of prostate cancer cells. *BMB Rep.* 47, 411–416. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.7.104
- Kang, H. (2013). The prevention and handling of the missing data. *Korean. J. Anesthesiol.* 64, 402–406. doi: 10.4097/kjae.2013.64.5.402
- Kielczykowska, M., Kocot, J., Pądzior, M., and Musik, I. (2018). Selenium - a fascinating antioxidant of protective properties. *Adv Clin Exp Med.* 27, 245–255. doi: 10.17219/acem/67222
- Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y., and Kishioka, S. (2010). Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation. *Pain* 149, 305–315. doi: 10.1016/j.pain.2010.02.025
- Kühn, E. C., Slagman, A., Kühn-Heid, E. C. D., Seelig, J., Schwiebert, C., Minich, W. B., et al. (2019). Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 52, 247–253. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.01.005
- Kühn-Heid, E. C. D., Kühn, E. C., Ney, J., Wendt, S., Seelig, J., Schwiebert, C., et al. (2019). Selenium-binding protein 1 indicates myocardial stress and risk for adverse outcome in cardiac surgery. *Nutrients* 11:2005. doi: 10.3390/nu11092005
- Kurita, T., Kawashima, S., Morita, K., and Nakajima, Y. (2020). Spinal cord autoregulation using near-infrared spectroscopy under normal, hypovolemic, and post-fluid resuscitation conditions in a swine model: a comparison with cerebral autoregulation. *J. Intensive Care.* 8:27.
- Kwon, B. K., Bloom, O., Wanner, I. B., Curt, A., Schwab, J. M., Fawcett, J., et al. (2019). Neurochemical biomarkers in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 57, 819–831. doi: 10.1038/s41393-019-0319-8
- Kwon, B. K., Streijger, F., Hill, C. E., Anderson, A. J., Bacon, M., Beattie, M. S., et al. (2015). Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies. *Exp. Neurol.* 269, 154–168.
- Kwon, B. K., Tetzlaff, W., Grauer, J. N., Beiner, J., and Vaccaro, A. R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 4, 451–464. doi: 10.1016/j.spinee.2003.07.007
- Lansdown, A. B., Mirastschijski, U., Stubbs, N., Scanlon, E., and Agren, M. S. (2007). Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen.* 15, 2–16. doi: 10.1111/j.1524-475x.2006.00179.x
- Levenson, C. W. (2005). Zinc supplementation: neuroprotective or neurotoxic? *Nutr. Rev.* 63, 122–125. doi: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00130.x
- Lewandowski, L., Kepinska, M., and Milnerowicz, H. (2019). The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 49:e13036. doi: 10.1111/eci.13036
- Ma, E. Y., Heffern, K., Cheres, J., and Gallagher, E. P. (2018). Differential copper-induced death and regeneration of olfactory sensory neuron populations and neurobehavioral function in larval zebrafish. *Neurotoxicology*. 69, 141–151. doi: 10.1016/j.neuro.2018.10.002

- Magerl, F., Aebi, M., Gertzbein, S. D., Harms, J., and Nazarian, S. (1994). A comprehensive classification of thoracic and lumbar injuries. *Eur. Spine J.* 3, 184–201. doi: 10.1007/bf02221591
- Maret, W., and Sandstead, H. H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 3–18. doi: 10.1016/j.jtemb.2006.01.006
- Moghaddam, A., Child, C., Bruckner, T., Gerner, H. J., Daniel, V., and Biglari, B. (2015). Posttraumatic inflammation as a key to neuroregeneration after traumatic spinal cord injury. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7900–7916. doi: 10.3390/ijms16047900
- Mohammadi, A., Rashidi, E., and Amooeian, V. G. (2018). Brain, blood, cerebrospinal fluid, and serum biomarkers in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 265, 25–38. doi: 10.1016/j.psychres.2018.04.036
- Mojisilovic-Petrovic, J., Callaghan, D., Cui, H., Dean, C., Stanimirovic, D. B., and Zhang, W. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J. Neuroinflammation.* 4:12. doi: 10.1186/1742-2094-4-12
- Norenberg, M. D., Smith, J., and Marcillo, A. (2004). The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J. Neurotrauma.* 21, 429–440. doi: 10.1089/089771504323004575
- Phang, I., Werndle, M. C., Saadoun, S., Varsos, G., Czosnyka, M., Zoumprouli, A., et al. (2015). Expansion duroplasty improves intraspinal pressure, spinal cord perfusion pressure, and vascular pressure reactivity index in patients with traumatic spinal cord injury: injured spinal cord pressure evaluation study. *J. Neurotrauma.* 32, 865–874. doi: 10.1089/neu.2014.3668
- Pol, A., Renkema, G. H., Tangerman, A., Winkel, E. G., Engelke, U. F., de Brouwer, A. P. M., et al. (2018). Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nat. Genet.* 50, 120–129. doi: 10.1038/s41588-017-0006-7
- R Development Core Team. (2015). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rowland, J. W., Hawryluk, G. W., Kwon, B., and Fehlings, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus.* 25, E2.
- Ryken, T. C., Hurlbert, R. J., Hadley, M. N., Aarabi, B., Dhall, S. S., Gelb, D. E., et al. (2013). The acute cardiopulmonary management of patients with cervical spinal cord injuries. *Neurosurgery* 72(Suppl 2), 84–92.
- Saadoun, S., and Papadopoulos, M. C. (2020). Targeted perfusion therapy in spinal cord trauma. *Neurotherapeutics* 17, 511–521. doi: 10.1007/s13311-019-00820-6
- Schott, M., de Jel, M. M., Engelmann, J. C., Renner, P., Geissler, E. K., Bosserhoff, A. K., et al. (2018). Selenium-binding protein 1 is down-regulated in malignant melanoma. *Oncotarget* 9, 10445–10456. doi: 10.18632/oncotarget.23853
- Seelig, J., Heller, R. A., Hackler, J., Haubruck, P., Moghaddam, A., Biglari, B., et al. (2020). Selenium and copper status - potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 57:126415. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126415
- Shadgan, B., Macnab, A., Fong, A., Manouchehri, N., So, K., Shortt, K., et al. (2019). Optical assessment of spinal cord tissue oxygenation using a miniaturized near infrared spectroscopy sensor. *J. Neurotrauma.* 36, 3034–3043. doi: 10.1089/neu.2018.6208
- Sperl, A., Heller, R. A., Biglari, B., Haubruck, P., Seelig, J., Schomburg, L., et al. (2019). The role of magnesium in the secondary phase after traumatic spinal cord injury: a prospective clinical observer study. *Antioxidants (Basel)* 8:509. doi: 10.3390/antiox8110509
- Spinal Cord Injury (SCI). (2016). *Facts and Figures at a Glance*. Available online at: <https://www.nscisc.nab.edu/Public/Facts%202016.pdf> (accessed May 22, 2017)
- Steinbrenner, H., Micoogullari, M., Hoang, N. A., Bergheim, I., Klotz, L. O., and Sies, H. (2019). Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is a marker of mature adipocytes. *Redox Biol.* 20, 489–495. doi: 10.1016/j.redox.2018.11.004
- Tator, C. H. (2006). Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery* 59, 957–82;discussion82–7.
- von Elm, E., Altman, D. G., Egger, M., Pocock, S. J., Gotsche, P. C., Vandenbroucke, J. P., et al. (2008). The strengthening of reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J. Clin. Epidemiol.* 61, 344–349. doi: 10.1016/j.jclinepi.2007.11.008
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, NY: Springer-Verlag.
- Yan, J., and Barrett, J. N. (1998). Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P. *J. Neurosci.* 18, 8682–8691. doi: 10.1523/jneurosci.18-21-08682.1998
- Zhang, Z. H., Chen, C., Jia, S. Z., Cao, X. C., Liu, M., Tian, J., et al. (2020). Selenium restores synaptic deficits by modulating NMDA receptors and selenoprotein k in an alzheimer's disease model. *Antioxid Redox Signal* [Epub ahead of print].

Conflict of Interest: LS holds shares in selenOmed GmbH, a company involved in Se status assessment and supplementation.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Seelig, Heller, Haubruck, Sun, Klüngenberg, Hackler, Crowell, Daniel, Moghaddam, Schomburg and Biglari. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Seelig et al. 2020

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"ENDOCRINOLOGY and METABOLISM"**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 143 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Cell Metabolism	29,834	20.565	0.101740
2	Nature Reviews Endocrinology	7,377	20.265	0.025190
3	Lancet Diabetes & Endocrinology	5,549	19.313	0.029810
4	ENDOCRINE REVIEWS	12,975	15.545	0.009920
5	DIABETES CARE	67,278	13.397	0.110140
6	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	9,079	11.613	0.008600
7	TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	8,362	10.769	0.019900
8	Obesity Reviews	10,241	8.483	0.023840
9	THYROID	11,570	7.557	0.020730
10	DIABETES	53,645	7.273	0.074690
11	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,924	6.875	0.006040
12	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	19,324	6.530	0.032120
13	JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH	26,804	6.314	0.036920
14	Molecular Metabolism	2,403	6.291	0.012250
15	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,450	6.045	0.028280
16	DIABETOLOGIA	28,810	6.023	0.048370
17	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	40,089	6.020	0.043060
18	DIABETES OBESITY & METABOLISM	8,680	5.980	0.022060
19	METABOLISM—CLINICAL AND EXPERIMENTAL	13,117	5.963	0.016570
20	JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	78,047	5.789	0.104690
21	ENDOCRINE-RELATED CANCER	7,114	5.331	0.012410
22	Cardiovascular Diabetology	4,796	5.235	0.011190
23	INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY	22,185	5.151	0.032040
24	NEUROENDOCRINOLOGY	4,670	5.024	0.005340
25	REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS	2,004	4.963	0.003780
26	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	16,507	4.731	0.030420
27	CURRENT OPINION IN CLINICAL NUTRITION AND METABOLIC CARE	4,842	4.534	0.007130
28	BONE	21,280	4.455	0.028800
29	HORMONES AND BEHAVIOR	11,304	4.418	0.015540
30	BEST PRACTICE & RESEARCH CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	3,757	4.417	0.006270

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
31	EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	13,207	4.333	0.021710
32	JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	10,325	4.095	0.012650
33	JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE	5,683	4.092	0.009470
34	Obesity	17,578	4.042	0.037840
35	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	18,777	4.018	0.022800
36	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	11,319	4.012	0.012120
37	Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism	421	3.978	0.001200
38	ENDOCRINOLOGY	43,605	3.961	0.040710
39	DIABETES-METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS	4,659	3.904	0.009200
40	OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL	16,379	3.856	0.025490
41	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	3,849	3.853	0.006100
42	Endocrine Practice	4,219	3.805	0.009860
43	MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM	7,103	3.774	0.012380
44	JOURNAL OF TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY	2,994	3.755	0.004390
45	DIABETES & METABOLISM	3,343	3.744	0.004630
46	Current Osteoporosis Reports	1,348	3.726	0.003650
47	Diabetes & Metabolism Journal	1,222	3.710	0.003720
48	MOLECULAR ENDOCRINOLOGY	12,103	3.678	0.011990
49	Current Diabetes Reports	3,258	3.568	0.010320
50	MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY	15,087	3.563	0.025610
51	Biology of Sex Differences	855	3.543	0.003530
52	Frontiers in Endocrinology	3,924	3.519	0.014600
53	Metabolomics	3,861	3.511	0.009750
54	JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY	5,766	3.392	0.007640
55	PROSTATE	7,414	3.347	0.009420
56	Diabetes & Vascular Disease Research	1,253	3.340	0.003320
57	NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES	5,131	3.318	0.009970
58	JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY	3,900	3.297	0.006270
59	CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL	6,817	3.293	0.008100
60	Vitamins and Hormones	1,592	3.286	0.001750
61	Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity	2,118	3.279	0.005610

Seelig J, Heller RA, Hackler J, Haubruck P, Moghaddam A, Biglari B, Schomburg L. Selenium and copper status - potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury. *J Trace Elem Med Biol.* 2020 Jan;57:126415.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126415>

Heller et al. 2019

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"ENDOCRINOLOGY and METABOLISM"**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 143 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Cell Metabolism	29,834	20.565	0.101740
2	Nature Reviews Endocrinology	7,377	20.265	0.025190
3	Lancet Diabetes & Endocrinology	5,549	19.313	0.029810
4	ENDOCRINE REVIEWS	12,975	15.545	0.009920
5	DIABETES CARE	67,278	13.397	0.110140
6	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	9,079	11.613	0.008600
7	TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	8,362	10.769	0.019900
8	Obesity Reviews	10,241	8.483	0.023840
9	THYROID	11,570	7.557	0.020730
10	DIABETES	53,645	7.273	0.074690
11	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,924	6.875	0.006040
12	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	19,324	6.530	0.032120
13	JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH	26,804	6.314	0.036920
14	Molecular Metabolism	2,403	6.291	0.012250
15	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,450	6.045	0.028280
16	DIABETOLOGIA	28,810	6.023	0.048370
17	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	40,089	6.020	0.043060
18	DIABETES OBESITY & METABOLISM	8,680	5.980	0.022060
19	METABOLISM—CLINICAL AND EXPERIMENTAL	13,117	5.963	0.016570
20	JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	78,047	5.789	0.104690
21	ENDOCRINE-RELATED CANCER	7,114	5.331	0.012410
22	Cardiovascular Diabetology	4,796	5.235	0.011190
23	INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY	22,185	5.151	0.032040
24	NEUROENDOCRINOLOGY	4,670	5.024	0.005340
25	REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS	2,004	4.963	0.003780
26	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	16,507	4.731	0.030420
27	CURRENT OPINION IN CLINICAL NUTRITION AND METABOLIC CARE	4,842	4.534	0.007130
28	BONE	21,280	4.455	0.028800
29	HORMONES AND BEHAVIOR	11,304	4.418	0.015540
30	BEST PRACTICE & RESEARCH CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	3,757	4.417	0.006270

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
31	EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	13,207	4.333	0.021710
32	JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	10,325	4.095	0.012650
33	JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE	5,683	4.092	0.009470
34	Obesity	17,578	4.042	0.037840
35	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	18,777	4.018	0.022800
36	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	11,319	4.012	0.012120
37	Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism	421	3.978	0.001200
38	ENDOCRINOLOGY	43,605	3.961	0.040710
39	DIABETES-METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS	4,659	3.904	0.009200
40	OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL	16,379	3.856	0.025490
41	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	3,849	3.853	0.006100
42	Endocrine Practice	4,219	3.805	0.009860
43	MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM	7,103	3.774	0.012380
44	JOURNAL OF TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY	2,994	3.755	0.004390
45	DIABETES & METABOLISM	3,343	3.744	0.004630
46	Current Osteoporosis Reports	1,348	3.726	0.003650
47	Diabetes & Metabolism Journal	1,222	3.710	0.003720
48	MOLECULAR ENDOCRINOLOGY	12,103	3.678	0.011990
49	Current Diabetes Reports	3,258	3.568	0.010320
50	MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY	15,087	3.563	0.025610
51	Biology of Sex Differences	855	3.543	0.003530
52	Frontiers in Endocrinology	3,924	3.519	0.014600
53	Metabolomics	3,861	3.511	0.009750
54	JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY	5,766	3.392	0.007640
55	PROSTATE	7,414	3.347	0.009420
56	Diabetes & Vascular Disease Research	1,253	3.340	0.003320
57	NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES	5,131	3.318	0.009970
58	JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY	3,900	3.297	0.006270
59	CALCIFIED TISSUE INTERNATIONAL	6,817	3.293	0.008100
60	Vitamins and Hormones	1,592	3.286	0.001750
61	Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity	2,118	3.279	0.005610

Heller RA, Seelig J, Bock T, Haubruck P, Grützner PA, Schomburg L, Moghaddam A, Biglari B. Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury. *J Trace Elem Med Biol.* 2019 Jan;51:141-149. PMID: 30466924.

<https://doi.org/10.1016/j.itemb.2018.10.006>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Julian Seelig[†], Raban Arved Heller[†], Patrick Haubruck, Qian Sun, Jochen Georg Klingenberg, Julian Hackler, Helena Lucia Crowell, Volker Daniel, Arash Moghaddam, Lutz Schomburg, Bahram Biglari. *Selenium-Binding Protein 1 (SELENBP1) as Biomarker for Adverse Clinical Outcome After Traumatic Spinal Cord Injury*. *Frontiers in Neuroscience* 2021, 28;15:680240.

2020 Journal Impact Factor: 4,68

Raban Arved Heller, **Julian Seelig**, Helena Lucia Crowell, Maximilian Pilz, Patrick Haubruck, Qian Sun, Lutz Schomburg, Volker Daniel, Arash Moghaddam, Bahram Biglari. *Predicting neurological recovery after traumatic spinal cord injury by time-resolved analysis of monocyte subsets*. *Brain* 2021, 22: awab203.

2020 Journal Impact Factor: 13,50

Safak Gül-Klein, Deana Haxhiraj, **Julian Seelig**, Anika Kästner, Julian Hackler, Qian Sun, Raban Arved Heller, Nils Lachmann, Johann Pratschke, Moritz Schmelzle, Lutz Schomburg. *Serum Selenium Status as a Diagnostic Marker for the Prognosis of Liver Transplantation*. *Nutrients* 2021, 14;13(2):619.

2020 Journal Impact Factor: 5,71

Raban Arved Heller[†], Qian Sun[†], Julian Hackler[†], **Julian Seelig**[†], Linda Seibert, Asan Cherkezov, Waldemar B Minich, Petra Seemann, Joachim Diegmann, Maximilian Pilz, Manuel Bachmann, Alireza Ranjbar, Arash Moghaddam, Lutz Schomburg. *Prediction of survival odds in COVID-19 by zinc, age and selenoprotein P as composite Biomarker*. *Redox Biology* 2021, 38:101764.

2020 Journal Impact Factor: 11,79

Arash Moghaddam, Raban Arved Heller, Qian Sun, **Julian Seelig**, Asan Cherkezov, Linda Seibert, Julian Hackler, Petra Seemann, Joachim Diegmann, Maximilian Pilz, Manuel Bachmann, Waldemar B Minich, Lutz Schomburg. *Selenium Deficiency is Associated with Mortality Risk from COVID-19*. *Nutrients* 2020, 16;12(7):2098.

2020 Journal Impact Factor: 5,71

Raban Arved Heller, André Sperl, **Julian Seelig**, Patrick Haubruck, Tobias Bock, Theresa Werner, Albert Besseling, Qian Sun, Lutz Schomburg, Arash Moghaddam, Bahram Biglari. *Zinc Concentration Dynamics Indicate Neurological Impairment Odds After Traumatic Spinal Cord Injury*. *Antioxidants* 2020, 13;9(5):E42.

2020 Journal Impact Factor: IF 6,31

Julian Seelig, Raban Arved Heller, Julian Hackler, Patrick Haubruck, Arash Moghaddam, Bahram Biglari, Lutz Schomburg. *Selenium and copper status – potential signposts for neurological remission after traumatic spinal cord injury*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2020, 57:126415.

2020 Journal Impact Factor 3,85

André Sperl, Raban Arved Heller, Bahram Biglari, Patrick Haubruck, **Julian Seelig**, Lutz Schomburg, Tobias Bock, Arash Moghaddam. *The Role of Magnesium in the Secondary Phase After Traumatic Spinal Cord Injury. A Prospective Clinical Observer Study*. Antioxidants 2019 Oct 24;8(11).

2020 Journal Impact Factor: IF 6,31

Ellen C D Kühn-Heid, Eike C Kühn, Julia Ney, Sebastian Wendt, **Julian Seelig**, Christian Schwiebert, Waldemar B Minich, Christian Stoppe, Lutz Schomburg. *Selenium-Binding Protein 1 Indicates Myocardial Stress and Risk for Adverse Outcome in Cardiac Surgery*. Nutrients 2019, 25;11(9).

2020 Journal Impact Factor 5,71

Eike Christian Kühn, Anna Slagman, Ellen C D Kühn-Heid, **Julian Seelig**, Christian Schwiebert, Waldemar B Minich, Christian Stoppe, Martin Möckel, Lutz Schomburg. *Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2019, 52:247-253.

2020 Journal Impact Factor 3,85

Raban Arved Heller, **Julian Seelig**, Tobias Bock, Patrick Haubruck, Paul Alfred Grützner, Lutz Schomburg, Arash Moghaddam, Bahram Biglari. *Relation of selenium status to neuro-regeneration after traumatic spinal cord injury*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2019, 51:141-149.

2020 Journal Impact Factor 3,85

† gleichberechtigte Autoren

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg herzlichst bedanken. Seit meiner Vorstellung im März 2017 betreute mich Prof. Schomburg jederzeit in einer höchst wertschätzenden, konstruktiven und professionellen Art und Weise. Mit der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe erhielt ich die Möglichkeit fundierte Einblicke in die Forschungsabläufe klinischer und labortechnischer Studien zu erlangen sowie die Freiräume eigene Ideen und Forschungsansätze zu entwickeln und einzubringen. Ich möchte mich herzlichst für die Geduld, die zahlreichen Gespräche, den ausgesprochen angenehmen zwischenmenschlichen Umgang und die motivierende Unterstützung bedanken.

Ein ebenso großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Schomburg. Anja Fischbach, Gabriele Boehm und Dr. Eddy Rijntjes haben mich ab Tag eins wärmstens aufgenommen und standen mir bei Fragen und Problemen stets zur Seite. Im Besonderen möchte ich mich dabei bei Qian Sun, Vartiter Seher, Julian Hackler und Raban Heller bedanken. Sie waren ein großer Faktor für die Entwicklung meiner eigenen Fähigkeiten, in der Bewältigung der Herausforderungen meiner Dissertation und für meine Begeisterung an wissenschaftlichen Tätigkeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Arash Moghaddam, PD und Dr. Bahram Biglari sowie allen beteiligten Patient*innen bedanken, ohne deren Unterstützung die Erstellung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin. Ohne eure permanente Unterstützung, euren Rückhalt und eure Motivation stünde ich nicht dort, wo ich nun stehe. Euch widme ich diese Arbeit.