

**Aus der Klinik für kleine Klautiere
und forensische Medizin und Ambulatorische Klinik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Labordiagnostische Untersuchungen zum
Selenstoffwechsel von Schafen unter Berücksichtigung des
ovinen Lungenadenokarzinoms**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der VENIA LEGENDI
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

**vorgelegt von
Dr. med. vet. Esther Humann-Ziehank**

Hannover 2013

Tag der nichtöffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 14. Juli 2014



Für Lotte, Jonas und Christian



Inhaltsverzeichnis

1. Liste der verwendeten Publikationen.....	6
2. Abkürzungsverzeichnis.....	7
3. Einleitung.....	9
3.1. Präanalytik.....	9
3.2. Selen.....	10
3.2.1. Nutritive Selenversorgung der Säugetiere.....	10
3.2.2. Selenmangel – nur ein Phänomen bei Nutztieren?.....	12
3.2.3. Selenoproteine.....	12
3.2.4. Selen-assoziierte Enzyme.....	13
3.2.5. Selen in der Krebsforschung.....	13
3.3. Ovine Pulmonary Adenocarcinoma.....	15
4. Frage- und Aufgabenstellungen.....	17
5. Ergebnisse.....	18
5.1. Präanalytik.....	18
5.2. Selenversorgung deutscher Schafherden.....	19
5.3. Einfluss des Selenstatus auf die Progression der OPA – eine Pilotstudie.....	20
5.3.1. Score-basierte Quantifizierung der Lungentumorprogression mittels Computertomographie.....	20
5.3.2. Konzeption des Studienmodells: OPA – nutritive Selenversorgung.....	21
5.3.3. Ergebnisse der Langzeitstudie zur Lungentumorproliferation bei marginaler und bedarfsgerechter nutritiver Selenversorgung.....	21
5.4. Auswirkungen einer marginalen und einer bedarfsgerechten Selenversorgung auf Parameter des Selenstoffwechsels in Blut und Organen der Schafe.....	24
6. Übergreifende Diskussion.....	27
6.1. Bedeutung der Präanalytik in der labordiagnostischen Untersuchung von Blutproben bei Nutztieren.....	27
6.2. Selen in der Ernährung.....	28
6.3. Selen in der tierärztlichen Bestandsbetreuung.....	28
6.4. Parameter des Selenstoffwechsels in Blut und Organen der Schafe.....	30
6.5. Eine Schafkrankheit als onkologisches Modell – Beeinflusst der Selenstatus die Progression der OPA?.....	34
6.6. Wissenschaftlicher Ausblick.....	36
7. Zusammenfassung.....	38
8. Summary.....	41
9. Literaturverzeichnis.....	44
10. Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen.....	53
11. Anhang.....	55

1. Liste der verwendeten Publikationen

1. HUMANN-ZIEHANK, E. and M. GANTER: (2012): Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. *Animal* 6, 1115–1123
2. HUMANN-ZIEHANK, E., TEGTMEYER P. C., SEELIG, B., ROEHRIG, P and M. GANTER (2013): Variation of serum selenium concentrations in German sheep flocks and implications for herd health management consultancy. *Acta Vet Scand* 55: 82. doi:10.1186/1751-0147-55-82
3. HUMANN-ZIEHANK, E., C. BRAUER, A. KUKS, A. ANDREAE, M. BRUEGMANN and M. GANTER (2011): Imaging and score-based quantification of ovine pulmonary adenocarcinoma using computed tomography as an additional tool in advanced clinical diagnostic. *Small Rumin Res* 96, 201-210
4. HUMANN-ZIEHANK, E., WOLF, P., RENKO, K., SCHOMBURG, L., BRUEGMANN, L. M., ANDREAE, A., BRAUER, C. and M. GANTER (2011): Ovine pulmonary adenocarcinoma as an animal model of progressive lung cancer and the impact of nutritional selenium supply. *J Trace Elem Med Biol* 25, S30-S34
5. HUMANN-ZIEHANK, E., RENKO, K., BRUEGMANN, M.L., DEVI, V.R., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., ANDREAE, A. and M. GANTER (2013): Long-term study of ovine pulmonary adenocarcinogenesis in sheep with marginal vs. sufficient nutritional selenium supply: results from computed tomography, pathology, immunohistochemistry, JSRV-PCR and lung biochemistry. *J Trace Elem Med Biol* 27, 391-399.
6. HUMANN-ZIEHANK, E., RENKO, K. MUELLER, A.S., ROEHRIG, P., WOLFSEN, J. and M. GANTER (2013): Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep. *J Trace Elem Med Biol* 27, 380-390.

Der eigene Anteil an den Publikationen ist in Kapitel 10 dargestellt

2. Abkürzungsverzeichnis

aGST	Glutathion-S-transferase alpha
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BCS	Body condition score
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer
Dio	Iodothyronin deiodinase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fHb	freies Hämoglobin
FS	Frischsubstanz
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie
GPx	Glutathionperoxidase
GST	Glutathion-S-Transferase
Hb	Hämoglobin
IQR	Interquartilsabstand (p25-p75)
JSRV	Jaagsiekte Sheep Retrovirus
LAPC	lung alveolar proliferating cell
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messengerRNA
mw	Mittelwert
OPA	ovine pulmonary adenocarcinoma
PCR	polymerase chain reaction
sd	Standardabweichung
Se-	Gruppe mit marginaler Selenkonzentration in der Futter-Gesamtration
Se	Selen
Se+	Gruppe mit bedarfsgerechter Selenkonzentration in der Futter-Gesamtration
SePP	Selenoprotein P
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
TS	Trockensubstanz
Zn	Zink

3. Einleitung

3.1. Präanalytik

Der enorme technische Fortschritt hat im Bereich der klinischen Labordiagnostik in den letzten Jahren umfangreiche Veränderungen und Entwicklungen ermöglicht. Sowohl der Probenumfang als auch die analytischen Standards haben sich im Zuge dieser Entwicklung deutlich erhöht. In der veterinärmedizinischen Labordiagnostik muss zudem den speziesspezifischen Besonderheiten spezielle Beachtung geschenkt werden. Auch wenn heutzutage in kürzester Zeit Untersuchungsergebnisse von Blutproben „schwarz auf weiß“ vorliegen, ist zu bedenken, dass zahlreiche Faktoren das Ergebnis beeinflussen können.

Ein erheblicher Einfluss auf das Untersuchungsergebnis von Blutproben findet bereits in der präanalytischen Phase statt, also vor der eigentlichen Untersuchung der Probe im Labor. Studien aus der Humanmedizin zeigen, dass Mängel in der Probengewinnung, Behandlung und Lagerung den weitaus größten Anteil der Fehler im gesamten labordiagnostischen Prozess ausmachen (Lippi et al., 2006). Die Präanalytik in der Veterinärmedizin umfasst die folgenden Bereiche: Auswahl geeigneter Parameter, Tierauswahl und tierspezifische Einflussgrößen, Auswahl des geeigneten Materials zur Blutentnahme und des Antikoagulanz, die Durchführung der Blutentnahme, die Vermeidung von Kontamination, die Beschriftung und Lagerung der Probe, den Transport der Probe zum Labor sowie die Vorbereitung der Probe für den analytischen Prozess.

Die Nutzung von Richtlinien zur Präanalytik, wie sie beispielsweise von der World Health Organization (WHO, 2002), dem International Council for Standardization in Haematology (ICSH, 1993) oder dem Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2007) veröffentlicht wurden, ist generell auch für die Veterinärmedizin möglich. Jedoch orientieren sich diese Richtlinien an präanalytischen Bedingungen der Humanmedizin, welche zwar in Teilen mit den Gegebenheiten in der Kleintierpraxis, wenig aber mit denen in der Nutztierpraxis vergleichbar sind. Die American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP, 2009) veröffentlichte Richtlinien für die Veterinärmedizin, die jedoch die speziellen Bedingungen der Nutztierpraxis, wie zum Beispiel Arbeit bei Frost, schlechte Lichtbedingungen, mangelhafte Assistenz bei der Blutentnahme und lange Probentransportzeiten in der Fahrpraxis, ebenfalls nicht berücksichtigen.

Ziel der Übersichtsarbeit war daher, Ursachen und Bedeutung präanalytischer Faktoren für die labordiagnostische Blutuntersuchung von Nutztieren zusammenzustellen. Es wurden

präanalytische Meilensteine herausgearbeitet, ihre Bedeutung im diagnostischen Prozess beschrieben sowie Maßnahmen zur Minimierung des Einflusses auf das Laborergebnis aufgezeigt. Für die experimentellen Arbeiten bildete dieses Review das Fundament und führte zur Optimierung der eigenen Qualitätssicherung.

3.2. Selen

Das Spurenelement Selen (Se) wurde nach seiner Erstbeschreibung durch den schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius im Jahre 1817 zunächst lange als toxisches Element angesehen, bis dann 1957 die Essentialität dieses Elementes für Säugetiere beschrieben wurde (Schwarz and Flotz, 1957). Ein Meilenstein war zudem die Erkenntnis, dass Selen nicht etwa nur als ein Co-Faktor im Stoffwechsel fungiert, sondern integraler Bestandteil der Selenoproteine/ -enzyme ist, was 1973 für die Glutathionperoxidase beschrieben wurde (Rotruck et al., 1973).

3.2.1. Nutritive Selenversorgung der Säugetiere

Nordeuropa (Koivistoinen and Huttunen, 1986; Boehnke et al., 1997) sowie Teile der USA (NRC, 1985) sind als Gebiete mit geringen Selengehalten der regional produzierten Agrarprodukte, einschließlich Futtermittel, beschrieben worden. Im Grundfutter für kleine Wiederkäuer spiegelt sich das vor allem im Bereich leichter Sandböden oder Moorböden durch Gehalte $< 0,05$ mg Se/kg Trockensubstanz (TS) wider. Für Schafe gelten Gehalte von $0,2$ mg Se/ kg TS in der Gesamtration als bedarfsgerecht (Kamphues et al., 2009), jedoch ist auch die chemische Form zu beachten: organisch gebundenes Selen scheint höher bioverfügbar zu sein als anorganische Selensalze (Spears, 2003). Die Leber synthetisiert neben anderen Selenoproteinen vor allem Selenoprotein P, welches als Haupttransportprotein für Selen im Blut angesehen wird (Read et al., 1990; Awadeh et al., 1998). Die Beschreibung der Glutathionperoxidase 1 als selenabhängiges Enzym (Rotruck et al., 1973) untermauerte wichtigen Funktionen von Selen im antioxidativen Stoffwechsel.

Während in der Veterinärmedizin die Nutritive Muskeldystrophie der Wiederkäuer bereits seit Jahrzehnten als klinische Ausprägung einer ernährungsbedingten Selenunterversorgung bekannt ist (Muth et al., 1958; Kuttler and Marble, 1960), sind Untersuchungen zu speziellen Selenoproteinen bei Nutztieren bisher nur vereinzelt durchgeführt worden. Die klinischen

Auswirkungen einer Selenunterversorgung sind sehr variabel, die pathophysiologischen Mechanismen sind nur in Teilen aufgeklärt. Sie resultieren vermutlich vorwiegend aus Funktionseinschränkungen selenabhängiger Enzyme, die den Redoxstatus der Zellen regulieren, wie beispielsweise die Glutathionperoxidase 1-5 (Brigelius-Flohé, 1999) und die Thioredoxin Reduktasen (Hill et al., 1997). Seit etwa 20 Jahren ist zudem bekannt, dass Selen einen funktionellen Bestandteil der Iodothyronin deiodinasen darstellt (Behne et al., 1990). Selenimbalancen wirken sich damit auch auf den Metabolismus der Schilddrüsenhormone aus.

Selenmangel kann sich klinisch sowohl in einer akuten als auch in einer chronischen Verlaufsform darstellen. Oft treten klinische Anzeichen zusammen mit einem marginalen Angebot von Vitamin E auf. Da Vitamin E ebenfalls als wichtiges Antioxidanz fungiert (Buettner, 1993), können Selenmangelsituationen bei guter Vitamin E Zufuhr besser toleriert werden (Bickhardt et al., 1999; Suttle, 2010).

Die akute Form des Selenmangels wird als Nutritive Muskeldystrophie (engl. white muscle disease) bezeichnet und betrifft insbesondere frohwüchsige Lämmer. Dabei führen oxidative Schädigungen der quer gestreiften Skelett- sowie der Herzmuskulatur zu schwankendem Gang, Einknicken in der Hinterhand und Festliegen der Tiere. Bestand bereits pränatal eine plazentäre Unterversorgung der Lämmer, kann es zu Geburten lebensschwacher Lämmer, Totgeburten, aufgekrümmter Haltung sowie fehlendem Schluckreflex kommen. Die Lämmer zeigen zum Teil hochgradige Schmerzäußerungen und sind festliegend mit steifen Gliedmaßen. Bei erwachsenen Tieren kommt diese Verlaufsform nur sehr selten vor (West et al., 2009b; Suttle, 2010).

Die chronische, subklinische Form des Selenmangels ist häufig anzutreffen. Niedrige Selengehalte im Grundfutter, verbunden mit ausbleibender Supplementierung z.B. über Mineralfutter, führen zu einer dauerhaften Unterfunktion wichtiger Selenoproteine. Die Symptome sind vielfältig und unspezifisch, zeigen aber nach Selensupplementierung deutliche Verbesserungen. Daher wird diese Form auch als „selenium-responsive disorder“ bezeichnet (Suttle, 2010). Es kommt beispielsweise zu Wachstumsverzögerungen (Kümmern), schlechten täglichen Zunahmen, mangelnder Reproduktionsleistung, Einschränkung der Spermaqualität und vermehrter Infektanfälligkeit (Watanabe and Endo, 1991; Gabryszuk and Klewicz, 2002; Kumar et al., 2009). Zudem liegt häufig eine subklinische Hepatopathie vor (Bickhardt et al., 1999). Aufgrund der unspezifischen Symptomatik bleibt die Erkrankung oft lange Zeit unerkannt.

3.2.2. Selenmangel – nur ein Phänomen bei Nutztieren?

Regelmäßig kommt in wissenschaftlichen Foren die Frage auf, ob denn nicht auch Wildwiederkäuer ähnlich wie Nutztiere von niedrigen Selengehalten betroffen sind. Unsere vergleichende Untersuchung von Schafen und Rehwild am gleichen Standort (Humann-Ziehank et al., 2008) griff diese Frage auf. Die Studie veranschaulichte einerseits den geringen Selenstatus von Schafen bei ausschließlicher Fütterung von Weideaufwuchs auf leichten Sandböden ohne Supplementierung von Mineralstoffen. Wir konnten zudem zeigen, dass tatsächlich beim Rehwild ähnlich marginale Leber-Selenkonzentrationen im Vergleich zur jeweiligen Schafherde am gleichen Standort vorlagen. Die Möglichkeit zur selektiveren Futteraufnahme des Rehwildes als Konzentratsselektierer ergibt bezüglich der Selenaufnahme offenbar keine Vorteile. Während auch von anderen Arbeitsgruppen marginale Selenkonzentrationen der Wildtiere generell und auch speziell bei Rehwild (Pilarczyk et al., 2009; Flueck et al., 2011) beschrieben wurden, wird über spezifische klinische Symptome kaum berichtet. Die in unserer oben genannten Studie ermittelte, deutlich höhere Vitamin E - Konzentration in der Leber des Rehwildes war vermutlich mit der Möglichkeit zu selektiverer Futteraufnahme mit Verzehr von Knospen, frischem Grasaufwuchs und Blättern mit höherem Vitamin E Gehalten zu erklären. Vitamin E ist ein wichtiger Faktor im antioxidativen System (Buettner, 1993), besonders schwere Fälle von nutritiver Muskeldystrophie zeigten meist einen gleichzeitigen Selen- und Vitamin E – Mangel (Bickhardt et al., 1999).

3.2.3. Selenoproteine

Selen ist essentieller, integraler Bestandteil verschiedener Enzyme und Proteine. Das Selenoproteom besteht, wie für den Menschen beschrieben, aus nur 25 verschiedenen Selenoproteinen (Kryukov et al., 2003). Nur für einige Selenoproteine konnte bisher auch die biologische Funktion aufgeklärt werden. Die zytosolische Glutathionperoxidase (GPx1) erfüllt durch Abbau von zellulärem H₂O₂ vorwiegend antioxidative Funktionen (Brigelius-Flohé and Kipp, 2009). GPx1 sowie die plasmatische GPx3 nehmen in der sogenannten ‚Hierarchie der Selenoproteine‘ einen niedrigen Rang ein (Wingler et al., 1999; Brigelius-Flohé, 2006). Gemeint ist damit, dass ihre Aktivität bei mangelhafter Selenzufuhr rasch sinkt. Die Thioredoxin Reduktase (TrxR) nimmt über die Reduktion von Disulphiden wichtige

Funktionen im zellulären Redoxsystem ein (Arner and Holmgren, 2000). Die Iodothyronine deiodinase (Dio) reguliert die lokale und systemische Konzentration der aktiven bzw. inaktiven Form der Schilddrüsenhormone beim Umbau von Thyroxin (T₄) in Triiodthyronin (T₃) durch Abspaltung von Jod am inneren Molekülring (Behne et al., 1990; Köhrle, 2002). Selenoprotein P (SePP) wird in der Leber gebildet und gilt als Haupttransportprotein für Selen im Blut (Read et al., 1990; Awadeh et al., 1998; Hill et al., 2012). Für den Menschen ist SePP bereits routinemäßig mittels ELISA im Serum analysierbar (Hollenbach et al., 2008; Müller et al., 2013), leider steht für die Veterinärmedizin noch kein vergleichbarer Test zur Verfügung.

3.2.4. Selen-assoziierte Enzyme

Die selenunabhängige, zytosolische Glutathion-S-transferase alpha (aGST) wurde als möglicher sekundärer Parameter für den Selenstatus auf Basis seiner mRNA Expression sowie der Aktivität auf Enzymebene beschrieben. In Studien zum Selenmangel zeigte die aGST eine hohe mRNA Expression und enzymatische Aktivität, möglicherweise um die verminderte antioxidative Aktivität der GPx1 zu kompensieren (Burk et al., 2008; Blum et al., 2012). Dagegen lag eine geringe Enzymaktivität der aGST vor, wenn zellulär eine ausreichende, antioxidative Funktion gegeben war (Yang et al., 2002; Sengupta et al., 2008). Aufgrund dessen könnte die aGST mRNA Expression sowie die aGST - Aktivität zukünftig möglicherweise als wertvoller Marker der metabolischen Relevanz verschiedener Selenmangelstadien genutzt werden.

3.2.5. Selen in der Krebsforschung

Selen erregte in den letzten Jahren auch aus einem anderen Blickwinkel das wissenschaftliche Interesse: Aus epidemiologischen Untersuchungen wurden bedeutsame Unterschiede in der weltweiten Inzidenz von humanen Karzinomen beschrieben. Die Erkenntnis, dass Karzinome gleichen Typs beispielsweise in Asien eine niedrigere Inzidenz und spezifische Mortalität zeigen können als in Europa oder den USA (Muir et al., 1991; Gronberg, 2003), hat in jüngerer Zeit die Bedeutung von Einzelfaktoren der Karzinogenese und Tumorprogression vermehrt in den Fokus gerückt. Selen ist in diesem Kontext derzeit von großem wissenschaftlichen Interesse, auch im Hinblick auf angereicherte Nahrungsmittel, sog. ‚functional food‘, für Krebsprävention und Therapie beim Menschen. Eine der frühen

experimentellen Studien bei Mäusen zeigte beispielsweise nach viraler Induktion von Gesäugetumoren mit dem Betaretrovirus Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) die höchste Tumorzinzidenz in der Gruppe mit der niedrigsten Selenkonzentration im Futter (Schrauzer et al., 1989).

Lungenkrebs ist eine der wichtigsten Krebserkrankungen des Menschen (Parkin et al., 2005). Studien zum Zusammenhang der nutritiven Versorgung mit Selen mit der Pathogenese von Lungenkarzinomen wurden bisher vor allem an Nagetieren und teilweise beim Menschen durchgeführt (Romieu, 2005; Della Rovere et al., 2006; Greenwald et al., 2007; Mahabir et al., 2007; Silvera and Rohan, 2007). Bei Menschen mit Adeno- oder Plattenepithelkarzinomen der Lunge wurde beispielsweise ein signifikant niedrigerer Serum-Selengehalt im Vergleich zu Probanden ohne Lungentumor festgestellt und daraus auf einen pathogenetischen Einfluss von Selen geschlossen (Della Rovere et al., 2006). Der oft zitierte Nutritional Prevention of Cancer Trial (Reid et al., 2008) sowie weitere Feldstudien empfehlen einen bedarfsgerechten, nicht aber einen übermäßig hohen Selenstatus zur Reduktion des Lungenkrebsrisikos (Duffield-Lillico et al., 2002; Fritz et al., 2011).

Andere Studien lassen einen protektiven Effekt einer Selensubstitution auf die Inzidenz von kolorektalen Adenomen (Peters et al., 2006) oder experimentell induzierten Lebertumoren (Alwahaibi et al., 2010) vermuten, allerdings scheint dieser Effekt vor allem bei Individuen mit initial niedrigen Selenkonzentrationen im Plasma vorzuliegen. Für eine weitere Tumorart, das Prostatakarzinom, konnte im Rahmen des ‚Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial‘ (SELECT) bei über 32.000 Probanden kein positiver Effekt einer Selensubstitution auf die Krebsinzidenz dargestellt werden (Lippman et al., 2009). Eine andere Meta-Analyse von Krebsstudien resümiert, dass bedarfsgerecht ernährte Individuen keinen Vorteil aus einer Selensubstitution im Hinblick auf das Krebsrisiko ziehen (Dennert et al., 2011). Insgesamt wird aber derzeit die wissenschaftliche Debatte zu diesem Thema, auch wegen möglicher Nebenwirkungen einer Selensupplementierung, noch sehr kontrovers geführt. So wurden kürzlich vermehrt Zusammenhänge zwischen supranutritiver Selensubstitution und einer Dysregulation des Kohlenhydratstoffwechsels in Form eines Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert (Mueller et al., 2009; Stranges et al., 2010; Steinbrenner et al., 2011). Möglicherweise muss zudem der unterschiedlichen Wirkung (antioxidativ/prooxidativ) von Selenoenzymen und Selenverbindungen auf Zellen (Forceville, 2006) mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. In diesem Zusammenhang ist der mögliche konträre Einfluss der einzelnen Glutathionperoxidasen in verschiedenen Stadien der Karzinogenese beachtenswert: Die von

Tumorzellen produzierten Hydroperoxide unterstützen Proliferation, Invasion, Migration und Angiogenese des Tumors, wohingegen höhere Hydroperoxid-Konzentrationen die Apoptose fördern. Glutathionperoxidasen scheinen daher als Hydroperoxid-regulierende Enzyme verschiedenen Rollen in der Krebsentwicklung einzunehmen (Brigelius-Flohé and Kipp, 2009).

3.3. Ovine Pulmonary Adenocarcinoma

Die Lungenadenomatose der Schafe (ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA)) ist eine Form des Lungenkrebs, die einige Parallelen zum gemischt invasiven Adenokarzinom mit vorwiegend bronchioalveolärer Komponente des Menschen zeigt. Sie wurde punktuell bereits als Forschungsmodell der Humanerkrankung genutzt (Suau et al., 2006) und aufgrund von Ähnlichkeiten zum humanen Adenokarzinom als attraktives Modell bezeichnet (Liu and Miller, 2007; Hofacre and Fan, 2010). Es handelt sich dabei um eine, in der Schafpopulation weit verbreitete, durch das Betaretrovirus Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) ausgelöste, tumoröse Lungenerkrankung. Unter natürlichen Infektionsbedingungen finden sich diagnostisch eindeutige Fälle mit klinischen Symptomen von OPA erst bei drei bis vier Jahre alten Tieren (Griffiths et al., 2010). Allerdings ist OPA bei jungen Lämmern nach intratrachealer Virusapplikation innerhalb weniger Wochen induzierbar (Salvatori et al., 2004). Die Mutagenese ist nicht endgültig geklärt. Einige Studien deuten darauf hin, dass vorwiegend das Hüllglykoprotein (envelope glycoprotein) onkogene Eigenschaften auf Typ II Pneumozyten und Clarazellen aufweist (Caporale et al., 2006; Leroux et al., 2007; Liu and Miller, 2007). Eine neuere Studie beschreibt als Zielzellen der JSRV-Infektion vor allem spezielle, proliferierende Lungenalveolarzellen (lung alveolar proliferating cell, LAPC) aus der Typ II-Pneumozyten-Zelllinie, die sich durch Expression der Marker Surfactant-Protein C und Ki67⁺ auszeichnen (Murgia et al., 2011). Bei Versuchen mit experimenteller OPA-Induktion konnte die altersabhängige Sensitivität gegenüber JSRV direkt mit der Häufigkeit der LAPCs in Verbindung gebracht werden. Diese Zellen scheinen bei Lämmern deutlich häufiger vorzukommen als bei Altschafen. Bei adulten Schafen konnte dagegen gezeigt werden, dass eine milde Schädigung des respiratorischen Lungenepithels zu einem starken Anstieg der LAPCs führt. Dieser Effekt wird als eine Prädisposition für die JSRV-Infektion angesehen (Murgia et al., 2011). Im Genom des Schafes wurden zudem endogene JSRV-Sequenzen ohne onkogene Eigenschaften beschrieben (Hecht et al., 1994; Hofacre and Fan,

2010). Möglicherweise liegt hier der Zusammenhang zu der Beobachtung, dass eine zelluläre oder humorale Immunantwort auf die JSRV-Infektion (Ortin et al., 1998) ausbleibt.

Präklinisch ist die OPA-Diagnostik in der bronchoalveolären Lavage durch Nachweis der proviralen JSRV-DNA mittels PCR möglich (Voigt et al., 2007a).

4. Frage- und Aufgabenstellungen

Richtlinien für die Präanalytik bei der labordiagnostischen Blutuntersuchung von Nutztieren liegen bisher nicht vor. Im Rahmen einer Übersichtsarbeit sollte daher der derzeitige Kenntnisstand zusammengefasst und eine Hilfestellung für die Optimierung der präanalytischen Phase der Labordiagnostik erarbeitet werden. Das Review orientierte sich an der grundsätzlichen Fragestellung:

- Welche präanalytischen Faktoren sind in der veterinärmedizinischen Laboratoriumsdiagnostik für Nutztiere zu beachten und wie kann die Präanalytik optimal gestaltet werden?

Im Weiteren folgten epidemiologische und experimentelle Arbeiten. Ausgehend von der Frage nach dem bundesweiten Vorkommen von Selenunterversorgung bei Schaf unter regional-typischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Wie ist der aktuelle Selenstatus in deutschen Schafherden einzuschätzen? Bestehen Zusammenhänge zu Mineralfuttereinsatz, Herdengröße, Haltungsform, Standort, Produktionszeitpunkt und Wasserangebot?

Angeregt durch die zunehmende internationale Forschung zum Zusammenhang zwischen Selenstatus und Krebserkrankungen wurde der Selenstoffwechsel der Schafe experimentell mit der OPA kombiniert und als Modell für die wissenschaftliche Bearbeitung des Zusammenhangs von Lungenkrebs mit nutritiv modulierbaren Faktoren etabliert. Fragestellungen waren dabei zunächst:

- Wie muss die Computertomographie der Schaflunge zum Langzeitmonitoring der OPA gestaltet werden? Kann für die Auswertung ein neues Score-System generiert werden, um die Tumorprogression zu quantifizieren?

Auf der entwickelten methodischen Grundlage konnte nun ein Langzeitversuch zum Zusammenhang zwischen dem Selenstatus und dem Verlauf der OPA durchgeführt werden. Dazu wurden folgende Fragestellungen festgelegt:

- Beeinflusst eine marginale beziehungsweise eine bedarfsgerechte Selenversorgung die Progression der OPA im Langzeitversuch?
- Welche Auswirkungen hat eine marginale beziehungsweise bedarfsgerechte Selenversorgung auf die Selenkonzentrationen, Selenoproteine und Selen-assoziierte Proteine in Blut, Leber, Lunge, Niere, Schilddrüse und Herzmuskel?

5. Ergebnisse

5.1. Präanalytik

Publikation 1: Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics.

Dieses Review präsentiert einen Überblick über die Vielzahl präanalytischer Einflussfaktoren sowie deren Wirkung auf die labordiagnostischen Ergebnisse von Blutuntersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der tierärztlichen Bestandsbetreuung und wissenschaftlicher Studien bei Nutztieren. Tierspezifische sowie technikbezogene Faktoren in der präanalytischen Phase wurden herausgestellt und die Auswirkungen auf diagnostische Parameter erläutert. Zudem wurden in dieser Übersichtsarbeit Hilfestellungen zur Minimierung des Einflusses präanalytischer Faktoren vorgestellt. Einen Vorschlag für eine allgemeine Checkliste zeigt Tabelle 1 der Übersichtsarbeit.

Table 1 *Blood sampling checklist*

Preparation	<ul style="list-style-type: none"> ● Investigate case history and clinical diagnosis ● Determine the blood analytes of interest ● Check analytes for interactions (animal-related effects, technique-related effects) ● Check for the optimal vein for sampling ● Choose appropriate tubes, needles and anticoagulants (consult laboratory) ● Provide equipment for suitable restraint of the animal, including the vein ● Label tubes before sampling using permanent markers ● Check and prepare required specimen storage and transportation conditions ● Prepare sampling record
Sampling	<ul style="list-style-type: none"> ● Restrain animals properly ● Avoid occluding the vein for more than 1 min ● Randomize animal order of sampling when repeating blood draws (e.g. for scientific studies) ● Order collection procedure by beginning with most sensitive sampling (cell analysis/hematology), continue with plasma, take serum finally; be aware that K-EDTA may contaminate the subsequent sample. If questionable, fill EDTA tube finally ● If the flow of blood is interrupted during the collection (e.g. dislocation of the needle caused by animal movement), discard the collection tube and continue with a new tube to avoid clotting or hemolysis of the sample ● Avoid sample aspiration with excessive force/turbulence ● Do not underfill the tube, but fill to the level specified by the manufacturer ● Properly seal tubes immediately if requested (e.g. Monovette® VetMed, Sarstedt, Nuembrecht, Germany) ● Mix anticoagulant and blood as well as coagulation accelerator and blood immediately by gently inverting collection tube five to eight times, do not agitate
Specimen handling	<ul style="list-style-type: none"> ● Allow serum to complete clot formation (30 min) without motion in an upright position at room temperature ● Centrifuge samples within 1 h of collection and immediately transfer serum/plasma to a new tube or suitable container ● Store separated serum/plasma in dark at 4°C ● Store samples intended for hematology at room temperature, but no longer than 2 days; prepare three air-dried blood smears immediately after sample collection to preserve cell morphology ● Note any abnormality during the procedure in the sampling record, because it may help understand an abnormal result ● Mailing: enclose record, case specimen with protective packaging and cold packs ● Avoid mailing of specimen at weekends

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid.

Einen zentralen Meilenstein stellt die Vermeidung einer *in vitro* Hämolyse im Rahmen der Entnahme, des Transports und der Aufbewahrung von Blutproben dar. Die Lyse von

Erythrozyten und Thrombozyten führt dabei einerseits zu einer unbeabsichtigten Freisetzung intrazellulärer Analyten wie z.B. Kalium und Phosphat, andererseits können Interferenzen bei photometrischen Tests entstehen. Als Konsequenz wurden in den weiteren Studien die gewonnenen Serumproben regelmäßig auf den Gehalt an freiem Hämoglobin untersucht. Die in der Herdendiagnostik immer wieder diskutierte Verwendbarkeit von Poolproben wurde in Publikation 2 aufgegriffen und bezüglich des Selenstatus einer kritischen Prüfung unterzogen.

5.2. Selenversorgung deutscher Schafherden

Publikation 2: Variation of serum selenium concentrations in German sheep flocks and implications for herd health management consultancy.

Ziel der Studie war die Darstellung des Vorkommens der Selenunterversorgung in deutschen Schafherden. In 150 Schafherden wurde jeweils von 10 Mutterschafen Serum gewonnen. Auswahlkriterien waren ein Alter über zwei Jahre, ein body condition score (BCS) (West et al., 2009a) von drei und geringer sowie das Freisein von Anzeichen akuter Erkrankungen. Zudem wurden beim Betriebsbesuch folgenden Daten erhoben: Herdengröße, Angebot von Mineralfutter, vorwiegende Haltungsform (Koppelhaltung/ Wanderschafhaltung), Art der Wasserversorgung (Leitungs-, Brunnen-, Oberflächenwasser) sowie die vorwiegende lokale Bodenart. Es wurden zudem die Jahreszeit/Produktionsstadium und die geographische Lage des Bestandes protokolliert. Die Serumproben wurden mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) auf die Serum-Selenkonzentration untersucht. Die Variation innerhalb der untersuchten Tiergruppe sowie die Korrelation von Probenpools von jeweils fünf Proben gegenüber dem Mittelwert von einzeln gemessenen Proben wurden analysiert.

Die Spannweite zwischen der höchsten und der niedrigsten Selenkonzentration im Serum der zehn Tiere einer Herde war mit einem Mittel von 45,4 µg Se/l enorm hoch. Betroffene Herden müssen daher die gleichmäßige Selenversorgung aller Tiere, z. B. über Veränderung der Fütterungstechnik, optimieren. Pools von jeweils fünf Serumproben korrelierten gut mit dem Mittelwert einzeln untersuchter Proben, aber aufgrund der möglichen enormen Spannweite innerhalb der untersuchten Gruppe ist dennoch von Pooluntersuchungen abzuraten: sie würden relevante diagnostische Informationen unterdrücken.

Der überwiegende Anteil der untersuchten Herden (etwa 60 %) zeigte mittlere Serum-Selenkonzentrationen unterhalb des Referenzwertes für Schafe (Puls, 1994) von 80 µg Se/l.

Etwa 37% der Herden zeigten sogar mittlere Konzentrationen unter 60 µg Se/l. Nur 6,7 % der Betriebe gaben an, kein Mineralfutter anzubieten. Herden mit Koppelhaltung wiesen im Gesamtvergleich gegenüber Wanderschafherden höhere mittlere Serum-Selenkonzentrationen auf. Bei Einzelbetrachtung der Produktionsphasen zeigte sich allerdings, dass in der Lammzeit (Dezember bis März), die auch bei vielen Wanderschafherden Stall-nah oder im Stall erfolgt, keine Unterschiede in der Serum-Selenkonzentration zwischen Herden mit Koppelhaltung und Wanderschafherden feststellbar waren.

Es konnte kein Zusammenhang der vorwiegenden lokalen Bodenart mit der mittleren Serum-Selenkonzentration ermittelt werden, allerdings tendierten Herden in Süddeutschland vermehrt zu marginalem Selenstatus. Die Herdengröße zeigte eine negative Korrelation zum mittleren Selenstatus. Nur bei Herden in Koppelhaltung konnte ein Zusammenhang zwischen Nutzung von Oberflächenwasser und niedrigem Selenstatus dargestellt werden.

5.3. Einfluss des Selenstatus auf die Progression der OPA – eine Pilotstudie

5.3.1. Score-basierte Quantifizierung der Lungentumorprogression mittels Computertomographie

Publikation 3: Imaging and score-based quantification of ovine pulmonary adenocarcinoma using computed tomography as an additional tool in advanced clinical diagnosis

Die Computertomographie (CT) ist eine Routinetechnik für die Untersuchung von Lungenerkrankungen in der Humanmedizin und findet auch in der Tiermedizin zunehmend Verwendung. Zur Untersuchung von Schaflungen wurde die CT bisher aber nur sehr vereinzelt genutzt. Ziel dieser Studie war die Prüfung der Quantifizierbarkeit der Lungentumorprogression bei Schafen mit JSRV-induzierter OPA durch wiederholte computertomographische Untersuchungen bei standardisierter Beatmung unter Inhalationsnarkose. Zudem wurden vergleichend Röntgenaufnahmen der jeweiligen Lunge ausgewertet. Als Kontrolle dienten CT- und Röntgenaufnahmen der Lunge eines gesunden Schafes. Zur Quantifizierung der Lungenveränderungen wurde ein CT-OPA-Score System generiert.

Die CT der Lunge erwies sich generell als aussagekräftige und praktikable Untersuchungsmethode bei Schafen. Die unterschiedlichen Stadien der OPA sowie Nebenfunde wie z.B. Abszesse konnten eindeutig diagnostiziert werden. Das neu entwickelte CT-OPA-Score System erwies sich als geeignetes Instrument zur Quantifizierung der fortschreitenden OPA-Progression bei wiederholten Untersuchungen. Die Befunde aus der CT-Untersuchung korrelierten gut mit der postmortalen makroskopischen und pathohistologischen Morphologie der Lunge.

Gegenüber der Röntgentechnik erwies sich die CT erwartungsgemäß als sehr viel sensitivere Technik, die schon bei sehr geringgradigen Veränderungen die eindeutige Lokalisation und Wiederfindbarkeit der Adenokarzinome zuließ.

5.3.2. Konzeption des Studienmodells: OPA – nutritive Selenversorgung

Publikation 4: Ovine pulmonary adenocarcinoma as an animal model of progressive lung cancer and the impact of nutritional selenium supply

und

5.3.3. Ergebnisse der Langzeitstudie zur Lungentumorproliferation bei marginaler und bedarfsgerechter nutritiver Selenversorgung

Publikation 5: Long-term study of ovine pulmonary adenocarcinogenesis in sheep with marginal vs. sufficient nutritional selenium supply: results from computed tomography, pathology, immunohistochemistry, JSRV-PCR and lung biochemistry.

Die Kombination der JSRV-induzierten OPA mit einer definierten Selenversorgung als Tiermodell zur Untersuchung des Einflusses des Selenstatus auf den Verlauf einer Adenokarzinomatose der Lunge wurde beim 4th Symposium of the Federation of European Societies of Trace Elements and Minerals (FESTEM) im Juni 2010 in St. Petersburg, Russland erstmals vorgestellt und mit dem 1. Posterpreis ausgezeichnet. Anschließend wurden diese ersten Ergebnisse im Journal of Trace Elements in Medicine and Biology veröffentlicht (Publikation 4). Die abschließenden Ergebnisse der zweijährigen Langzeitstudie in Bezug auf die Lungentumorproliferation sind in Publikation 5 dargestellt worden.

Als Versuchstiere dienten 16 adulte Kamerun-/ Kamerunmischlings-Schafe aus einer JSRV-positiven Herde. Während einer dreimonatigen Adaptationsphase wurden die Tiere als Gruppe aufgestellt und klinisch, labordiagnostisch sowie mittels Lungen-CT voruntersucht. Die Fütterung bestand aus Heu mit einer Selenkonzentration von $< 0,05$ mg Se/ kg TS, Wasser stand zur freien Aufnahme bereit. Die JSRV-Infektion wurde über den Nachweis von proviraler DNA im Zellpellet der bronchoalveolären Lavage (BAL) mittels PCR (Voigt et al., 2007a) belegt. Von allen Tieren wurde mittels perkutaner Leberbiopsie (Humann et al., 1999) Lebergewebe gewonnen und auf die Spurenelemente Selen, Kupfer und Zink sowie die Selenoproteine GPx1 und TrxR untersucht.

Mit Beginn der eigentlichen Versuchsphase wurde die Tiere in zwei Untergruppen unterteilt und in den folgenden zwei Jahren mit marginaler ($< 0,05$ mg Se/kg TS, Gruppe: Se-) bzw. bedarfsgerechter Selenkonzentration (0,20 mg Se/kg TS, Gruppe: Se+) in der Gesamtration gefüttert. Alle übrigen Futterkomponenten der Ration lagen in für Schafe bedarfsgerechten Konzentrationen vor. In dreimonatigen Intervallen wurden in der Folge alle Tiere mittels Lungen-CT wiederholt untersucht und die Veränderungen unter Nutzung des CT-OPA-Score Systems quantifiziert. In der Narkose wurden auch jeweils Leberbiopsate gewonnen. Bei Einzeltieren wurde die BAL und Untersuchung des BAL-Zellpellet auf provirale JSRV-DNA wiederholt, sofern die ersten Ergebnisse fraglich waren.

Vierzehntägig wurden Blutproben gewonnen. Diese wurden sowohl der Routinediagnostik (hämatologisch/klinisch-chemisch) sowie der Selen- und Selenoproteindiagnostik zugeführt. Zum Versuchsende wurden die Schafe euthanasiert und pathomorphologisch sowie pathohistologisch untersucht. In Lungengewebe, Lungenlymphknoten und postmortal an der extrahierten Lunge gewonnenen BAL wurde die Untersuchung auf pro-virale JSRV-DNA mittels PCR (Voigt et al., 2007a) durchgeführt. Das Lungengewebe wurde auf die Selenkonzentration mittels GF-AAS, enzymatisch auf die Aktivitäten der GPx1 und der TrxR, sowie auf die immunhistochemische GPx1-Expression untersucht. Dabei wurde auch Tumorgewebe mit makroskopisch unauffälligem Lungengewebe des gleichen Tieres verglichen.

Während in der Adaptationsphase der Mittelwert (mw) der Serum-Selenkonzentration der Versuchstiere etwa 0,060 mg Se/l betrug, konnte bereits nach nur 10 Tagen differenzierter Fütterung ein hochsignifikanter Unterschied der Serum-Selenkonzentration (mw \pm Standardabweichung (sd)) zwischen der Se- ($0,054 \pm 0,010$ mg Se/l) und der Se+ ($0,083 \pm 0,011$ mg Se/l) Gruppe festgestellt werden. Korrespondierend dazu zeigte sich in der

Leberbiopsie an Tag 20 nach Futterumstellung für die Se+ Gruppe eine signifikant höhere mittlere Selenkonzentration, während die Se- Gruppe auf dem Ausgangsniveau der Leber-Selenkonzentration verblieb.

Auch im Lungengewebe war postmortal eine signifikant höhere Selenkonzentration und GPx1-Aktivität der Se+ Gruppe (Se: $0,310 \pm 0,069$ mg/kg FS; GPx1: median 196,5 (IQR 88-277) U /g Protein) gegenüber der Se- Gruppe (Se: $0,133 \pm 0,050$ mg/kg FS; GPx1: median 70,4 (IQR 52,0-100,2) U /g Protein) feststellbar. Die zytosolische TrxR - Aktivität im Lungengewebe dagegen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Das OPA-auslösende Agens JSRV konnte im BAL-Zellpellet, in Lungenlymphknoten sowie in Lungengewebe nachgewiesen werden.

Das CT-OPA-Score System ermöglichte eine detaillierte Objektivierung der individuellen Progression der OPA innerhalb der zweijährigen Beobachtungsphase. Insbesondere bei Tieren mit geringgradiger OPA variierte allerdings der mittlere Score deutlich. Im zeitlichen Verlauf konnten keine signifikanten Unterschiede der mittleren Scores zwischen den beiden Fütterungsgruppen festgestellt werden. Eine ‚one-spot‘ Auswertung verfolgte einen individuellen, wiederholt im CT darstellbaren und postmortal pathohistologisch als OPA bestätigten Tumorknoten pro Tier im zeitlichen Verlauf. Verglichen zum Ausgangsstatus stieg der Score jeweils deutlich an, aber ohne signifikante Unterschiede zwischen der Se- und der Se+ Gruppe. Ein Einfluss des Selenstatus auf die Intensität der OPA-Progression war demnach in dieser Untersuchung nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse der abschließenden, letzten CT-Untersuchung korrelierten gut mit den pathomorphologischen und pathohistologischen Lungenbefunden. Die Immunhistologie ließ einen Zusammenhang zwischen der Intensität der immunhistochemischen GPx1-Markierung und der Tumorgöße vermuten: in der semiquantitativen Untersuchung zeigten kleine (Durchmesser etwa 500-2000 μ m) und mittlere (Durchmesser etwa 3000-4000 μ m) Tumorknoten in über 90% der Zellen eine immunhistochemische GPx1-Markierung. Dagegen variierte in großen Tumorknoten (Durchmesser etwa 8000-9000 μ m) die Prozentzahl neoplastischer Zellen mit immunhistochemischer GPx1- Markierung zwischen 30% und 90%. Die Intensität der immunhistochemischen GPx1-Markierung war deutlich stärker in kleinen und mittleren als in großen Tumorknoten. Zudem konnte in aveolar liegenden Makrophagen in der Nachbarschaft von Tumorzellen eine deutlich positive zytoplasmatische GPx1-Markierung dargestellt werden. Auch unveränderte Typ I und Typ II Pneumozyten sowie hyperplastische Typ II Zellen zeigten eine positive GPx1-Markierung.

5.4. Auswirkungen einer marginalen und einer bedarfsgerechten Selenversorgung auf Parameter des Selenstoffwechsels in Blut und Organen der Schafe

Publikation 6: Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep.

In der mit den Publikationen 4 und 5 beschriebenen Forschungsarbeit wurden auch zahlreiche Untersuchungen zu den metabolischen Auswirkungen der Futterumstellung von marginaler auf bedarfsgerechte Versorgung im zeitlichen Verlauf über zwei Jahre durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden abschließend in Publikation 6 ausgewertet. Auf die vorangehenden Publikationen 4 und 5 wurde zur transparenten Darstellung des Gesamtversuches verwiesen.

Alle Blutuntersuchungen schlossen routinemäßig die Hämatologie sowie folgende klinisch-chemische Parameter mit ein: Gesamtprotein, Albumin, Globulin/Albumin-Quotient, Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff, Glucose, Triglyzeride, Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Vitamin E (zweimonatlich). Zudem wurden die Aktivitäten der Kreatinkinase, Aspartat-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Alkalische Phosphatase und Gamma-Glutamyltransferase im Plasma bestimmt.

Im Serum wurden die Selenkonzentration und die Aktivität der GPx3 sowie im hämolysierten Vollblut die Gesamt-GPx-Aktivität (GPx1+GPx3) analysiert. Die Leberbiopate sowie postmortal gewonnenes Lebergewebe wurden auf die Konzentrationen von Selen, Cu, Zn sowie die Aktivitäten von GPx1 und TrxR untersucht. Zudem wurden postmortal gewonnene Proben von Niere, Herzmuskel, und Schilddrüse hinsichtlich Selenkonzentration sowie den Aktivitäten von GPx1, TrxR und aGST analysiert. Die relative mRNA Expression der hepatischen aGST und GPx1 wurde mittels real time PCR ermittelt. Die Auswirkung der unterschiedlichen Selensubstitution auf die Schilddrüsenfunktion wurde am Ende der Versuchsperiode durch Analyse von Gesamt-T4 and Gesamt-T3 im Serum sowie der Dio1-Aktivität in Leber und Niere charakterisiert.

Während der gesamten Versuchsdauer zeigten die Tiere keine fütterungsbedingten, klinischen Besonderheiten, insbesondere keine klinischen Symptome einer Nutritiven Muskeldystrophie als mögliche klinische Ausprägung eines Selenmangels. Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung der adulten Tiere waren nicht feststellbar. Die Untersuchung der

hämatologischen und klinisch-chemischen Routineparameter ergab keine besonderen Auffälligkeiten.

Die auf ein bedarfsgerechtes Niveau gesteigerte, nutritive Selenzufuhr führte innerhalb weniger Tage zu einem deutlichen Anstieg der Serum-Selenkonzentration, gefolgt von einer Plateauphase. Von Tag 10 bis 750 lag ein hochsignifikanter Gruppenunterschied für diesen Parameter vor. In der Se- Gruppe fiel die Selenkonzentration im Serum kontinuierlich ab, folgte einer hochsignifikanten linearen Regression und führte innerhalb von zwei Jahren zu einer Halbierung der Ausgangskonzentration. Ab Tag 191 konnte ein signifikanter Unterschied der Se- Gruppe im Vergleich zur initialen Serum-Selenkonzentration dargestellt werden. Die Vollblut-GPx-Aktivität stieg in der Se+ Gruppe nur langsam an, zeigte ab Tag 37 signifikante Unterschiede zur Se- Gruppe, erreichte aber erst ab Tag 150 eine Plateauphase. In der Se- Gruppe sank die Vollblut-GPx-Aktivität kontinuierlich über die Zeit ab. Die GPx3-Aktivität im Serum zeigte sich als stark variierender Parameter, wies aber ab Tag 37 ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen auf.

Die mittlere Leber-Selenkonzentration der Se+ Gruppe wurde bereits im ersten Bioplat an Tag 20 auf einem signifikant angestiegenen Niveau von etwa 410 µg Se/kg FS ermittelt und blieb danach über den ganzen Versuchszeitraum stabil auf einem Plateau. Die mittlere Leber-Selenkonzentration der Se- Gruppe dagegen blieb weitgehend unverändert bei etwa 130-180 µg Se/kg FS. Der Gruppenvergleich war ab Tag 20 durchgehend signifikant verschieden. Die Leberbioplate ermöglichten zudem die Darstellung der zytosolischen GPx1- und TrxR-Aktivitäten im Langzeitverlauf. Die hepatische GPx1-Aktivität stieg in der Se+ Gruppe langsam über einen Zeitraum von 200 Tagen an und fiel danach wieder etwas ab. Signifikante Gruppenunterschiede lagen durchgehend von Tag 20 bis zum Versuchsende vor. Bezüglich der hepatischen TrxR-Aktivität konnten nur zum Versuchsende signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden.

Die differenzierte nutritive Selensubstitution spiegelte sich, zusätzlich zu den beschriebenen Effekten in der Leber, auch im Lungengewebe (siehe Publikation 5), in der Niere, der Schilddrüse und im Herzmuskel mit signifikanten Gruppenunterschieden in der Selenkonzentration (nicht Niere) und der GPx1-Aktivität wider. In der Leber zeigte sich dieser Effekt zusätzlich durch die höhere relative mRNA-Expression der GPx1 in der Se+ Gruppe.

Auf Enzymebene konnten mit Blick auf die aGST-Aktivität in Leber, Niere und Herzmuskel keine Unterschiede zwischen der Se+ und der Se- Gruppe festgestellt werden. Auf

Transkriptionsebene wurde dagegen eine zweifach höhere, relative mRNA-Expression bei der Se- Gruppe in Vergleich zur Se+ Gruppe ermittelt.

In der Leber war die Aktivität der Dio1 in der Se+ Gruppe gegenüber der Se- Gruppe signifikant erhöht, in der Niere ließen sich diesbezüglich keine Unterschiede nachweisen. Auf funktionaler Ebene waren keine Gruppenunterschiede der Gesamt-T3- und Gesamt-T4-Konzentrationen im Serum festzustellen.

Die häufig zusätzlich bei kleinen Wiederkäuern anzutreffenden Spurenelementimbalancen bezüglich Cu und Zn lagen bei den Versuchstieren nicht vor, wie die Untersuchungen von Leber, Niere und Schilddrüse belegten.

6. Übergreifende Diskussion

6.1. Bedeutung der Präanalytik in der labordiagnostischen

Untersuchung von Blutproben bei Nutztieren

Die Qualität der labordiagnostischen Blutuntersuchung kann durch eine Vielzahl präanalytischer Faktoren beeinflusst werden. Sowohl für die tierärztliche Bestandsbetreuung als auch für wissenschaftliche Projekte sind detaillierte Kenntnisse über Entstehung und Bedeutung dieser Faktoren und ihre Auswirkung auf die diagnostische Interpretation unerlässlich. Die Bedeutung variiert stark von Fall zu Fall und hängt vom betrachteten Parameter ab. Ein sehr häufig auftretender, präanalytischer Faktor ist die Hämolyse durch falsche Probennahme und -behandlung. Neben den bekannten, hämolysebedingten, artifiziellen Konzentrationsanstiegen von Phosphat und Kalium wird beispielsweise Zink im Serum hochgradig durch Hämolyse erhöht (eigene, unpublizierte Daten). Eine Hämolyse ist erst ab einem Gehalt von ca. 0,2 g freiem Hämoglobin (fHb)/l im Serum oder Plasma optisch zu erkennen (Thomas, 2002). Jedoch werden als zulässiger Höchstwert beispielsweise 0,02 g fHb/l für Plasma und 0,05 g fHb/l für Serum angegeben (Lippi et al., 2008). Diese niedrigen Konzentrationen werden gemäß den Daten unseres Kliniklabors nur selten erreicht. Insbesondere zeigten die eingesandten, noch nicht zentrifugierten Serumproben nur in etwa 4% der Fälle fHb Konzentrationen unter 0,2 g fHb/l (eigene, unpublizierte Daten). Generell ist daher die regelmäßige Analyse von fHb im Serum und Plasma ratsam, um das Ausmaß der Hämolyse zu quantifizieren. Dieses kritische Vorgehen hat sich für die nachfolgende Untersuchungen zu den metabolischen Auswirkungen einer marginalen gegenüber einer bedarfsgerechten Selenversorgung bei Schafen (Publikationen 3-6) als sinnvoll erwiesen: Es zeigte sich, dass über 90% der Gesamt-GPx-Aktivität im Vollblut aus den lysierten Erythrozyten stammt. Im hämolytischen Serum kann daher die GPx – Aktivität artifiziell erhöht sein. Für die Untersuchung der GPx-Aktivität im Serum sollte zukünftig die Etablierung eines Hämolyse - Korrekturfaktors erwogen werden.

Grundsätzlich müssen Laborergebnisse mit dem Wissen evaluiert werden, dass präanalytische Faktoren falsche Interpretationen nach sich ziehen können. Die hohe Variabilität der präanalytischen Vorgehensweisen fordert auch eine gewisse Vorsicht beim Vergleich von eigenen Laborergebnissen mit Referenzwerten aus der Literatur oder Ergebnissen anderer wissenschaftlicher Studien. Eine intensive Kommunikation mit dem Untersuchungslabor

bereits vor der Probennahme bzw. vor Beginn wissenschaftlicher Studien ermöglicht eine gute präanalytische Praxis, exzellente Laborergebnisse sowie die Vermeidung von Fehlinterpretationen. Es ist wünschenswert, zukünftig standardisierte Richtlinien für präanalytische Abläufe bei der Arbeit mit Nutztieren zu entwickeln.

6.2. Selen in der Ernährung

Die zeitgemäße Sichtweise, Krankheiten bei Mensch und Tier als eher multifaktorielle Geschehen zu betrachten, rückte zunehmend Mineralstoffe und Spurenelemente in den Fokus der medizinischen Forschung. Der Beschreibung von Selen als essentielles Spurenelement (Schwarz and Flotz, 1957) folgten zahlreiche Studien zu den pathologischen Folgen einer Selenunterversorgung wie auch der Selenvergiftung. Es folgten gezielte Substitutionsversuche in Selenmangelgebieten, darunter sogar landesweite Selenanreicherungen der Düngemittel wie in den 1980er Jahren in Finnland (Makela et al., 1993; Makela et al., 1995; Wang et al., 1995). Die gezielte Anreicherung von humanen Nahrungsmitteln prägte die Bezeichnung ‚functional food‘. Mineralfuttermittel für Nutztiere enthalten heute fast immer Selenzusätze als Natrium-Selenit, Natrium-Selenat oder organisch gebundenes Selen, da bei vorwiegender Ernährung durch Futtermittel aus lokaler Produktion auf Böden mit geringen Selengehalten Unterversorgungen der Nutztiere kaum vermeidbar sind. In Australien/Neuseeland sind sogar häufig Impfstoffe (z.B. WEBSTERS[®] 5 in 1 Vaccine with selenium, Virbac Animal Health, Australia) und Anthelmintika (z.B. Cydectin[®]Se oral drench, Virbac Animal Health, Australia) mit Selenzusätzen versehen. Jedoch gibt es auch Berichte von Selenvergiftungen bei Schafen (Hucker, 2013) durch solche Produkte. Es gilt auch hier der Grundsatz, dass immer die Dosis für den gesundheitlichen Nutzen oder das Risiko ausschlaggebend ist. Die Entscheidung für oder gegen eine Substitution der Nahrung muss auf soliden wissenschaftlichen Fundamenten stehen.

6.3. Selen in der tierärztlichen Bestandsbetreuung

Die Bewertung der Fütterung ist eine tragende Säule der Herdenbetreuung in der tierärztlichen Nutztierpraxis. Während in früheren Jahrzehnten vor allem die akute Nutritive Muskeldystrophie als Selenmangelkrankheit im Fokus der Tierärzte stand, beachtet die moderne Bestandsbetreuung die Selenversorgung der Tiere insbesondere in Bezug auf die

subklinischen Auswirkungen wie verminderte tägliche Zunahmen (Shi et al., 2011) und Reproduktionsleistung (Gabryszuk and Klewiec, 2002) sowie die Einschränkungen der Immunabwehr (Kumar et al., 2009). Das Auftreten einer Selenunterversorgung in deutschen Schafherden ist, wie in Publikation 2 dargestellt, weit verbreitet. Hervorzuheben ist, dass die Angaben der Tierhalter, Mineralfutter einzusetzen, offenbar keinen Rückschluss auf adäquate Versorgung zulassen. Gründe dafür sind vor allem Unterdosierungen sowie mangelnde Akzeptanz des Mineralfutters oder eingeschränkte Möglichkeit zur Aufnahme. So verdrängt unter Umständen ein dominantes Tier andere wirkungsvoll von der Mineralleckschale. Auch die Angabe der lokalen Bodenart durch den Landwirt kann offenbar ebenfalls nicht zur tierärztlichen Einschätzung der Selenversorgung genutzt werden. Verantwortlich dafür ist vermutlich die Abhängigkeit der Selenkonzentration in den angebauten Futtermitteln von vielfältigen Bodenfaktoren wie pH des Bodens, den lokalen Redox-Bedingungen, der Selenbindungsform, der Bodentextur, der mineralischen Zusammensetzung, dem Anteil an organischer Substanz sowie das Vorkommen antagonistischer Ionen (Johnson et al., 2009). Eine Untersuchung der eingesetzten Futtermittel ist aufgrund häufigen Flächenwechsels der Herden sowie erheblicher Untersuchungskosten oft nicht durchführbar. Folglich muss sich die Diagnostik auf die Tierebene mit labordiagnostischer Untersuchung vom Blut oder Lebergewebe stützen. Wie aus technischer Sicht zu erwarten, korrelierten die Selenkonzentrationen der in der präanalytischen Phase hergestellten Pools von jeweils fünf Serumproben gut mit dem Mittelwert einzeln untersuchter Proben. Erstaunlich hoch war aber oft die Spannweite zwischen der niedrigsten und der höchsten Selenkonzentration im Serum innerhalb der 10 Proben aus einer Herde. Aus diesem Grund ist von Pooluntersuchungen eher abzuraten: Sie würden relevante diagnostische Informationen unterdrücken und es bliebe unerkannt, dass der Zugang der Einzeltiere zur Selenaufnahme offensichtlich nicht für alle Schafe gleichmäßig gewährleistet ist.

Das häufigere Vorkommen der Selenunterversorgung in Wanderschafherden während der Weideperiode, das Ausbleiben dieser Unterschiede zu Betrieben mit Koppelschafhaltung in der winterlichen Stall- bzw. Ablampperiode sowie die negative Korrelation der Herdengröße zum Selenstatus reflektiert vor allem die logistische Problematik der oralen Mineralstoffzufuhr während der Wanderschaft sowie in großen Herden. Da beispielsweise die Selen-abhängige GPx essentiell für die Embryonalentwicklung (Ufer and Wang, 2011) und Spermaqualität (Watanabe and Endo, 1991) ist, muss durch den betreuenden Tierarzt eine Intervention zur Sicherung der Produktivität angeregt werden. Möglichkeiten zur

Optimierung der Selenversorgung bestehen über die parenterale Injektion von Selenpräparaten zu strategisch festgelegten Produktionszeitpunkten, die Anwendung von derzeit in Deutschland nicht zugelassenen Vormagen-Boli (Langlands et al., 1994) oder die gezielte Ausbringung selenhaltiger Düngemittel auf Schafweiden (Cloete et al., 1999; Hall et al., 2009). Erstaunlich war in unserer Studie der scheinbare Bezug des Selenstatus zur Art der Wasserversorgung mit geringerem Selenstatus bei Verwendung von Oberflächenwasser. Denn bis auf sehr spezielle Ausnahmen ist der Anteil der Selenzufuhr über Trinkwasser vernachlässigbar (Barron et al., 2012). Eine denkbare Erklärung wäre ein Zusammenhang mit einem völlig anderen Betriebsfaktor: dem Betreuungsaufwand durch den Tierhalter. Der tierärztliche Rat, natürliche Gewässer im Rahmen der Parasitenprophylaxe zu meiden und großflächig auszuzäunen, ist den Schafhaltern in der Regel wohl bekannt. Der Umstand, dass der Tierhalter dennoch Oberflächenwasser nutzt und auf den Gebrauch von Kunsttränken incl. regelmäßigem Wassertransport verzichtet, könnte möglicherweise auch mit einer geringeren Sorgfalt bezüglich der regelmäßigen Mineralstoffsupplementierung einhergehen. Ob auch eine möglicherweise höhere Aufnahme von Selenantagonisten (z.B. Schwefelverbindungen) über Oberflächenwasser eine Rolle spielen könnte, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

6.4. Parameter des Selenstoffwechsels in Blut und Organen der Schafe

Der besondere Wert der Untersuchungen zu den metabolischen Auswirkungen der differenzierten Selenversorgung (Publikation 6) liegt in der Konzeption der Studie als Langzeitversuch mit systematisch wiederholten Analysen von Blut und biotisch gewonnenem Lebergewebe sowie der postmortalen Einbeziehung der Organe Schilddrüse, Herzmuskel und Niere. Die Ausgangssituation der Schafe entsprach einer marginalen Selenversorgung, wie sie in Deutschland häufig anzutreffen ist (Publikation 2). Während unter Praxisbedingungen oft zusätzliche Unterversorgungen, z.B. bezüglich Cu und Zn, anzutreffen sind, konnte unser Studiendesign diese Faktoren ausschließen: Die Konzentrationen von Cu und Zn in der Leber waren für beide Fütterungsgruppen im Referenzbereich für Schafe und es gab in den Lebergewebskonzentrationen keine Gruppenunterschiede. Die Selenzulage an die Se+ Gruppe führte zu deutlichen, labordiagnostisch sehr gut quantifizierbaren Reaktionen. Die Serum-Selenkonzentration repräsentierte die neuen Fütterungsbedingungen bereits nach wenigen Tagen. Während unsere

erste Messung am Tag 10 bereits die ‚steady state‘ Bedingungen abbildete, konnten bei Büffelkälbern (Deore et al., 2005) und Ratten (Erkhembayar et al., 2011) jeweils bereits am 3. bzw. 1. Tag nach Futterumstellung angestiegene Serum-Selenkonzentrationen gefunden werden. Bei konstanter Fütterung blieb in unserer Studie auch die Serum-Selenkonzentration auf gleichbleibendem Niveau. Dagegen zeigte die langfristige, marginale nutritive Selenzufuhr in der Se- Gruppe einen weiteren Effekt sehr deutlich: es kommt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Selenkonzentration im Serum mit einer Halbierung der Ausgangskonzentration innerhalb von zwei Jahren.

Die Analyse der GPx-Aktivität im Vollblut diente lange Zeit als preisgünstiger Parameter zur Einschätzung der Selenversorgung (Anderson et al., 1979; Wiener et al., 1983). Etwa 97% der Vollblut-GPx-Aktivität unserer Versuchstiere wurde von der erythrozytären GPx1-Aktivität bestimmt, daher hängt dieser Parameter sehr stark von der Selenverfügbarkeit zum Zeitpunkt der Erythropoese ab. Eine Futterumstellung beeinflusst somit diesen Parameter bis zur vollständigen Regeneration des Erythrozytenpools für etwa 120 Tage. Dies erklärt den nur langsamen Anstieg der Vollblut-GPx-Aktivität der Se+ Gruppe, die größten Differenzen gegenüber den Selenmangeltieren wurden erst nach Tag 110 erreicht. Die Daten zeigen, dass die Verwendung dieses Parameters zur Diagnostik nur dann sinnvoll ist, wenn Veränderungen im Fütterungsregime für die zurückliegenden drei Monate ausgeschlossen werden können.

Die GPx3-Aktivität im Serum wurde auch bereits früher als Biomarker des Selenstatus verwendet, allerdings zeigte dieser Parameter nur mäßige Korrelation zur Selenzufuhr (Sunde et al., 2008) sowie deutliche Tag-zu-Tag Variationen (Lum et al., 2009). Auch unsere Ergebnisse zeigen die individuellen Schwankungen der GPx3-Aktivität im Serum deutlich. Dieses Selenoenzym stellt allerdings auch nur ca. 25% des Gesamt-Selens im Serum dar (Beilstein and Whanger, 1983), die diagnostische Aussagekraft scheint daher begrenzt zu sein.

Langzeitstudien mit wiederholter Analyse von bioptisch gewonnenem Lebergewebe sind aufgrund des Aufwandes und des Risiko selten. Wie unsere Ergebnisse jedoch zeigen, können auf diese Weise wertvolle Aussagen über die Leber als zentrales, metabolisches Organ gemacht werden. Die Leber-Selenkonzentration stieg innerhalb weniger Tage hochsignifikant an und verblieb danach stabil auf einem Plateau bis zum Versuchsende. Anders als im Blut fiel die Leber-Selenkonzentration bei den Se- Schafen nicht ab, dies könnte als Adaptationsprozess an die geringe Selenverfügbarkeit zur Sicherung der hepatischen Selenoproteinsynthese interpretiert werden. Die hepatische GPx1-Aktivität stieg

interessanterweise in der Se+ Gruppe langsam an und zeigte ein Maximum erst an Tag 200, einem Zeitraum, in der die Serum-GPx3 besonders geringe Aktivitäten zeigte. Danach kam es wieder zu einem leichten Abfall der hepatischen GPx1-Aktivität. Die Ursache dieses Verlaufes bleibt unklar.

Die TrxR-Aktivität im Lebergewebe zeigte sich in unserer Studie als weniger reaktiv zur Differenzierung zwischen marginaler und bedarfsgerechter Selensubstitution. Allerdings waren zum Ende des Versuches, bei maximaler Differenz der Serum-Selenkonzentrationen, signifikante Unterschiede der hepatischen TrxR-Aktivität zwischen der Se+ und der Se-Gruppe darstellbar. Dieses Enzym scheint eine höhere Stellung in der sogenannten ‚Hierarchie der Selenoproteine‘ einzunehmen, so zeigten Ratten auch erst bei Futterkonzentrationen unter 0,06 mg Se/kg TS Einschränkungen der TrxR-Aktivität (Sunde and Raines, 2011). Bezogen auf den Futterumstellungseffekt von marginaler zu bedarfsgerechter Versorgung zeigten Studien bei Ratten, dass die hepatische TrxR mRNA Expression bereits am Tag 1 einer Selenzulage, assoziiert an den zellulären Anstieg der Selenkonzentration, deutlich ansteigt und bis zum Tag 7 wieder auf das Initialniveau abfällt (Erkhembayar et al., 2011). Sehr wahrscheinlich haben wir zum Zeitpunkt unserer ersten Leberbiopsie nach Futterumstellung diesen Initialeffekt nicht mehr darstellen können.

Auch die Lunge (Publikation 5), der Herzmuskel, die Nieren und die Schilddrüse zeigten bezüglich der zytosolischen Selenkonzentration (nicht Niere) und der GPx1-Aktivität signifikante Unterschiede durch die zwei Fütterungsstufen. Für diese Organe kann demnach bei Selenunterversorgung eine verminderte antioxidative Kapazität der Zellen angenommen werden.

Die Dio sind Selenoproteine mit wesentlichen Funktionen für die lokale und systemische Schilddrüsenhormonhomöostase. Die Dio1-Aktivität in Leber und Schilddrüse ist unter physiologischen Bedingungen maßgeblich für die Produktion von zirkulierendem T3 verantwortlich (Koehle et al., 2005). Während in unserer Studie auf Hormonebene, wie auch bereits von Anderen beschrieben (Chadio et al., 2006), keine fütterungsinduzierten Gruppenunterschiede dargestellt werden konnten, war die hepatische Dio1-Aktivität der Se+ Gruppe höher als die der Se- Gruppe. Die hepatische Dio1-Aktivität wird allerdings nicht nur vom Selenstatus, sondern auch von T3 reguliert (Zavacki et al., 2005), so dass Selen hier nur einer von mehreren modulierenden Faktoren ist. Dennoch ist festzuhalten, dass die Metabolisierung der Schilddrüsenhormone offensichtlich auch bei Schafen von der nutritiven

Selenzufuhr beeinflusst wird. Ob damit klinische Symptome, wie beispielsweise Wachstumsverzögerungen bei Lämmern erklärbar wären, bedarf weiterer Studien.

Alle bisher aufgeführten, metabolischen Konsequenzen der differenzierten Selenversorgung klären aber noch nicht die Frage, bis zu welchem Stadium eine erfolgreiche Kompensation erfolgt und ab wann ein Selenmangel für den Organismus wirklich metabolisch relevant wird. Dieser Punkt ist schwer definierbar, zumal die klinische Definition ‚krank/gesund‘ zu grob ist, da gerade für Selenmangel die diversen unspezifischen, subklinischen Auswirkungen bekannt sind. Eine mögliche Herangehensweise ist die Suche nach einer metabolischen Gegenreaktion. Gibt es beispielsweise eine zellulär initiierte Kompensation der verminderten antioxidativen GPx1-Aktivität? Die Familie der Glutathion - S - Transferasen (GST) gehört zu den sogenannten Phase II Enzymen, die wesentliche Funktionen im Rahmen der Biotransformation von auszuscheidenden Substanzen einnehmen. Ziel ist die Wasserlöslichkeit und damit die Exkretionsfähigkeit über Gallenflüssigkeit oder Niere zu erreichen. Die GST konjugieren dabei die Produkte der Phase I beispielsweise mit Glutathion. Sengupta und Kollegen (2008) postulierten, dass die vermehrte Expression der GST eine verminderte Selenoproteinexpression zumindest in Teilen kompensieren kann (Sengupta et al., 2008). Studien an Ratten zeigten eine Induktion der alpha-GST (aGST) in der Leber von selendefizienten Tieren, die bei bedarfsgerecht mit Selen gefütterten Tieren nicht auftrat (Chang et al., 1990; Wolf et al., 2010). Während unsere Untersuchungen auf Enzymebene keine Unterschiede der aGST-Aktivität in Leber, Niere und Herzmuskel darstellen konnten, konnte mittels der sensitiveren PCR in der Leber der selendefizienten Schafen eine signifikant höhere relative aGST mRNA-Expression gegenüber den Se⁺ Schafen gezeigt werden. Die Transkription der aGST wird demnach möglicherweise als Gegenreaktion zu einer verminderten Selenoprotein- und Selenoenzymsynthese gesteigert, die Notwendigkeit dazu war unter den gewählten Fütterungsbedingungen in unserer Studie offenbar bereits gegeben. Es erscheint lohnend, das Ausmaß dieser Reaktion in mehr als zwei Fütterungsstufen weiter zu untersuchen. Möglicherweise wäre die relative aGST mRNA-Expression ein Instrument, die Frage des Selenbedarfs und der Bioverfügbarkeit verschiedener Selenverbindungen zukünftig genauer zu definieren.

6.5. Eine Schafkrankheit als onkologisches Modell – Beeinflusst der Selenstatus die Progression der OPA?

Die Bedeutung der Ernährung in der Krebsprävention sowie während der Therapie rückte in den letzten Jahren zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus, da hier ein modulierender Einfluss möglich erscheint, währenddessen z.B. Umweltbedingungen schwerer zu beeinflussen sind. Onkologische Studien, welche die Selenzufuhr als nutritiven Faktor untersuchen, befassen sich sowohl mit supranutritiver als auch mit bedarfsgerechter und marginaler Selensubstitution. Der Nutzen dieser Interventionen wird jedoch wissenschaftlich kontrovers diskutiert, zudem wurde kürzlich ein möglicher Zusammenhang einer supranutritiven Selensubstitution mit einer Dysregulation des Kohlenhydratstoffwechsels und einem vermehrtem Auftreten von Diabetes mellitus Typ II postuliert (Mueller et al., 2009; Steinbrenner et al., 2011). Epidemiologische Studien beim Menschen sind aufgrund zahlreicher individueller Nebeneffekte auf die Probanden oft von begrenzter Aussage. Experimentelle Untersuchungen fanden bisher fast ausschließlich an Tumorzellen in vitro oder an Labornagern mit künstlich erzeugten Tumoren statt. Die Schafkrankheit OPA weist demgegenüber als onkologisches Modell einige Vorzüge auf: Der Tumor und das auslösende Agens JSRV sind speziesspezifisch und die Interaktion Wirt-Virus-Tumor findet somit unter natürlichen Verhältnissen statt. Die Selenunterversorgung kommt unter natürlichen Bedingungen beim Schaf vor, die bedarfsgerechte Selenkonzentration im Futter ist bekannt und kann durch begleitende labordiagnostische Untersuchungen bestätigt werden. Die Erkrankung eignet sich als Langzeitstudie und kann über wiederholte computertomographische Untersuchungen der Lunge visualisiert werden. Zudem folgt sie zeitlich einer Progression, die den humanen Lungenadenokarzinomen ähnlich ist und die Schaflunge ist auch bezüglich der Organgröße vergleichbar mit der des Menschen.

Für die Etablierung dieses Modells waren umfangreiche Vorarbeiten notwendig (Publikation 3), da die Computertomographie der Schaflunge keine Routineuntersuchung ist. Neben der vergleichenden Untersuchung kranker und gesunder Schafe wurde ein Score-System zur Quantifizierung der OPA-Progression generiert. Dieses erwies sich als geeignet zur Darstellung der Lungenveränderungen pro Tier und pro Fütterungsgruppe über den gesamten Zeitraum von zwei Jahren. Jedoch unterlag der Score zumindest teilweise auch leichten Variationen, die durch das Studiendesign bedingt waren. So führen sowohl die Atmung als auch weitergeleitete Bewegung der Herzaktion zu relativen Veränderungen des Tumolvolumens auf dem einzelnen CT-Bild (Boll et al., 2004; Petkovska et al., 2007). Die

Nutzung spezieller Software zur Berechnung des Tumolvolumens im dreidimensionalen Modell (Rampinelli et al., 2009) oder die Nutzung einer Respiratory Gating Technik (Giraud and Houle, 2013) mit Messung und retrospektiver Korrektur von Bewegungsartefakten wäre für zukünftige Untersuchungen eine Optimierungsoption zur Steigerung der Sensitivität.

Ein Einfluss des Selenstatus auf die OPA-Progression konnte in unserer Studie nicht dargestellt werden. Allerdings konnte eindeutig gezeigt werden, dass die zwei Selen-Fütterungsstufen das antioxidative System in der Lunge moduliert haben: die zytosolische GPx1-Aktivität in makroskopisch unauffälligem Lungengewebe war bei der Se+ Gruppe etwa zweieinhalbfach höher verglichen mit der Se- Gruppe, ebenso unterschieden sich die Selenkonzentrationen im Lungengewebe zwischen den Gruppen signifikant. Kürzlich ergab eine erneute Evaluation der Bedeutung der GPx1-4 in der Onkologie Hinweise darauf, dass der Zeitpunkt der nutritiven Intervention mit Selen vermutlich von großer Bedeutung ist. Während nämlich alle GPx eine präventive Rolle bei der Initiation und Metastasierung von Tumoren einnehmen, scheint die GPx2 in humanen Kolonkarzinomzellen sogar eher die Tumorpherifation zu fördern, indem die GPx2 die einmal entartete, sich unkontrolliert vermehrende Zelle vor Apoptose schützt (Brigelius-Flohé et al., 2012). Dieser Kontext erklärt möglicherweise die Ergebnisse unserer Studie, in der kein günstiger Einfluss des höheren Selenstatus in der Lunge auf die Tumorpherifation darstellbar war.

Der immunhistochemische Nachweis der GPx1 in den Lungen unserer Versuchstiere deutete weitere Details in der GPx1-Aktivität in ovinen Adenokarzinomen an: Kleine und mittlere Tumore zeigten einen höheren Anteil an GPx-positiven Zellen sowie eine intensivere, immunhistochemische GPx-Färbung als große Tumorknoten. In Studien zum humanem Brustkrebs konnten positive Korrelationen zwischen Markern für die Intensität der Tumorpherifation und der GPx-Aktivität dargestellt werden (Perquin et al., 2001). Es wäre daher lohnend, die OPA-Präparate weiterführend mit Hilfe spezifischer Proliferationsmarker auf die Hypothese hin zu untersuchen, ob eine gesteigerte GPx-Aktivität möglicherweise bei manifesten Tumoren sozusagen ‚tumorprotektiv‘, apoptosehemmend und damit proliferationsfördernd wäre.

6.6. Wissenschaftlicher Ausblick

Die vorgestellten onkologischen Untersuchungen waren als interdisziplinäres Pilotprojekt angelegt. Die OPA ist zwar eine wichtige und veterinärmedizinisch beachtete Krankheit in Schafherden weltweit, jedoch fokussieren sich präventive und therapeutische Maßnahmen hier auf eine Eradikation des auslösenden JSRV (Voigt et al., 2007b). Das vorgestellte Tiermodell stellt daher vor allem einen interdisziplinären Ansatz zur wissenschaftlichen Bearbeitung von Zusammenhängen zwischen Ernährung und Karzinogenese dar. Ähnlich wie für Selen in der vorgestellten Studie durchgeführt, wäre es denkbar, zukünftig weitere ernährungsbedingte Faktoren zu modulieren und Auswirkungen auf die Tumorprogression im Langzeitversuch zu verfolgen. Es bieten sich aber noch einige weitere wissenschaftliche Optionen, von denen einige Beispiele genannt seien:

- Neben der natürlichen, horizontalen JSRV-Infektion von Tier zu Tier besteht auch die Möglichkeit, die Infektion experimentell durch intratracheale Applikation virushaltiger Lungenflüssigkeit zu erzeugen und OPA damit auszulösen (Sharp et al., 1983; Salvatori et al., 2004). So könnte die Phase der initialen Karzinogenese unter verschiedenen Stufen der nutritiven Selensubstitution untersucht werden. Nach derzeitiger Sichtweise zeigen in der Phase der Krebsinitiation alle Glutathionperoxidasen eine präventive Funktion (Brigelius-Flohé et al., 2012).
- Die zytotoxische Wirkung sehr hoher Gaben von Natrium-Selenit auf Lungentumorzellen (Selenius et al., 2008) wird derzeit von einer Stockholmer Arbeitsgruppe in einer klinischen Phase I Studie bei fortgeschrittenem humanem Lungenkarzinom untersucht (Brodin et al., 2013). Für diesen wissenschaftlichen Ansatz könnte sich die OPA als reizvolles, alternatives Studienmodell erweisen.
- OPA führt zu einer Proliferation der Surfactant-produzierenden Typ II Pneumozyten und der Clarazellen (Platt et al., 2002). Daher ist die Morphologie des Surfactant der OPA-Schafe vermutlich deutlich pathologisch verändert, jedoch gibt es hierzu bisher kaum Daten. Das Surfactantsystem der Lunge dient sowohl der Regulation der alveolären Oberflächenspannung als auch dem Schutz der Alveolen vor pathogenen Einflüssen, beispielsweise durch Bakterien (Orgeig et al., 2010). Als Folgeprojekt wird derzeit im Rahmen einer Dissertation in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. Dr. Schmiedl, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie) die Stereologie des Surfactants mittels Transmissionselektronenmikroskopie in Material der OPA-Tiere sowie gesunden

Kontrolltieren und in Bezug auf den Selenstatus der Tiere untersucht. Zudem werden Daten zur minimalen Oberflächenspannung des Surfactant mit Hilfe des Pulsating-Bubble-Surfactometer erarbeitet.

- Für die Analyse von SePP im Serum von Nutztieren steht bisher kein Testsystem zur Verfügung, jedoch wurde ein solcher Test für humanes Serum von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lutz Schomburg, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin bereits bis zur kommerziellen Vermarktung etabliert. Es bestehen Planungen, die bisherige Kooperation auszubauen und gemeinsam ein Testsystem für SePP im Serum von Nutztieren zu entwickeln.
- Die Frage nach dem Selenbedarf der verschiedenen Nutztierarten sowie nach der Bioverfügbarkeit verschiedener Selenverbindungen (organisch/anorganisch) kann möglicherweise mit der Untersuchung der hepatischen, relativen aGST mRNA-Expression zukünftig besser beantwortet werden. Es erscheint lohnend, das Ausmaß dieser Reaktion in mehr als zwei Fütterungsstufen sowie an Rindern und Schweinen weiter zu untersuchen.
- Die GPx1/GPx3-Aktivität im Vollblut zeigte eine eindeutige, an die Regeneration des Erythrozytenpools gekoppelte Dynamik nach Wechsel zur höheren Selenkonzentration im Futter. Dagegen stiegen die Selenkonzentration im Serum innerhalb weniger Tage und die hepatische GPx-Aktivität innerhalb mehrerer Wochen deutlich an. Diese Dynamik könnte zukünftig zur zeitlichen Eingrenzung und wissenschaftlichen Aufarbeitung von Selenvergiftungen sowie zur genaueren Beschreibung des Versorgungsstatus von Herden herangezogen werden.
- Für die Herdenbestandsbetreuung konnte gezeigt werden, dass die Selenkonzentration im Serum, aber auch in Leber, Lunge, Herzmuskel und Schilddrüse die zwei Selenfütterungsstufen repräsentieren kann. Das erweitert das mögliche Organspektrum zur Diagnostik des Selenstatus.
- Die Optimierung der Präanalytik in der veterinärmedizinischen Labordiagnostik erscheint dringend notwendig. Verbesserungen auf diesem Gebiet werden von Laborleitern immer wieder gefordert und sind ein wesentlicher Punkt der Qualitätssicherung. Es wäre wünschenswert, hierfür praktikable Richtlinien für die Gewinnung von Probenmaterial bei Nutztieren auszuarbeiten.

7. Zusammenfassung

Labordiagnostische Untersuchungsergebnisse können durch zahlreiche präanalytische Faktoren maßgeblich beeinflusst und verfälscht werden. Einleitend wurde daher eine Übersichtsarbeit zur labordiagnostischen Bedeutung der Präanalytik bei der Untersuchung von Blutproben sowie zu Möglichkeiten der Optimierung der Präanalytik erstellt. Die erarbeiteten Meilensteine bezüglich optimaler Probengewinnung, -aufbereitung und -lagerung boten das Fundament der folgenden experimentellen Arbeiten und wurden in die Qualitätssicherung eingebunden.

Die folgenden Arbeiten befassen sich mit dem Spurenelement Selen. Deutschland und viele Regionen Nordeuropas sind als Gebiete mit geringen Selengehalten der regional angebauten Futtermittel beschrieben worden. Selen ist ein essentieller, integraler Bestandteil der Selenoenzyme und -proteine, nur einige davon konnten bisher auch funktionell charakterisiert werden. So nehmen die Glutathionperoxidasen (GPx) und Thioredoxin Reduktasen (TRxR) vor allem antioxidative Funktionen wahr, die Iodothyronindeiodinase1 (Dio1) ist ein wichtiges Enzym im Schilddrüsenhormonmetabolismus. Die Glutathion-S-Transferase alpha (aGST) ist kein Selenoenzym, wird aber im Selenmangel möglicherweise bei sinkender zellulärer, antioxidativer Kapazität als Kompensationseffekt vermehrt exprimiert. Neben Studien zu den funktionellen Grundlagen findet Selen aufgrund seiner Rolle im antioxidativen Stoffwechsel zunehmend auch Beachtung in der Forschung zur Krebsprävention.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Ausprägung der Selenunterversorgung in deutschen Schafherden epidemiologisch und anhand von Bestandsmerkmalen untersucht. Über ein Drittel aller untersuchten Schafherden (n=150) wiesen im Serum einen deutlich zu geringen Selenstatus auf, der eine Optimierung des Fütterungsregimes dringend erfordert. Dabei zeigte sich, dass die Angabe des Landwirts, Mineralfutter einzusetzen, keinerlei Sicherheit für eine Annahme einer ausreichenden Versorgung der Tiere darstellt. Eine Überprüfung der Selenkonzentrationen im Serum ist daher im Rahmen der Herdenbetreuung ratsam. Einflussfaktoren für eine Selenunterversorgung waren vor allem die Herdengröße sowie die Haltung als Wanderschafherde während der Weideperiode.

Des Weiteren wurde im experimentellen Ansatz die, durch das Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) induzierte, ovine Lungenadenomatose (ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA)) mit zwei verschiedenen Selenversorgungsstufen kombiniert und damit ein neues Studienmodell

etabliert. Ziel war die Untersuchung des möglichen Zusammenhangs zwischen Selenstatus und Tumorprogression im Langzeitmodell.

Als methodische Grundlage für diese Fragestellung wurde zunächst die Computertomographie (CT) der Schaflunge unter standardisierten Bedingungen eingeführt und ein CT-OPA-Score System zur Quantifizierung der Lungenveränderungen bei wiederholten Untersuchungen erarbeitet. Die CT-Befunde und daraus generierten CT-OPA-Scores korrelierten gut mit den pathomorphologischen und -histologischen Untersuchungsergebnissen. Vorteile gegenüber der Röntgentechnik sind die frühe und sensitive Darstellung sowie die klare Lokalisierung und Wiederfindung bereits kleiner Lungenveränderungen bei Schafen mit OPA.

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Selenstatus und Tumorprogression wurden sechzehn adulte, natürlich im Herkunftsbetrieb mit JSRV infizierte Versuchstiere in zwei Gruppen unterteilt und mit marginaler ($< 0,05$ mg Se/kg Trockensubstanz (TS)) beziehungsweise bedarfsgerechter (0,2 mg Se/kg TS) Selenkonzentration in der Gesamtration gefüttert. Die JSRV-Infektion wurde in der bronchoalveolären Lavage, sowie später postmortal in Lunge und Lungenlymphknoten mittels PCR belegt. Die OPA-Progression wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren mittels Lungen-CT dargestellt. Pathomorphologische, pathohistologische sowie immunhistologische Untersuchungen schlossen diese erste Nutzung von OPA als Tumormodell mit nutritiv modulierten Bedingungen ab. Das Fütterungsregime führte zu signifikanten Gruppenunterschieden in den Selenkonzentrationen und den zytosolischen GPx1-Aktivitäten im Lungengewebe. Die immunhistochemische Intensität der GPx1-Markierung erschien reziprok zur Tumorgroße. Die vierteljährliche Untersuchung der Lungen mittels CT ergab über einen Zeitraum von zwei Jahren keine Unterschiede in der Tumorprogression zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Jedoch erwies sich das Tumormodell als geeignet für Langzeituntersuchungen unter Einbeziehung nutritiv modulierbarer Einflussfaktoren.

Die weiteren Auswirkungen der differenzierten Selenfütterung auf labordiagnostische Parameter wurden über Blutuntersuchungen, durch vierteljährlich gewonnene Leberbiopate sowie postmortal untersucht. Während der gesamten Untersuchungsphase wurden keine klinischen Anzeichen einer Nutritiven Muskeldystrophie bei den Versuchstieren festgestellt. Die Untersuchung der hämatologischen und klinisch-chemischen Routineparameter einschließlich leber- und muskelspezifischer Enzyme ergab ebenfalls in beiden Gruppen keine besonderen Auffälligkeiten. Leber, Nieren, Herzmuskel und Schilddrüse dagegen zeigten

signifikante Gruppenunterschiede in den Selenkonzentrationen (nicht Niere) sowie in den zytosolischen GPx1-Aktivitäten. Für die zellulären TrxR- und Dio1-Aktivitäten ließ sich dieser Effekt nur im Lebergewebe nachweisen. Im Blut erwies sich die Serum-Selenkonzentration als sensitiver Marker der nutritiven Selenversorgung. Zudem reflektierte die Leber-Selenkonzentration die Futterumstellung auf die bedarfsgerechte Selensubstitution innerhalb weniger Tage. Die hepatische GPx1-Aktivität erreichte ein Maximum erst zwischen Tag 100-200 und fiel danach wieder ab. Die marginal mit Selen versorgten Schafe zeigten einen kontinuierlichen Abfall der Selenkonzentration im Serum auf 50% des Ausgangsniveaus innerhalb von zwei Jahren, wohingegen die Leber-Selenkonzentrationen dieser Gruppe unverändert blieben. Die GPx-Aktivität im Vollblut stieg nach Umstellung auf die bedarfsgerechte Selenzufuhr nur langsam in einen Zeitraum von etwa drei Monaten, parallel zur Regeneration des Erythrozytenpools, an. Die höhere relative, hepatische GPx1 mRNA Expression der bedarfsgerecht gefütterten Gruppe korrespondierte mit der hohen hepatischen GPx1-Aktivität. Die vermehrte Expression der hepatischen aGST mRNA bei den marginal mit Selen versorgten Schafen verdeutlichte die metabolische Relevanz der Unterversorgung mit Selen, da dieses Enzym vermutlich als Kompensation der verminderten antioxydativen Kapazität der Zelle vermehrt exprimiert wird. Die Daten der metabolischen Untersuchungen zeigen zusammenfassend, dass die Selenkonzentrationen in Serum und Leber sowie die hepatische GPx1-Aktivität innerhalb weniger Tage die gesteigerte Selensupplementierung reflektierten, wohingegen die Vollblut-GPx-Aktivität nur sehr langsam anstieg, was die diagnostische Nutzbarkeit dieses Parameters bei wechselnder Fütterung einschränkt. Zentrale Stoffwechselorgane sind von einer marginalen, nutritiven Selenzufuhr bereits in der subklinischen Phase über eine deutliche Beeinträchtigung des zellulären, antioxydativen Systems betroffen.

8. Summary

A multitude of animal-related and technique-related factors in the pre-analytical period affect the diagnostic outcomes of the laboratory approach. The aim of the review was to highlight the importance and source of pre-analytical factors with special respect to diagnostics of farm animals. The knowledge of these factors is a basic requirement for controlling their impact. Therefore, this opening paragraph represents the basic requirements for the experimental studies covered below.

Germany, as well as other countries in northern Europe, was previously considered to provide low selenium in regional grown fodder. Adequate nutritional supplementation of the essential trace element selenium is indispensable for adequate selenoprotein expression and function in animal and human health. The selenoenzymes glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (TrxR) have main functions in the antioxidative system. The iodothyronine deiodinase1 (Dio1) balances the local and systemic concentrations of active and inactive forms of thyroid hormones. Nutritional selenium deficiency was found to up-regulate the expression of phase II enzymes such as cytosolic glutathione-S-transferase alpha (aGST). Additionally, the specific impact of selenium in carcinogenesis has been discussed intensively in the scientific community during the last years due to the potential of supplements and functional food approaches in cancer prevention and therapy.

One aim of the presented investigations was to determine the occurrence of selenium deficiency in an epidemiological study including 150 German sheep flocks. Obviously, selenium deficiency is widespread in German sheep flocks. More than one third of the flocks showed relevant selenium deficiency in serum indicating the strong need to optimise the nutritional management. Using mineral supplements in general was no key factor for different selenium status. As it is impossible for the veterinarian to estimate the final forage Se concentration by environmental factors only, there is a need for validation at animal level. Factors raising suspicion of selenium imbalances are large flocks and transhumance. Stationary flocks had constantly higher mean serum selenium concentrations during the breeding, lambing and grazing period, whereas flocks practising transhumance had significant lower Se status except during lambing.

In the scientific context of the postulated impact of selenium in cancer, we introduced an innovative animal model on lung carcinogenesis using the Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) induced ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA). A score-based quantification of OPA visualised by computed tomography (CT) of the lung was developed. This provides a scientific tool to characterise OPA progression over time in consecutive examinations. Postmortem findings and histopathology of the lung showed good correlation with data from CT. The obvious advantage of the CT technique in contrast to established x-ray imaging was the early and sensitive detection as well as clear localisation of even slight lung alterations in JSRV infected sheep.

Thereafter, we examined the outcome of adequate (0.2 mg Se/kg dry weight (dw)) vs. marginal (< 0.05mg Se/kg dw) nutritional selenium supplementation on OPA progression over a two-year period in 16 adult JSRV infected sheep. This represents the first outcome of using OPA as an experimental, long-term large animal cancer model combined with nutritional modifications. Pro-viral JSRV-DNA was evident in bronchoalveolar lavage cells, lung tissue and lung lymph nodes of the sheep. Adequate vs. marginal nutritional selenium supplementation caused significant differences in selenium concentration and cytosolic GPx1 activity in lung tissues of the two groups. Immunohistochemistry suggested a coherency of GPx1 immunolabelling depending on the tumour size which may depend on proliferation rate. Proliferation of OPA over time was monitored precisely by CT technique; a coherency of cancer progression with nutritional selenium supplementation was not evident. The model proved to be suitable for long-term studies of lung cancer proliferation including the impact of modifiable nutritional factors.

Additionally, the metabolic consequences of the upgrade from marginal to adequate nutritional selenium supplementation were followed biweekly by analysing selenium concentration, GPx activity (GPx1/GPx3) and routine biochemistry in blood/serum. Selenium, copper, zinc, GPx1 and TrxR activity were measured in liver (biopsies/post-mortem). Selenium, GPx1, TrxR, aGST and Dio1 were analysed in the kidney, heart muscle and the thyroid. Relative mRNA expression of hepatic aGST and GPx1 were determined.

Improvement of selenium supplementation strongly altered serum and liver selenium concentration within 10 and 20 days, respectively, followed by a plateau. Whereas the achievement of a maximum whole blood GPx activity was reached after three months, serum GPx3 activity increased with high variations. Hepatic GPx1 activity reached a maximum around day 100-200 while decreasing thereafter. Distinct group differences in selenium

concentration and cytosolic GPx1 activity were evident in all organs (except selenium in the kidney). TrxR and Dio1 activity were affected only in the liver. The controls showed a persistent selenium deprivation reducing concentrations of serum selenium by 50% within two years, whereas liver selenium remained almost unaffected. Relative aGST mRNA expression was higher in selenium-deficient sheep. The higher relative mRNA expression of GPx1 in the adequately supplemented group reflected the high hepatic GPx1 activity. Taking the metabolic data together, selenium concentration in serum/liver and hepatic GPx1 activity reliably reflected the upgrade of selenium supplementation within days. Whole blood GPx reacts slowly depending on newly formed erythrocytes restricting its diagnostic use. Marginally selenium supplemented sheep underwent ongoing selenium deprivation. Vital organs are affected by selenium deficiency attenuating functional parts of the antioxidative system. Severity of the selenium deficient stage was proved by cellular up-regulation of aGST mRNA expression counteracting the restricted antioxidant defence.

9. Literaturverzeichnis

- Alwahaibi, N., Mohamed, J., Alhamadani, A., 2010. Supplementation of selenium reduces chemical hepatocarcinogenesis in male Sprague-Dawley rats. *J Trace Elem Med Biol* 24, 119-123.
- Anderson, P.H., Berrett, S., Patterson, D.S., 1979. The biological selenium status of livestock in Britain as indicated by sheep erythrocyte glutathione peroxidase activity. *Vet Rec* 104, 235-238.
- Arner, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267, 6102-6109.
- ASVCP, 2009. Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology. Quality Assurance Guidelines. American Society for Veterinary Clinical Pathology, Madison, Wisconsin, USA, Retrieved August 10, 2011 from <http://www.asvcp.org/pubs/qas/index.cfm>.
- Awadeh, F.T., Abdelrahman, M.M., Kincaid, R.L., Finley, J.W., 1998. Effect of selenium supplements on the distribution of selenium among serum proteins in cattle. *J Dairy Sci* 81, 1089-1094.
- Barron, E., Migeot, V., Séby, F., Ingrand, I., Potin-Gautier, M., Legube, B., Rabouan, S., 2012. Selenium exposure in subjects living in areas with high selenium concentrated drinking water: results of a French integrated exposure assessment survey. *Environ Int* 40, 155-161.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., Kohrle, J., 1990. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1143-1149.
- Beilstein, M.A., Whanger, P.D., 1983. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in blood fractions from humans, rhesus and squirrel monkeys, rats and sheep. *J Nutr* 113, 2138-2146.
- Bickhardt, K., Ganter, M., Sallmann, P., Fuhrmann, H., 1999. Investigation of the manifestation of vitamin E and selenium deficiency in sheep and goats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 106, 242-247.
- Blum, N.M., Mueller, K., Lippmann, D., Metges, C.C., Linn, T., Pallauf, J., Mueller, A.S., 2012. Feeding of Selenium Alone or in Combination with Glucoraphanin Differentially Affects Intestinal and Hepatic Antioxidant and Phase II Enzymes in Growing Rats. *Biol Trace Elem Res*, doi:10.1007/s12011-12012-19567-12016.
- Boehnke, H.J., Klasink, A., Ehlers, J., 1997. Selenium levels in bovine blood in the Weser-Ems region and effects of selenium fertilization of pasture grounds with extreme selenium deficiency on selenium levels in plants of grazing young dairy cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 104, 534-536.

- Boll, D.T., Gilkeson, R.C., Fleiter, T.R., Blackham, K.A., Duerk, J.L., Lewin, J.S., 2004. Volumetric Assessment of Pulmonary Nodules with ECG-Gated MDCT. *Am J Roentgenol* 183, 1217-1223.
- Brigelius-Flohé, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.
- Brigelius-Flohé, R., 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387, 1329-1335.
- Brigelius-Flohé, R., Kipp, A., 2009. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1555-1568.
- Brigelius-Flohé, R., Muller, M., Lippmann, D., Kipp, A.P., 2012. The yin and yang of nrf2-regulated selenoproteins in carcinogenesis. *Int J Cell Biol* doi:10.1155/2012/486147.
- Brodin, O., Eksborg, S., Fernandes, A., Huusfeldt-Larsen, E., Björnstedt, M., 2013. Pharmacokinetics and toxicity of sodium selenite in a clinical phase I study, examining its value as a treatment against cancer. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Berlin, Germany, 15.-18.09.2013. p.6.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-543.
- Burk, R.F., Hill, K.E., Nakayama, A., Mostert, V., Levander, X.A., Motley, A.K., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Freeman, M.L., Austin, L.M., 2008. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radic Biol Med* 44, 1617-1623.
- Caporale, M., Cousens, C., Centorame, P., Pinoni, C., De las Heras, M., Palmarini, M., 2006. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. *J Virol* 80, 8030-8037.
- Chadio, S., Kotsampasi, B., Menegatos, J., Zervas, G., Kalogiannis, D., 2006. Effect of selenium supplementation on thyroid hormone levels and selenoenzyme activities in growing lambs. *Biol Trace Elem Res* 109, 145-154.
- Chang, M., Burgess, J.R., Scholz, R.W., Reddy, C.C., 1990. The induction of specific rat liver glutathione S-transferase subunits under inadequate selenium nutrition causes an increase in prostaglandin F2 alpha formation. *J Biol Chem* 265, 5418-5423.
- Cloete, S.W., van Niekerk, F.E., Young, M., van der Merwe, G.D., Clark, J., 1999. The application of a selenium fertiliser for the correction of marginal deficiencies in grazing sheep. *J S Afr Vet Assoc* 70, 107-111.
- CLSI, 2007. Clinical Laboratory Standard Institute: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A6). 6. Ed., Wayne, Pennsylvania, US.
- Della Rovere, F., Granata, A., Familiari, D., Zirilli, A., Cimino, F., Tomaino, A., 2006. Histamine and selenium in lung cancer. *Anticancer Res* 26, 2937-2942.

- Dennert, G., Zwahlen, M., Brinkman, M., Vinceti, M., Zeegers, M.P., Horneber, M., 2011. Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD005195.pub2.
- Deore, M.D., Srivastava, A.K., Sharma, S.K., 2005. Effect of reduced glutathione treatment on selenosis, blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity after repeated short-term selenium exposure in buffalo calves. *Toxicology* 213, 169-174.
- Duffield-Lillico, A.J., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Combs, G.F., Jr., Slate, E.H., Fischbach, L.A., Marshall, J.R., Clark, L.C., 2002. Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 630-639.
- Erkhembayar, S., Mollbrink, A., Eriksson, M., Larsen, E.H., Eriksson, L.C., 2011. Selenium homeostasis and induction of thioredoxin reductase during long term selenite supplementation in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 25, 254-259.
- Flueck, W.T., Smith-Flueck, J.M., Mionczynski, J., Mincher, B.J., 2011. The implications of selenium deficiency for wild herbivore conservation: a review. *Eur J Wildlife Res* 58, 761-780.
- Forceville, X., 2006. Seleno-enzymes and seleno-compounds: the two faces of selenium. *Crit Care* 10, 180.
- Fritz, H., Kennedy, D., Fergusson, D., Fernandes, R., Cooley, K., Seely, A., Sagar, S., Wong, R., Seely, D., 2011. Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One* 6, 11.
- Gabryszuk, M., Klewicz, J., 2002. Effect of injecting 2- and 3-year-old ewes with selenium and selenium-vitamin E on reproduction and rearing of lambs. *Small Rum Res* 43, 127-132.
- Giraud, P., Houle, A., 2013. Respiratory Gating for Radiotherapy: Main Technical Aspects and Clinical Benefits. *ISRN Pulmonology* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519602>.
- Greenwald, P., Anderson, D., Nelson, S.A., Taylor, P.R., 2007. Clinical trials of vitamin and mineral supplements for cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 85, 314S-317S.
- Griffiths, D.J., Martineau, H.M., Cousens, C., 2010. Pathology and Pathogenesis of Ovine Pulmonary Adenocarcinoma. *J Comp Pathol* 142, 260-283.
- Gronberg, H., 2003. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361, 859-864.
- Hall, J.A., Van Saun, R.J., Nichols, T., Mosher, W., Pirelli, G., 2009. Comparison of selenium status in sheep after short-term exposure to high-selenium-fertilized forage or mineral supplement. *Small Rum Res* 82, 40-45.
- Hecht, S.J., Carlson, J.O., DeMartin, J.C., 1994. Analysis of a type D retroviral capsid gene expressed in ovine pulmonary carcinoma and present in both affected and unaffected sheep genomes. *Virology* 202, 480-484.

- Hill, K.E., McCollum, G.W., Boeglin, M.E., Burk, R.F., 1997. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 293-295.
- Hill, K.E., Wu, S., Motley, A.K., Stevenson, T.D., Winfrey, V.P., Capecchi, M.R., Atkins, J.F., Burk, R.F., 2012. Production of selenoprotein P (Sepp1) by hepatocytes is central to selenium homeostasis. *J Biol Chem* 287, 40414-40424.
- Hofacre, A., Fan, H., 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. *Viruses* 2, 2618-2648.
- Hollenbach, B., Morgenthaler, N.G., Struck, J., Alonso, C., Bergmann, A., Köhrle, J., Schomburg, L., 2008. New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. *J Trace Elem Med Biol* 22, 24-32.
- Hucker, D., 2013. Selenium toxicosis - a case study., In: Handbook, 8th Int. Sheep Veterinary Congress, 18-22.02.2013, Roturoa, New Zealand, p. 98.
- Humann-Ziehank, E., Ganter, M., Hennig-Pauka, I., Binder, A., 2008. Trace element status and liver and blood parameters in sheep without mineral supply compared to local roe deer (*Capreolus capreolus*) populations. *Small Rumin Res* 75, 185-191.
- Humann, E., Risse, R., Brugmann, M., Henze, P., Ganter, M., 1999. Liver biopsy techniques for sheep. *Tierarztl. Umschau* 54, 151-157.
- ICSH, 1993. Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood for Blood Cell Counting and Sizing. International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry. *Am J Clin Pathol* 100, 371-372.
- Johnson, C.C., Fordyce, F.M., Rayman, M.P., 2009. Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. Symposium on 'Geographical and geological influences on nutrition. *Proc Nutr Soc*, pp. 119-132.
- Kamphues, J., Coenen, M., Iben, C., Kienzle, E., Pallauf, J., Simon, O., Wanner, M., Zentek, J. (Eds.), 2009. Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. M.&H. Schaper, Hannover, Germany. p. 167.
- Koehrle, J., Jakob, F., Contempre', B., Dumont, J.E., 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* 26, 944-984.
- Köhrle, J., 2002. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347, 125-167.
- Koivistoinen, P., Huttunen, J.K., 1986. Selenium in food and nutrition in Finland. An overview on research and action. *Ann Clin Res* 18, 13-17.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R., Gladyshev, V.N., 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300, 1439-1443.

- Kumar, N., Garg, A.K., Dass, R.S., Chaturvedi, V.K., Mudgal, V., Varshney, V.P., 2009. Selenium supplementation influences growth performance, antioxidant status and immune response in lambs. *Anim Feed Sci Technol* 153, 77-87.
- Kuttler, K.L., Marble, D.W., 1960. Prevention of white muscle disease in lambs by oral and subcutaneous administration of selenium. *Am J Vet Res* 21, 437-440.
- Langlands, J.P., Donald, G.E., Bowles, J.E., Smith, A.J., 1994. Selenium supplements for grazing sheep. 4. The use of intraruminal pellets containing elevated quantities of selenium. *Anim Feed Sci Tech* 46, 109-118.
- Leroux, C., Girard, N., Cottin, V., Greenland, T., Mornex, J.F., Archer, F., 2007. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res* 38, 211-228.
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A.J., Plebani, M., 2008. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 46, 764-772.
- Lippi, G., Guidi, G.C., Mattiuzzi, C., Plebani, M., 2006. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 44, 358-365.
- Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden, J.D., Crawford, E.D., Goodman, G.E.I., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E.D., Karp, D.D., Walther, P., Lieber, M.M., Kristal, A.R., Darke, A.K., Arnold, K.B., Ganz, P.A., Santella, R.M., Albanes, D., Taylor, P.R., Probstfield, J.L., Jagpal, T.J., Crowley, J.J., Meyskens, F.L., Jr., Baker, L.H., Coltman, C.A., Jr., 2009. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *J Am Med Assoc* 301, 39-51.
- Liu, S.L., Miller, A.D., 2007. Oncogenic transformation by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. *Oncogene* 26, 789-801.
- Lum, G.E., Rowntree, J.E., Bondioli, K.R., Southern, L.L., Williams, C.C., 2009. The influence of dietary selenium on common indicators of selenium status and liver glutathione peroxidase-1 mRNA. *J Anim Sci* 87, 1739-1746.
- Mahabir, S., Spitz, M.R., Barrera, S.L., Beaver, S.H., Etzel, C., Forman, M.R., 2007. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *Int J Cancer* 120, 1108-1115.
- Makela, A.L., Nanto, V., Makela, P., Wang, W., 1993. The effect of nationwide selenium enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in south western Finland. *Biol Trace Elem Res* 36, 151-157.
- Makela, A.L., Wang, W.C., Hamalainen, M., Nanto, V., Laihonon, P., Kotilainen, H., Meng, L.X., Makela, P., 1995. Environmental effects of nationwide selenium fertilization in Finland. *Biol Trace Elem Res* 47, 289-298.
- Mueller, A.S., Bosse, A.C., Most, E., Klomann, S.D., Schneider, S., Pallauf, J., 2009. Regulation of the insulin antagonistic protein tyrosine phosphatase 1B by dietary Se studied in growing rats. *J Nutr Biochem* 20, 235-247.

- Muir, C.S., Nectoux, J., Staszewski, J., 1991. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* 30, 133-140.
- Müller, S., Wu, Z., Schulz, T., Strasburger, C.J., Köhrle, J., Minich, W.B., Schomburg, L., 2013. Establishment and characterization of a new ELISA for Selenoprotein P 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Berlin, Germany, 15.-18.09.2013, p. 79.
- Murgia, C., Caporale, M., Ceesay, O., Di Francesco, G., Ferri, N., Varasano, V., de las Heras, M., Palmarini, M., 2011. Lung adenocarcinoma originates from retrovirus infection of proliferating type 2 pneumocytes during pulmonary post-natal development or tissue repair. *PLoS Pathog* 7, e1002014.
- Muth, O.H., Oldfield, J.E., Remmert, L.F., Schubert, J.R., 1958. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science* 128, 1090.
- NRC, 1985. Nutrient requirements of sheep: Selenium. National Research Council Committee on Animal Nutrition. National Academical Press, Washington D.C., pp. 20-22.
- Orgeig, S., Hiemstra, P.S., Veldhuizen, E.J., Casals, C., Clark, H.W., Haczku, A., Knudsen, L., Possmayer, F., 2010. Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins. *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl, S43-54.
- Ortin, A., Minguíjon, E., Dewar, P., Garcia, M., Ferrer, L.M., Palmarini, M., Gonzalez, L., Sharp, J.M., De las Heras, M., 1998. Lack of a specific immune response against a recombinant capsid protein of Jaagsiekte sheep retrovirus in sheep and goats naturally affected by enzootic nasal tumour or sheep pulmonary adenomatosis. *Vet Immunol Immunopathol* 61, 229-237.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Perquin, M., Oster, T., Maul, A., Froment, N., Untereiner, M., Bagrel, D., 2001. The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 368-374.
- Peters, U., Chatterjee, N., Church, T.R., Mayo, C., Sturup, S., Foster, C.B., Schatzkin, A., Hayes, R.B., 2006. High serum selenium and reduced risk of advanced colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection program. *Cancer Epidem Biomar* 15, 315-320.
- Petkovska, I., Brown, M.S., Goldin, J.G., Kim, H.J., McNitt-Gray, M.F., Abtin, F.G., Ghurabi, R.J., Aberle, D.R., 2007. The effect of lung volume on nodule size on CT. *Acad Radiol* 14, 476-485.
- Pilarczyk, B., Balicka-Ramisz, A., Ramisz, A., Adamowicz, E., Pilarczyk, R., Tomza-Marciniak, A., Bakowska, M., 2009. Selenium concentration in liver and kidney of free living animals (roe and red deer) from West Pomerania (Poland). *Eur J Wildlife Res* 55, 279-283.
- Platt, J.A., Kraipowich, N., Villafane, F., DeMartini, J.C., 2002. Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the

predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Pathol* 39, 341-352.

Puls, R., 1994. Selenium. In: Puls, R. (Ed.), *Mineral levels in animal health. Diagnostic data.* Sherpa International, Clearbrook pp. 250-252.

Rampinelli, C., De Fiori, E., Raimondi, S., Veronesi, G., Bellomi, M., 2009. In vivo repeatability of automated volume calculations of small pulmonary nodules with CT. *Am J Roentgenol* 192, 1657-1661.

Read, R., Bellew, T., Yang, J.G., Hill, K.E., Palmer, I.S., Burk, R.F., 1990. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J Biol Chem* 265, 17899-17905.

Reid, M.E., Duffield-Lillico, A.J., Slate, E., Natarajan, N., Turnbull, B., Jacobs, E., Combs, G.F., Jr., Alberts, D.S., Clark, L.C., Marshall, J.R., 2008. The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment. *Nutr Cancer* 60, 155-163.

Romieu, I., 2005. Nutrition and lung health. *Int J Tuberc Lung Dis* 9, 362-374.

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.

Salvatori, D., Gonzalez, L., Dewar, P., Cousens, C., de las Heras, M., Dalziel, R.G., Sharp, J.M., 2004. Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma in lambs of different ages and detection of viraemia during the preclinical period. *J Gen Virol* 85, 3319-3324.

Schrauzer, G.N., Molenaar, T., Kuehn, K., Waller, D., 1989. Effect of simulated American, Bulgarian, and Japanese human diets and of selenium supplementation on the incidence of virally induced mammary tumors in female mice. *Biol Trace Elem Res* 20, 169-178.

Schwarz, K., Flotz, C.M., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 79, 3292-3293.

Selenius, M., Fernandes, A.P., Brodin, O., Bjoernstedt, M., Rundloef, A.-K., 2008. Treatment of lung cancer cells with cytotoxic levels of sodium selenite: Effects on the thioredoxin system. *Biochem Pharmacol* 75, 2092-2099.

Sengupta, A., Carlson, B.A., Weaver, J.A., Novoselov, S.V., Fomenko, D.E., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., 2008. A functional link between housekeeping selenoproteins and phase II enzymes. *Biochem J* 413, 151-161.

Sharp, J.M., Angus, K.W., Gray, E.W., Scott, F.M., 1983. Rapid transmission of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte) in young lambs. Brief report. *Arch Virol* 78, 89-95.

Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Shi, L., Wang, Q., Yang, R., Lei, F., 2011. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Rum Res* 96, 49-52.

- Silvera, S.A., Rohan, T.E., 2007. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Cause Control* 18, 7-27.
- Spears, J.W., 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr* 133, 1506S-1509S.
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A., Sies, H., 2011. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr* 48, 40-45.
- Stranges, S., Sieri, S., Vinceti, M., Grioni, S., Guallar, E., Laclaustra, M., Muti, P., Berrino, F., Krogh, V., 2010. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. *BMC Public Health* 10, 564.
- Suau, F., Cottin, V., Archer, F., Croze, S., Chastang, J., Cordier, G., Thivolet-Bejui, F., Mornex, J.F., Leroux, C., 2006. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 27, 1175-1182.
- Sunde, R.A., Paterson, E., Evenson, J.K., Barnes, K.M., Lovegrove, J.A., Gordon, M.H., 2008. Longitudinal selenium status in healthy British adults: assessment using biochemical and molecular biomarkers. *Br J Nutr* 99, S37-47.
- Sunde, R.A., Raines, A.M., 2011. Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. *Adv Nutr* 2, 138-150.
- Suttle, N., 2010. Selenium. In: Suttle, N. (Ed.), *The Mineral Nutrition of Livestock*. Cabi, Oxfordshire, UK, pp. 377-425.
- Thomas, L., 2002. Haemolysis as influence and interference factor. *J Int Fed Clin Chem* 13. <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/130401002end.pdf>.
- Ufer, C., Wang, C.C., 2011. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front Mol Neurosci* 4, 1-14.
- Voigt, K., Brugmann, M., Huber, K., Dewar, P., Cousens, C., Hall, M., Sharp, J.M., Ganter, M., 2007a. PCR examination of bronchoalveolar lavage samples is a useful tool in pre-clinical diagnosis of ovine pulmonary adenocarcinoma (Jaagsiekte). *Res Vet Sci* 83, 419-427.
- Voigt, K., Kramer, U., Brugmann, M., Dewar, P., Sharp, J.M., Ganter, M., 2007b. Eradication of ovine pulmonary adenocarcinoma by motherless rearing of lambs. *Vet Rec* 161, 129-132.
- Wang, W.C., Nanto, V., Makela, A.L., Makela, P., 1995. Effect of nationwide selenium supplementation in Finland on selenium status in children with juvenile rheumatoid arthritis. A ten-year follow-up study. *Analyst* 120, 955-958.
- Watanabe, T., Endo, A., 1991. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutat Res Lett* 262, 93-99.
- West, D.M., Bruere, A.N., Ridler, A.L., 2009a. Body condition scoring of sheep. *The Sheep. Health, Disease & Production*. VetLearn Foundation, Wellington, New Zealand, pp. 108-109.
- West, D.M., Bruere, A.N., Ridler, A.L., 2009b. Lamb survival and lamb mortality. *The Sheep. Health, Disease & Production*. VetLearn Foundation, Wellington, New Zealand, p. 90.

WHO, 2002. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigation & stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2. Guder, München. http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_DIL_LAB_99.1_Rev.2.pdf.

Wiener, G., Woolliams, J.A., Vagg, M.J., 1983. Selenium concentration in the blood and wool and glutathione peroxidase activity in the blood of three breeds of sheep. *Res Vet Sci* 34, 365-366.

Wingler, K., Bocher, M., Flohé, L., Kollmus, H., Brigelius-Flohé, R., 1999. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem* 259, 149-157.

Wolf, N.M., Mueller, K., Hirche, F., Most, E., Pallauf, J., Mueller, A.S., 2010. Study of molecular targets influencing homocysteine and cholesterol metabolism in growing rats by manipulation of dietary selenium and methionine concentrations. *Br J Nutr* 104, 520-532.

Yang, Y., Sharma, R., Zimniak, P., Awasthi, Y.C., 2002. Role of alpha class glutathione S-transferases as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 182, 105-115.

Zavacki, A.M., Ying, H., Christoffolete, M.A., Aerts, G., So, E., Harney, J.W., Cheng, S.Y., Larsen, P.R., Bianco, A.C., 2005. Type 1 Iodothyronine Deiodinase Is a Sensitive Marker of Peripheral Thyroid Status in the Mouse. *Endocrinology* 146, 1568-1575.

10. Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen

Publikation 1

HUMANN-ZIEHANK, E. and M. GANTER: (2012): Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. ANIMAL (2012) 6, 1115–1123

Konzept der Übersichtsarbeit: Humann-Ziehank, Ganter
Auswertung der Literatur: Humann-Ziehank
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

Publikation 2

HUMANN-ZIEHANK, E., TEGTMEYER P. C., SEELIG, B., ROEHRIG, P and M. GANTER (2013): Variation of serum selenium concentrations in German sheep flocks and implications for herd health management consultancy. Acta Vet Scand 55: 82. (doi:10.1186/1751-0147-55-82.)

Konzepte und Versuchsplanung: Humann-Ziehank, Ganter, Seelig
Durchführung der Experimente: Humann-Ziehank, Tegtmeyer, Seelig, Roehrig, Ganter
Auswertung der Ergebnisse: Humann-Ziehank
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

Publikation 3

HUMANN-ZIEHANK, E., C. BRAUER, A. KUKS, A. ANDREAE, M. BRUEGMANN and M. GANTER (2011): Imaging and score-based quantification of ovine pulmonary adenocarcinoma using computed tomography as an additional tool in advanced clinical diagnostic. Small Rum Res 96, 201-210

Konzepte und Versuchsplanung: Humann-Ziehank, Ganter, Andreae
Durchführung der Experimente: Humann-Ziehank, Brauer, Kuks, Andreae, Bruegmann
Auswertung der Ergebnisse: Humann-Ziehank
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

Publikation 4

HUMANN-ZIEHANK, E., WOLF, P., RENKO, K., SCHOMBURG, L., BRUEGMANN, L. M., ANDREAE, A., BRAUER, C. and M. GANTER (2011): Ovine pulmonary adenocarcinoma as an animal model of progressive lung cancer and the impact of nutritional selenium supply. J Trace Elem Med Biol 25, Suppl. 1, S30-S34

Konzepte und Versuchsplanung: Humann-Ziehank, Wolf, Ganter, Renko
Durchführung der Experimente: Humann-Ziehank, Wolf, Renko, Schomburg, Bruegmann
Andreae, Brauer, Ganter
Auswertung der Ergebnisse: Humann-Ziehank
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

Publikation 5

HUMANN-ZIEHANK, E., RENKO, K., BRUEGMANN, M.L., DEVI, V.R., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., ANDREAE, A. and M. GANTER (2013): Long-term study of ovine pulmonary adenocarcinogenesis in sheep with marginal vs. sufficient nutritional selenium supply: results from computed tomography, pathology, immunohistochemistry, JSRV-PCR and lung biochemistry. J Trace Elem Med Biol (2013) 27, 391-399

Konzepte und Versuchsplanung: Humann-Ziehank, Ganter, Andreae
Durchführung der Experimente: Humann-Ziehank, Andreae, Renko, Bruegmann, Devi,
Hewicker-Trautwein
Auswertung der Ergebnisse: Humann-Ziehank, Devi, Hewicker-Trautwein
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

Publikation 6

HUMANN-ZIEHANK, E., RENKO, K. MUELLER, A.S., ROEHRIG, P., WOLFSEN, J. and M. GANTER (2013): Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep. J Trace Elem Med Biol (2013) 27, 380-390

Konzepte und Versuchsplanung: Humann-Ziehank, Ganter, Mueller, Renko
Durchführung der Experimente: Humann-Ziehank, Renko, Mueller, Roehrig, Wolfsen
Auswertung der Ergebnisse: Humann-Ziehank, Mueller, Renko
Erstellung des Manuskriptes: Humann-Ziehank

11. Anhang

Publikationen 1-6

Publikation 1

Animal (2012), 6:7, pp 1115–1123

Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics

Esther Humann-Ziehanke and Martin Ganter

Klinik für kleine Klauentiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

Abstract

The quality of the laboratory diagnostic approach in farm animals can be severely affected by pre-analytical factors of variation. They induce increase/decrease of biochemical and hematological analyte concentrations and, as a consequence, they may cause unsuitable conclusions and decisions for animal health management and research projects. The pre-analytical period covers the preparation of sampling, the sampling procedure itself, as well as all specimen handling until the beginning of the specific laboratory analysis.

Pre-analytical factors may have either an animal-related or a technique-related background. Animal-related factors cover daytime/season, meals/fasting, age, gender, altitude, drugs/anesthesia, physical exercise/stress or coinfection. Technique-related factors are the choice of the tube including serum vs. plasma, effects of anticoagulants/gel separators, the anticoagulant/blood ratio, the blood collection procedure itself, specimen handling, contamination, labeling, storage and serum/ plasma separation, transportation of the specimen, as well as sample preparation before analysis in the laboratory.

It is essential to have proper knowledge about the importance and source of pre-analytical factors to alter the entire diagnostic process. Utmost efforts should be made to minimize controllable factors. Analytical results have to be evaluated with care considering that pre-analytical factors of variation are possible causes of misinterpretation.

Publikation 2

Acta Vet Scand (2013) 55: 82 doi:10.1186/1751-0147-55-82

Variation of serum selenium concentrations in German sheep flocks and implications for herd health management consultancy

Esther Humann-Ziehank^a, Philip Christian Tegtmeyer^a, Björn Seelig^b, Petra Roehrig^a, Martin Ganter^a

^aKlinik für Kleine Klauentiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany

^bTierärztliche Praxis Dr. Seelig, Heidenrod-Laufenselden, Germany

Abstract

Background: This study was performed to demonstrate the widespread distribution and severity of selenium (Se) deficiency in sheep flocks and to evaluate the impact of influencing factors. In 150 flocks, ten serum samples of adult ewes were analysed for Se concentration. The farmers were interviewed concerning flock size, provision of mineral supplement, predominant form of husbandry (stationary fenced pasture/ transhumance), predominant form of water provision (tap water/ well/ surface water) and predominant soil (sandy, silty/loamy, clay) in the area. The location of the flock was recorded as well as the production stage / season at the time of sampling. Intra-group variation and the validity to analyse pooled samples were tested.

Results: Pools of five samples correlated well with the mean of individually analysed samples. The intra-group range of serum Se concentration varied enormously (mean 45.4 +/- 18.8 µg Se/l). About 60% of the flocks showed mean serum Se concentrations below 80 µg/l, 37.4% were below 60 µg Se/l, representing a Se deficient stage. Using mineral supplement in general was no key factor for Se status. Stationary flocks on fenced pasture had constantly higher mean serum Se concentrations during breeding (outdoors, August-November), lambing (mainly indoors, December-March) and lactation (outdoors, April-July), whereas flocks practising transhumance had significantly lower Se status, except during lambing. There was no significant correlation between the soil type and the Se status, but flocks in Southern Germany tend to show a lower Se status compared to Central and Northern Germany. Increasing flock size was associated with lower mean serum Se concentrations. In stationary flocks only, the use of surface water was accompanied by significantly lower Se status.

Conclusion: Se deficiency is widespread in German sheep flocks. More than one third of the flocks showed Se deficiency, indicating the need to optimise the nutritional management. Factors raising suspicion of Se deficiency are large flocks, transhumance during lactation and the breeding season as well as surface water provision in stationary flocks.

Publikation 3

Small Rum Res (2011) 96, 201-210

Imaging and score-based quantification of ovine pulmonary adenocarcinoma using computed tomography as an additional tool in advanced clinical diagnosis

Esther Humann-Ziehank^a, Carsten Brauer^a, Ants Kuks^a, Arnim Andreae^a, Michael Ludwig Bruegmann^b, Martin Ganter^a

^aClinic for Swine, Small Ruminants, Forensic Medicine and Ambulatory Service, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^bVeterinary Institute Oldenburg, Dept. of Pathology, Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Oldenburg, Germany

Abstract

Computed tomography (CT) is well established as an up-to-date technique in lung diseases in human medicine and is being progressively used in companion animal medicine as well. So far, visualisation of lung diseases in sheep has been mainly undertaken using X-ray and sonographic techniques.

In this study, we examined repeatedly lungs of three sheep from a flock naturally infected with Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). The infection is known to cause progressive pulmonary adenocarcinoma (OPA). Clinical signs and detection of proviral DNA of JSRV in bronchoalveolar lavage fluid by PCR confirmed the infection of the animals. CT of the lung was carried out under general anaesthesia. Data were compared to thoracic X-rays as well as to a CT scan and X-rays of a non-infected sheep (control). In two animals post-mortem/histopathology was included. A new CT-OPA score system was generated to classify the cancer stage and to quantify cancer progression.

In general, CT diagnosis of the lung seemed to be appropriate as an additional diagnostic tool in sheep. Different stages of lung tumours as well as an unattended abscess cavity can clearly be visualised. The presented score-based quantification of oncogenesis provides a scientific tool to characterise adenocarcinoma progression over time in consecutive examinations objectively. Postmortem findings and histopathology showed good correlation with CT data. The obvious advantage of the CT technique in contrast to established X-ray imaging was the early and sensitive detection as well as clear localisation of even slight lung alterations in JSRV infected sheep.

Publikation 4

Trace Elem Med Biol 2011. 25, S30-S34

Ovine pulmonary adenocarcinoma as an animal model of progressive lung cancer and the impact of nutritional selenium supply

Esther Humann-Ziehank^a, Petra Wolf^b, Kostja Renko^c, Lutz Schomburg^c, Michael Ludwig Bruegmann^d, Arnim Andreae^a, Carsten Brauer^a, Martin Ganter^a

^aClinic for Swine, Small Ruminants, Forensic Medicine and Ambulatory Service, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^bInstitute of Animal Nutrition, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^cInstitut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany

^dVeterinary Institute Oldenburg, Dept. of Pathology, Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Oldenburg, Germany

Abstract

Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) is known to induce ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA). Several studies have suggested an influence of selenium (Se) status on cancer progression. Thus, combining OPA with a defined Se supply might serve as a suitable animal model to study the impact of Se on lung cancer progression. 16 naturally JSRV-infected sheep were divided into 2 treatment groups receiving (a) <0.05 and (b) 0.2 mg Se/kg dry matter in diet, respectively. Computed tomography (CT) was performed repeatedly and evaluated using a CT-OPA-score system. Liver biopsies were taken three-monthly, blood samples were collected biweekly to study treatment effects on Se concentrations and glutathione peroxidase (GPx) activity. Cell pellets from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were tested for JSRV by PCR to approve the infection. To date, four animals of the ongoing study have been euthanised. Autopsy and histopathology were performed and correlated to CT analysis. JSRV was detected in BALF cell pellets. Progression of lung tumours was monitored successfully by repeated CT examinations, enabling the detection of even small nodules or increased lung density. Histopathology revealed bronchioloalveolar adenocarcinoma in lung areas suspicious to be OPA from CT evaluation. Score-based analysis of CT images for quantifying tumour progression proved as a valuable tool. Se concentration and GPx activity increased in liver and serum of group b and verified the efficiency of different feeding regime. In conclusion, OPA along with CT, autopsy/histopathology, trace element and enzyme activity analysis provide a suitable large animal model to examine the impact of Se supply on lung tumourigenesis.

Publikation 5

J Trace Elem Med Biol (2013) 27, 391-399.

Long-term study of ovine pulmonary adenocarcinogenesis in sheep with marginal vs. sufficient nutritional selenium supply: results from computed tomography, pathology, immunohistochemistry, JSRV-PCR and lung biochemistry.

Esther Humann-Ziehank^a, Kostja Renko^b, Michael Ludwig Bruegmann^c, Vermuri Rama Devi^d, Marion Hewicker-Trautwein^d, Arnim Andreae^a, Martin Ganter^a

^aClinic for Swine, Small Ruminants, Forensic Medicine and Ambulatory Service, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^bInstitut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany

^cLower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Veterinary Institute Oldenburg, Dept. of Pathology, Germany

^dInstitute of Pathology, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

Abstract

The impact of selenium (Se) in carcinogenesis is still debatable due to inconsistent results of observational studies, recent suspicion of diabetic side effects and e.g. dual roles of glutathione peroxidases (GPx). Previously, our group introduced long-term studies on lung carcinogenesis using the jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) induced ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) as an innovative animal model. The present report describes the results of sufficient (0.2 mg Se/kg dry weight (dw)) vs. marginal (<0.05 mgSe/kg dw) nutritional Se supply on cancer progression over a two-year period in 16 animals. Computed tomography (CT) evaluation of lung cancer progression, final pathological examination, evidence of pro-viral JSRV-DNA in lung, lymph nodes and broncho-alveolar lavage cells as well as biochemical analysis of Se, GPx1 and thioredoxin reductase (TrxR) activity in lung tissue were recorded. Additionally, immunohistochemical determination of GPx1 expression in unaffected and neoplastic lung cells was implemented. The feeding regime caused significant differences in Se concentration and GPx1 activity in lung tissue between groups, whereas TrxR activity remained unaffected. JSRV was evident in broncho-alveolar lavage cells, lung tissue and lung lymph nodes. Quarterly executed CT could not demonstrate differences in lung cancer proliferation intensity. Necropsy and histopathology substantiated CT findings. Immuno-histochemical analysis of GPx1 in lung tissue suggested a coherency of GPx1 immunolabelling intensity in dependence of tumour size. It was concluded that the model proved to be suitable for long-term studies of lung cancer proliferation including the impact of modifiable nutritional factors. Proliferation of OPA was unaffected by marginal vs. sufficient nutritional Se supply.

Publikation 6

J Trace Elem Med Biol (2013) 27, 380-390.

Comparing functional metabolic effects of marginal and sufficient selenium supply in sheep.

Esther Humann-Ziehank^a, Kostja Renko^b, Andreas S. Mueller^c, Petra Roehrig^a, Jacqueline Wolfsen^a, Martin Ganter^a

^aClinic for Swine, Small Ruminants, Forensic Medicine and Ambulatory Service, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^bInstitut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany

^cInstitut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Abteilung Präventive Ernährung, Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Germany

Abstract

This study was performed to characterise key data of long-term ovine Se metabolism and to work out the best biomarker of Se status. An upgrade from marginal (<0.05 mg Se/kg diet, 'Se-') to sufficient (0.2 mg Se/kg diet, 'Se+') nutritional Se supply using sodium selenite was monitored biweekly by analysing Se concentration, glutathione peroxidase (Gpx) activity and routine biochemistry in blood/serum over 2 years. Se, Cu, Zn, cytosolic Gpx and thioredoxin reductase (TrxR) activity were measured in the liver (biopsies/post-mortem). Se, Gpx, TrxR, glutathione-S-transferase-alpha (aGST) and iodothyronine deiodinase (Dio1) were analysed in the kidney, heart muscle and thyroid. Relative mRNA expression of hepatic aGST1 and Gpx1 was determined. Improvement of Se supply strongly increased serum and liver Se concentration within 10 and 20 days, respectively followed by a plateau. Whereas the achievement of a maximum whole blood Gpx activity was reached after 3 months, serum Gpx3 activity increased with high variations. Hepatic Gpx activity reached a maximum during days 100–200, decreasing thereafter. Distinct group differences in Se and cytosolic Gpx activity were evident in all organs (except Se in kidney). TrxR and Dio1 activity was affected only in the liver. The Se- sheep showed an ongoing decrease in serum Se concentration within 2 years, whereas liver Se remained almost unaffected. High relative Gpx1 mRNA expression in the Se+ group was consensual to high hepatic Gpx activity. Relative mRNA expression of hepatic aGST1 was higher in the Se- sheep. Clinical signs and abnormalities in routine biochemistry were absent. In summary, the best biomarker of Se deprivation and nutritional Se upgrade, respectively, was Se in serum. Moreover, hepatic Se concentrations reliably reflected the upgrade of Se supply within days. Whole blood Gpx reacts slowly depending on newly formed erythrocytes restricting its diagnostic use. Vital organs are affected by Se deficiency due to a decrease of cytosolic Gpx activity attenuating the antioxidative system. Cellular up-regulation of aGST1 mRNA expression in the Se- group is assumed to partially compensate for the decreased antioxidant defence due to a loss in Gpx activity. This sheep model appears advantageous for long-term studies on sub-clinical metabolic effects in experimental modifiable nutritional Se supply.

Danksagung

Sehr, sehr herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Ganter danken. Er hat diese Arbeit und mich unermüdlich, immer verlässlich und freundschaftlich unterstützt und mir Raum zur eigenen Entfaltung gegeben. Ohne dieses Fundament wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders danke ich zudem

Herrn Dr. Arnim Andreae für die fachliche Unterstützung bei den Narkosen und den computertomographischen Untersuchungen sowie auch Herrn Dr. Carsten Brauer und Frau Dr. Melanie Gundlach für die Steuerung des CT-Geräts.

Frau Prof. M. Hewicker-Trautwein, Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, für die immunhistochemischen Untersuchungen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Michael Brüggemann, LAVES, Oldenburg, für die Leitung der Sektionen und die histologischen Untersuchungen.

Frau Dr. Petra Wolf, Institut für Tierernährung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, für die Erstellung des Fütterungskonzeptes.

den externen Kooperationspartnern Dr. Kostja Renko und Prof. Dr. Lutz Schomburg, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité, Berlin, sowie Prof. Dr. Andreas Müller, Professur für Präventive Ernährung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (bis 2013) für die sehr fruchtbare Zusammenarbeit.

allen Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik für kleine Klauentiere für die verlässliche Unterstützung dieser Arbeit sowie das wunderbare Arbeitsklima.

dem Team der Tierpfleger/-innen und Technischen Mitarbeiter/-innen der Klinik für kleine Klauentiere für die kreative und engagierte Mitwirkung bei den praktischen Arbeiten.

allen weiteren Mitarbeitern/-innen der Klinik für kleine Klauentiere für das angenehme Arbeitsumfeld.

meinem Mann Christian und meinen Kindern Jonas und Lotte für das Verständnis, den familiären Rückhalt und viele Aufmunterungen.