

Aus dem Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Zellfreie DNA als Biomarker der aseptischen Inflammation arbeitsmedizinisch
relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Kirsten Jennifer Heinkel, geb. Mögel
aus Calw

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:	Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Stephan Letzel
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Michael Jansky
Tag der Promotion:	30. März 2026
Nutzungsrecht:	Urheberrechtsschutz (InC-1.0)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Wissenschaftlicher Hintergrund	3
2.1 Stresseinflüsse in der Berufswelt.....	3
2.1.1 Physikalische Stresseinflüsse	3
2.1.2 Psychische Stresseinflüsse	5
2.2 Genese zellfreier DNA.....	5
2.2.1 Apoptose, Pyroptose und Nekrose	6
2.2.2 Aktive Freisetzung.....	7
2.2.3 CfDNA-Entitäten.....	9
2.2.4 Abbau von cfDNA.....	11
2.3 Anwendung von cfDNA	11
2.3.1 Neoplasien	12
2.3.2 Autoimmun- und chronisch entzündliche Erkrankungen	13
2.3.3 Neurologie.....	14
2.3.4 Kardiologie	15
2.3.5 Sport	16
2.3.6 Weitere Anwendungsbereiche.....	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Auflistung genutzter Chemikalien, Geräte, Materialien und Software	19
3.2 Ethikantrag und Genehmigung	21
3.3 Versuche: Etablierung Abkratzmethode tiefgefrorener Proben	21
3.4 Primer	22
3.5 Messung des L1PA2-Fragments mittels qPCR.....	23
3.6 Kalibrierung und Berechnung	27
3.7 Vorgehen bei Fehlmessungen.....	28

3.8	Statistische Auswertung	28
3.9	Validierung der Chemikalien, Geräte, Materialien und Software	29
4	Studien	30
4.1	Studiendesign/-ziele und Rekrutierungsmaßnahmen	30
4.2	Ein-/Ausschlusskriterien und Datenmanagement	30
4.3	Studienprotokoll „Cooling H3“	32
4.4	Studienprotokoll „Brief Cooling“	33
4.5	Studienprotokoll „Control“	33
4.6	Studienprotokoll „Sleep Deprivation“	33
4.7	Studienprotokoll „Drop Jump“	35
4.8	Studienprotokoll „Wingate“	36
5	Ergebnisse	38
5.1	Etablierung Abkratzmethode tiefgefrorener Proben	38
5.2	Vergleich Verwendung von Blutplasma und Blutserum	45
5.3	Vergleich Messung verschiedener cfDNA-Fragmentlängen.....	51
5.4	Studienergebnisse „Cooling H3“	54
5.5	Studienergebnisse „Brief Cooling“	62
5.6	Studienergebnisse „Sleep Deprivation“	65
5.7	Studienergebnisse „Drop Jump“	79
5.7.1	Messergebnisse CK.....	83
5.7.2	Messergebnisse Laktat	85
5.8	Studienergebnisse „Wingate“	87
5.8.1	Messergebnisse Laktat	98
6	Diskussion	105
6.1	Einflussfaktoren der Probenverarbeitung.....	105
6.2	Interaktion von cfDNA im Körper	107
6.3	Messung von cfDNA mittels qPCR	110
6.4	Methodenkritik Statistische Auswertung	111
6.5	CfDNA als Biomarker für Stresseinflüsse in der Berufswelt	112

6.5.1	Physikalische Stresseinflüsse	113
6.5.2	Psychische Stresseinflüsse	119
7	Zusammenfassung	121
8	Literaturverzeichnis.....	123
9	Anhang	141
9.1	Ethikantrag Deutschland von Kirsten Heinkel.....	141
9.2	Ethikvoten	151
9.2.1	Ethik-Kommission Deutschland.....	151
9.2.2	Ethik-Kommission Litauen: Bestätigungsbrief Studienleiter	153
10	Danksagung	154
11	Lebenslauf.....	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BAuA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BMI	engl. Body-Mass-Index = Körpermassenindex
bp	Basenpaare
BS	engl. blood sample = Blutprobe
bzw.	beziehungsweise
ca.	lat. circa = ungefähr
cfDNA	engl. cell free DNA = zellfreie DNA
CffDNA	engl. cell free fetal DNA = zellfreie fetale DNA
Cf-mtDNA	engl. cell free mitochondrial DNA = zellfreie mitochondriale DNA
Cf-nDNA	engl. cell free nuclear DNA = zellfreie nukleäre DNA
Cf-tDNA	engl. cell free tumor DNA = zellfreie Tumor-DNA
CK	Creatinkinase
Cq	engl. quantification cycle = Quantifizierungszyklus
CWI	engl. cold water immersion = Kaltwasserexposition
DNA / DNS	engl. Deoxyribonucleic Acid / dt. Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dt.	deutsch
et al.	lat. et altera = und andere
ex vivo	dt. aus dem Lebenden
h	lat. hora = Stunde
HIIT	Hochintensives Intervalltraining

HIV	engl. Human Immunodeficiency Virus = Humanes Immundefizienz-Virus
HR	engl. heart rate = Herzfrequenz
ICC	engl. intraclass correlation = Intraklassenkorrelation
in-vitro	dt. im Reagenzglas
km/h	Kilometer pro Stunde
La	engl. lactate = Laktat
L1PA2	engl. long interspersed element 1 family 2 = langes eingestreutes Element 1 Familie 2
LINE	engl. long interspersed nuclear element = langes eingestreutes Kernelement
LOD	engl. limit of detection = Nachweisgrenze
Log	Logarithmus
LOQ	engl. limit of quantification = Quantifizierungsgrenze
LRT	engl. likelihood Ratio Test = Plausibilitätsquotiententest
LTR	engl. long terminal repeats = lange Endwiederholungen
m	Meter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
min	Minute
mM	Millimolar
MS	Multiple Sklerose
NETs	engl. neutrophil extracellular traps = extrazelluläre Neutrophilenfallen
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nM	Nanomolar
PCR	engl. polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion

pg/ μ L	Pikogramm pro Mikroliter
Post	nach Belastungsende
Prä / Pre	vor Belastungsbeginn
%	Prozent
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Q-Q-Plot	Quantil-Quantil-Plot
R	Pearson-Korrelationskoeffizient
R _s	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient
RFU	engl. Relative Fluorescence Units = relative Fluoreszenzeinheiten
ROS	engl. reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
s.	siehe
SPIDIA	engl. standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics = Standardisierung und Verbesserung allgemeiner präanalytischer Werkzeuge und Verfahren für die In-vitro-Diagnostik
SVA	engl. SVA = SINE-VNTR-Alu = Short interspersed nuclear element – variable number tandem repeats - Alu = kurzes eingestreutes Kernelement – variable Anzahl Tandemwiederholungen – Alu
TNC	engl. thermoneutral condition = thermoneutrale Umgebung
T _{re}	engl. temperature rectal = Rektaltemperatur
T _{sk}	engl. skin temperature = Hauttemperatur
U/l	engl. unit per liter = Einheit pro Liter
Vgl.	Vergleich
W	Watt
WHO	engl. World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
x g	x-fache Erdbeschleunigung von 9,81 m/s ²

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Abkratzhöhe a-e Falcon-Tube und Eppendorf-Tube.....	22
Abbildung 3.2:	Aufbau des menschlichen Genoms.....	23
Abbildung 3.3:	Fluoreszenzkurven.....	25
Abbildung 4.1:	Studienprotokoll „Cooling H3“ (158).....	32
Abbildung 4.2:	Studienprotokoll „Brief Cooling“ (158).....	33
Abbildung 4.3:	Studienprotokoll „Sleep Deprivation“ (158).....	35
Abbildung 4.4:	Studienprotokoll „Drop Jump“ (159).....	36
Abbildung 5.1:	Boxplot Drop Jump DJ 2 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut.....	39
Abbildung 5.2:	Streudiagramm Drop Jump DJ 2 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut.....	40
Abbildung 5.3:	Boxplot Drop Jump DJ 5 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut.....	41
Abbildung 5.4:	Streudiagramm Drop Jump DJ 5 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut.....	42
Abbildung 5.5:	Balkendiagramm Einfluss der Abkratzhöhe im Eppendorf-Tubes.....	44
Abbildung 5.6:	Balkendiagramm Einfluss der Abkratzhöhe im Falcon-Tubes.....	45
Abbildung 5.7:	Streudiagramm Vgl. 90 bp Plasma/Serum.....	50
Abbildung 5.8:	Streudiagramm Vgl. 222 bp Plasma/Serum.....	51
Abbildung 5.9:	Streudiagramm Vgl. Plasma 90 bp/222 bp.....	52
Abbildung 5.10:	Streudiagramm Vgl. Serum 90 bp/222 bp.....	53
Abbildung 5.11:	Boxplots „Cooling H3“-Studie.....	55
Abbildung 5.12:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie getrennt nach Geschlecht.....	58
Abbildung 5.13:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie getrennt nach Sitzung.....	59
Abbildung 5.14:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Erste Sitzung Weiblich.....	60
Abbildung 5.15:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Erste Sitzung Männlich.....	60
Abbildung 5.16:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Wiederholte Sitzung Weiblich.....	61
Abbildung 5.17:	Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Wiederholte Sitzung Männlich.....	61
Abbildung 5.18:	Liniendiagramme „Brief Cooling“-Studie Teil A.....	64
Abbildung 5.19:	Liniendiagramm „Brief Cooling“-Studie Teil B.....	64
Abbildung 5.20:	Boxplots „Brief Cooling“-Studie Zeitpunkte.....	65
Abbildung 5.21:	Boxplots „Sleep Deprivation“-Studie.....	67
Abbildung 5.22:	Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie Bedingungen.....	70
Abbildung 5.23:	Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf.....	71
Abbildung 5.24:	Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf.....	73
Abbildung 5.25:	Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf.....	74
Abbildung 5.26:	Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf.....	76
Abbildung 5.27:	Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf.....	77
Abbildung 5.28:	Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf.....	79

Abbildung 5.29:	Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie Zeitpunkte	82
Abbildung 5.30:	Boxplots „Drop Jump“-Studie Zeitpunkte.....	82
Abbildung 5.31:	Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie CK Zeitpunkte	84
Abbildung 5.32:	Boxplots „Drop Jump“-Studie CK Zeitpunkte.....	85
Abbildung 5.33:	Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie Laktat Zeitpunkte.....	86
Abbildung 5.34:	Boxplots „Drop Jump“-Studie Laktat Zeitpunkte	87
Abbildung 5.35:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie erste Sitzung	90
Abbildung 5.36:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie letzte Sitzung.....	91
Abbildung 5.37:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie jüngere Probanden	96
Abbildung 5.38:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie ältere Probanden.....	96
Abbildung 5.39:	Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. Jung/Alt.....	97
Abbildung 5.40:	Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. jüngere Probanden	97
Abbildung 5.41:	Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. ältere Probanden	98
Abbildung 5.42:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat erste Sitzung.....	101
Abbildung 5.43:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat letzte Sitzung	102
Abbildung 5.44:	Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter	103
Abbildung 5.45:	Boxplots „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Auflistung genutzter Chemikalien, Geräte, Materialien und Software.....	19
Tabelle 3.2:	Reagenzien Mastermix	26
Tabelle 3.3:	Reagenzien Primermix	26
Tabelle 4.1:	Studienprotokoll „Wingate“.....	37
Tabelle 5.1:	Zusammenfassende Statistik Probe DJ 2 Vgl. Gekratzt/Aufgetaut.....	39
Tabelle 5.2:	Zusammenfassende Statistik Probe DJ 5 Vgl. Gekratzt/Aufgetaut.....	41
Tabelle 5.3:	Zusammenfassende Statistik Probe „D“ mit Ausreißer.....	43
Tabelle 5.4:	Zusammenfassende Statistik Probe „D“ ohne Ausreißer	43
Tabelle 5.5:	Zusammenfassende Statistik Probe Proband 11	44
Tabelle 5.6:	Modellergebnisse „Control“-Studie 90 bp Blutplasma	46
Tabelle 5.7:	Modellergebnisse „Control“-Studie 222 bp Blutplasma	46
Tabelle 5.8:	Modellergebnisse „Control“-Studie 90 bp Blutserum.....	47
Tabelle 5.9:	Modellergebnisse „Control“-Studie 222 bp Blutserum.....	48
Tabelle 5.10:	Zusammenfassende Statistik Vgl. Plasma/Serum mit 90 bp/222 bp Primer .	49
Tabelle 5.11:	Korrelationsmatrix Vgl. 90 bp Plasma und Serum.....	49
Tabelle 5.12:	Korrelationsmatrix Vgl. 222 bp Plasma und Serum.....	50
Tabelle 5.13:	Korrelationsmatrix Plasma 90 bp und 222 bp.....	52
Tabelle 5.14:	Korrelationsmatrix Serum 90 bp und 222 bp.....	53
Tabelle 5.15:	Zusammenfassende Statistik „Cooling H3“-Studie	54
Tabelle 5.16:	Modellergebnisse „Cooling H3“-Studie im Omnibus-Test.....	56
Tabelle 5.17:	Modellergebnisse „Cooling H3“-Studie im Dunnett’s Test	57
Tabelle 5.18:	Zusammenfassende Statistik „Brief Cooling“-Studie	62
Tabelle 5.19:	Modellergebnisse „Brief Cooling“-Studie.....	63
Tabelle 5.20:	Gepaarter T-Test „Brief Cooling“-Studie	63
Tabelle 5.21:	Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie	66
Tabelle 5.22:	Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie	69
Tabelle 5.23:	Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf.....	71
Tabelle 5.24:	Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf	72
Tabelle 5.25:	Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf	73
Tabelle 5.26:	Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf	75
Tabelle 5.27:	Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf.....	76
Tabelle 5.28:	Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf	78
Tabelle 5.29:	Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie	80
Tabelle 5.30:	Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie.....	81
Tabelle 5.31:	Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie CK	83

Tabelle 5.32:	Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie CK.....	84
Tabelle 5.33:	Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie Laktat	85
Tabelle 5.34:	Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie Laktat	86
Tabelle 5.35:	Zusammenfassende Statistik „Wingate“-Studie	88
Tabelle 5.36:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie	88
Tabelle 5.37:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie erste Sitzung	89
Tabelle 5.38:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie letzte Sitzung	91
Tabelle 5.39:	Modellergebnisse „Wingate“- Studie jüngere Probanden	92
Tabelle 5.40:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie jüngere Probanden erste Sitzung.....	93
Tabelle 5.41:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie jüngere Probanden letzte Sitzung	93
Tabelle 5.42:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden	94
Tabelle 5.43:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden erste Sitzung	95
Tabelle 5.44:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden letzte Sitzung	95
Tabelle 5.45:	Zusammenfassende Statistik „Wingate“-Studie Laktat.....	99
Tabelle 5.46:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat erste Sitzung	100
Tabelle 5.47:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat letzte Sitzung	101
Tabelle 5.48:	Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter.....	103

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Heutzutage sind verschiedene Stresseinflüsse in unserer schnelllebigen Leistungsgesellschaft überall vorhanden und spielen im beruflichen Alltag eine bedeutende Rolle. Es kann zwischen physikalischen und psychischen Stresseinflüssen unterschieden werden, wobei diese eng miteinander verknüpft sind. In einer Forsa-Umfrage der Techniker Krankenkasse ergab sich, dass 64 % der Deutschen sich mindestens manchmal gestresst fühlen, 26 % sogar häufig (1).

Doch wie genau lässt sich Stress definieren? Erstmals führte Hans Selye das Konzept des Begriffes „Stress“ als eine „unspezifische Antwort des Körpers auf beliebige Beanspruchung“ ein (2). In einem Artikel der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung wird Stress als starke Beanspruchung des Körpers auf innere oder äußere Reize (Stressoren) beschrieben, welche das innere Gleichgewicht (Homöostase) stören und Anpassungsreaktionen erfordern (3).

Um diese Stressreaktionen im Körper messbar zu machen und wissenschaftlich belegen zu können, werden Biomarker herangezogen. Unter der Leitung der WHO wurde der Begriff „Biomarker“ in Abstimmung mit den Vereinten Nationen und der Internationalen Arbeitsorganisation als „jede Substanz, Struktur oder Prozess, der im Körper oder seinen Produkten gemessen werden kann und die Inzidenz des Ergebnisses / Outcomes oder der Krankheit beeinflusst oder vorhersagt“, definiert (4).

Dabei scheint die zellfreie DNA (cfDNA, engl. cell free DNA) diese Anforderungen an einen geeigneten Biomarker zu erfüllen, da sie auch bei unterschiedlichsten Stressreaktionen des Körpers frei werden könnte (5). Die Desoxyribonukleinsäure (DNS, Synonym DNA vom engl. Deoxyribonucleic Acid) trägt die Erbinformation, besteht aus Basenpaaren und ist als DNA-Doppelhelix angeordnet (6). Erstmals wurde bereits 1948 die cfDNA in gesunden Probanden entdeckt (7). Als „Liquid Biopsy“ (dt. „Flüssigkeitsbiopsie“) wird die aus Körperflüssigkeiten (v.a. Blut) basierte Analyse von Nukleinsäuren beschrieben. Die cfDNA-Messungen in dieser Dissertation erfolgten aus Blutproben, vor allem aus Blutplasma. Generell kann cfDNA aber auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Sputum, Urin, Liquor cerebrospinalis oder Pleura Flüssigkeit gemessen werden (8). Seit der Entdeckung der cfDNA dehnten sich ihre Anwendungsbereiche kontinuierlich aus. In der personalisierten Medizin (Präzisionsmedizin) spielt cfDNA inzwischen eine immer größere Rolle beim Screening, der Diagnose- und Prognosestellung sowie beim Monitoring und der Behandlung von Erkrankungen (9). Zudem stellte sich die minimalinvasivere Methode, der größere Informationsgehalt sowie die höhere

Spezifität und Genauigkeit von cfDNA im Vergleich zu anderen Proteinbiomarkern, insbesondere bei Krebserkrankungen, als vorteilhaft heraus (10-12).

Gerade deshalb müsste sich cfDNA auch als möglicher Biomarker der aseptischen Inflammation herauskristallisieren (13, 14). Die „aseptische Inflammation“ bezeichnet die keimfreie Entzündung, sprich die lokale und systemische Reaktion auf innere oder äußere Reize ohne Einfluss von Erregern. Auch der Zelltod setzte eine sterile Entzündungsreaktion in Gang (15). Des Weiteren verursachte körperliche Aktivität durch Muskelschäden aseptische Entzündungsreaktionen (16). Verdeutlicht wurde dies vor allem bei intensiven Ausdauerbelastungen wie dem Ironman Triathlon oder Übertraining (13, 17).

Ziel dieser Dissertation war zum einen die Schließung der Forschungslücke durch erstmalige Untersuchungen zur Quantifizierung von cfDNA im Zusammenhang mit physikalischen und psychischen Stresseinflüssen. Zum anderen die Ableitung auf arbeitsmedizinisch relevante Arbeitsbelastungen und Beanspruchungen durch Stress, welche typischerweise im Arbeitsalltag auftreten können. Zu diesen gehören Schlafentzug, Hitze- und Kälteexposition, aber auch kurzfristige, eher kraftbetonte Belastungen, die gleichzeitig mit Anforderungen an die Ausdauer verknüpft sind.

Darüber hinaus soll eine Abkratzmethode tiefgefrorener Proben etabliert werden, um einen ressourcenschonenden Ansatz mit höherer Verfügbarkeit der cfDNA-Proben für weitere Analysen zu erreichen.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Stresseinflüsse in der Berufswelt

Stresseinflüsse in der Berufswelt können vielfältig sein. In der Ausgabe von 2024 veröffentlichte die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), dass in den Jahren 2016 bis 2018 der Stress und Arbeitsdruck weiter angestiegen sei. Rund 40 % der Fach- und hochqualifizierten Arbeitskräfte sowie etwa 30 % der Basisarbeitenden berichteten über entsprechende Belastungen. Definiert wurde Basisarbeit ohne eine berufliche Ausbildung, Facharbeit mit einem Berufsabschluss und hochqualifizierte Arbeit mit einem akademischen Abschluss. Insgesamt würden Vollzeitbeschäftigte gerne weniger Wochenarbeitszeit erreichen (18). Eine weitere Herausforderung und Stressquelle stellte zudem der Konflikt über die Vereinbarkeit von Beruf- und Privatleben dar (19).

2.1.1 Physikalische Stresseinflüsse

Physikalische Stresseinflüsse in der Arbeitswelt in Bezug auf diese Dissertation sind Arbeitsplätze mit Hitze- oder Kälteexposition, sportlicher Aktivität sowie Schlafentzug.

Zahlreiche Arbeitsstellen sind erheblichen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Gerade Berufe, die den Witterungsbedingungen unterliegen, sind prädispositioniert dafür. Dazu zählen unter anderem Beschäftigte in der Land- und Forstwirtschaft, im Gartenbau, Rettungskräfte, Bauarbeiter und Dachdecker. Auf Dächern konnte sich das schwarze Bitumen sogar auf eine Temperatur von bis zu 100 °C erhitzen (20). Weiterhin finden sich Hitze Arbeitsplätze in der Papier-, Glas- und Stahlindustrie sowie bei der Arbeit an Rund- oder Kammeröfen. Zudem kann eine Großküche oder Wäscherei, wo eine hohe Luftfeuchtigkeit herrscht, mit einem Hitze Arbeitsplatz verglichen werden.

In Deutschland fielen 2011 etwa 70 % der Kälte Arbeitsplätze aufs Freie, was geschätzt etwa 1 Million Beschäftigten entspricht. Der Rest verteilte sich auf technisch gekühlte Räume, wie beispielsweise bei der Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Nahrungsmitteln zu finden sind (21).

Des Weiteren arbeiteten 40 % der Post- und Logistikberufe im Jahr 2012 unter ungünstigen Klimaverhältnissen. Besonders häufig waren darunter die Post- und Zustelldienste mit 71 % betroffen (22). In der Bauwirtschaft wurden 2012 die Witterungseinflüsse mit 79 % als ungünstige Umgebungsbedingung am häufigsten genannt (23).

Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin veröffentlichte in ihrer Ausgabe von 2023 und 2024, dass Basisarbeitende häufiger als Facharbeitende und Beschäftigte in hochqualifizierter Arbeit von Kälte, Nässe, Feuchtigkeit, Zugluft und Hitze betroffen waren, wovon die Mehrheit dies als belastend empfand (18, 24). 2018 waren 31,3 % der Leiharbeiter und 20,7 % der Nicht-Leiharbeiter in der Zeitarbeitsbranche den Stressoren Kälte, Nässe, Feuchtigkeit, Zugluft und Hitze als Arbeits- beziehungsweise Umgebungsbedingungen ausgesetzt (25). Insgesamt litten in dem Jahr 23 % der Zeitarbeiter und 34 % der Nicht-Zeitarbeitenden darunter (26).

Nischenberufe wie Profisportler, Ballett- oder Musicaldarsteller können von intensiver sportlicher Ausbelastung betroffen sein. Sportlich aktiv in der Arbeitswelt sind beispielsweise auch Putz-, Reinigungs- und Müllabfuhr-Arbeitskräfte sowie Postboten und Pflegekräfte. Hierbei handelt es sich oft um kurzfristige, einseitige, eher kraftbetonte Belastungen, die jedoch auch mit Anforderungen an die Ausdauer verbunden sein können. Das Heben und Tragen von schweren Lasten (mind. 20 kg bei Männern und mind. 10 kg bei Frauen) tritt unter anderem im Dienstleistungsbereich auf, so beispielsweise in der Pflege und im Gastgewerbe, wobei jeder Zweite dies 2018 als belastend empfand (27). Schwere Lasten heben und tragen müssen exemplarisch auch Erwerbstätige in Bauberufen, wovon laut Bundesinstitut für Berufsbildung und BAuA-Befragung im Jahr 2012 insgesamt 72 % betroffen waren (23). Ebenfalls kam Heben und Tragen von schweren Lasten bei 50 % der Post- und Logistikberufe, insbesondere bei 67 % der Post- und Zustelldienste, vor (22). Nicht zu vergessen war auch das Heben und Tragen beim Auffüllen von Regalen oder Umlagern von Waren im Lebensmitteleinzelhandel (28).

Ein weiterer Aspekt physikalischer Stressoren ist der Schlafentzug, mit welchem viele Berufsgruppen zurechtkommen müssen. Dies ist beispielsweise im Gesundheitswesen (Rettungskräfte, Pflegepersonal, Ärzte/innen), bei der Polizei oder aber auch im Hotelgewerbe sowie bei Bandarbeiter/innen der Fall. Bereits 2007 arbeiteten nur noch knapp 13 % der Beschäftigten im Normalarbeitszeitstandard, das heißt 35 h bis 42 h wöchentlich und von Montag bis Freitag ohne Schichtdienst oder Gleitzeit (20). Nachts zwischen 23 Uhr und 6 Uhr waren im Jahr 2013 über 3 Millionen Deutsche ständig oder regelmäßig beschäftigt (29). Atypische Arbeitszeiten wurden im Stressreport der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin als Stressor identifiziert (30). In der Arbeitszeitbefragung 2019 gab etwa ein Fünftel der Beschäftigten an, zu atypischen Zeiten angestellt zu sein, wovon dies bei 6 % auf Wechselschicht mit Nachtarbeit oder Dauernachtarbeit fiel (31). Gemäß einer Forsa-Umfrage von 2017 im Auftrag der Techniker Krankenkasse hatten 42 % der Schichtarbeiter Umstellungs- und Schlafprobleme bei Schichtplanänderungen. Generell schliefen 53 % der berufstätigen Deutschen nur 6 h oder weniger (32). Dieser Trend zeigte sich auch 2021 bei

der Umfrage zur Schlafdauer der Deutschen, wobei 68 % durchschnittlich 5 h bis 7 h pro Nacht unter der Woche schliefen (33). Eine Störung der zirkadianen Rhythmik, wie sie auch bei Schicht- und Nachtarbeit auftritt, wurde ein erhöhtes Erkrankungsrisiko an Krebs (darunter Lunge, Darm, Blase und Prostata) zugeschrieben (34). Die Gutenberg-Gesundheitsstudie von 2007 wertete die Daten zur Nachtschichtarbeit zwischen 23 Uhr und 5 Uhr im Hinblick auf das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung aus. Grundlage waren die Nachtschichten der letzten 10 Jahre, welche kategorisiert wurden. Besonders bei 221 bis 660 Nächten in 1 bis 3 Jahren beziehungsweise bei über 660 Nächten in mehr als 3 Jahren ergab sich eine Tendenz zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko, jedoch ohne statistische Signifikanz (35). Darüber hinaus zeigte sich bei Nachtschichtarbeit ein erhöhtes Risiko für Unfälle und gesundheitliche Beschwerden (31). Schlafentzug wirkte sich nicht nur auf den Körper und die zirkadiane Rhythmik aus, sondern auch auf die Psyche (36).

2.1.2 Psychische Stresseinflüsse

Psychische Stresseinflüsse auf den Menschen sind vielseitig, besonders in der Berufswelt. Zu bedeutsamen psychischen Arbeitsanforderungen zählten unter anderem die Arbeitsintensität, schnelles Arbeiten, auftretende Störungen oder Unterbrechungen, unterschiedliche Aufgaben zeitgleich zu bearbeiten, hoher Termin- und Leistungsdruck sowie das Arbeiten an der Grenze der persönlichen Leistungsfähigkeit (37). Besonders wenn an der Leistungsgrenze gearbeitet wurde, traten nahezu viermal so viele hohe psychische Anforderungen auf, als wenn Beschäftigte nur manchmal, selten oder nie die Leistungsgrenze erreichten (38). Der Stressreport Deutschland 2019 der BAuA ergab, dass von 2006 über 2012 und 2018 die subjektiv wahrgenommene Belastung der Erwerbstätigen durch die unterschiedlichen Anforderungsfaktoren in fast allen Bereichen bedeutend anstieg (30). Durch akuten psychischen Stress wurde das Immunsystem aktiviert, welches wiederum Entzündungsprozesse in Gang setzte (39). Darüber hinaus wurde psychischer Stress mit DNA-Schäden und cfDNA-Veränderungen aufgrund von diesen Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht (34).

2.2 Genese zellfreier DNA

Die Genese der zellfreien DNA (cfDNA) ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass im gesunden Menschen etwa 55 % der Plasma-cfDNA von Leukozyten, etwa 30 % von Erythrozyten-Vorläuferzellen, etwa 10 % von Gefäßendothelzellen und etwa 1 % von Hepatozyten stammte (40). Die cfDNA-Konzentration schwankte aufgrund von interindividuellen Variationen zwischen 1,32 pg/μL und 18,01 pg/μL, meist betrug sie < 2 pg/μL

beziehungsweise lag bei 3,6 pg/ μ L bis 5,0 pg/ μ L (41). Andere Quellen beschrieben eine Spannbreite von 10 ng/ml bis 30 ng/ml beziehungsweise sogar von 0 ng/ml bis 100 ng/ml (42, 43).

Die Länge der cfDNA-Fragmente variiert stark, auch abhängig von der Genese. Beispielsweise entspricht ein Peak von 166 bp (20 bp bis 200 bp) der Länge von DNA-Fragmenten gebunden an Nukleosomen (44). Nukleosomen sind Struktureinheiten aus Histonproteinkomplexen, um die sich ein Stück DNA-Doppelhelix windet (6). Wiederum andere Befunde ergaben eine Spannbreite von 61 bp bis 567 bp mit einem Mittel von 176 bp, wobei 65 % der Fragmente eine Länge zwischen 150 und 180 bp aufwiesen (45). CfDNA kann zudem mit Phospholipiden oder Bindungsproteinen auf äußeren Zelloberflächen verankert sein (41). Darüber hinaus kann sie auch mit extrazellulären Vesikeln oder deren Oberfläche verbunden sein (46).

Im Nachfolgenden sind die unterschiedlichen Herkünfte der cfDNA erläutert. Unter anderem werden verschiedene Ansätze wie Apoptose, Pyroptose, Nekrose und aktive Freisetzungsvorgänge beschrieben. Letztendlich werden jedoch noch weitere Studien benötigt, um alle Mechanismen zu entschlüsseln und zu erforschen. Abhängig von Gesundheit beziehungsweise Krankheit, Alter, Aktivität und Umwelt entstammte die cfDNA eher einer Kombination von Quellen als von einem einzigen Mechanismus (47). Im Anschluss werden außerdem die zellfreie Tumor-DNA (cf-tDNA), die zellfreie fetale DNA (cffDNA) und die zellfreie mitochondriale DNA (cf-mtDNA) sowie der Abbau von cfDNA näher erläutert.

2.2.1 Apoptose, Pyroptose und Nekrose

Apoptose bezeichnet den programmierten, physiologischen Zelltod. Die Zelle zerfällt, wobei Kernfragmente und Apoptosekörper entstehen. Makrophagen, die zur Gruppe der Leukozyten gehören, nehmen die Zellfragmente auf (Phagozytose) und bauen diese weiter ab. Es kommt zu keiner Entzündungsreaktion. Beim gesunden Menschen stammt die cfDNA hauptsächlich von der Apoptose ab (14, 45). Apoptotische Zellen können der Phagozytose entkommen und so die cfDNA-Menge erhöhen (47). Die durch Apoptose entstandene cfDNA-Fragmentlänge betrug meistens zwischen 150 und 180 bp (41). Es konnte gezeigt werden, dass nach erschöpfendem Sport cfDNA bei Apoptose von geschädigten Skelettmuskelzellen sowie zugrunde gehenden Leukozyten frei wurde (48). Zudem war die durch Sport induzierte Apoptose vom Trainingsstatus abhängig (49).

Eine Sonderform stellt die sogenannte Pyroptose dar. Dies ist die inflammatorische Variante des programmierten Zelltods, welche durch Gewebeschäden oder Infektionen ausgelöst wird. Eine kontrolliert ablaufende Kaskade bewirkt eine Entzündungsreaktion. Hierbei kann auch cfDNA frei werden (50).

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose das pathologische Absterben einer Zelle. Es kommt zur Zellwandruptur mit unkontrolliertem Zellzerfall (Lyse), was immer mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Insgesamt verläuft die Nekrose schneller als die Apoptose, der Abbau jedoch langsamer, was zu längeren cfDNA-Fragmentlängen mit > 10 000 bp (Vielfachen von 140 bp bis 200 bp) bis zu 21 000 bp führt (41, 47).

2.2.2 Aktive Freisetzung

Da die bisher genannten Mechanismen eine längere Zeit benötigen, bis cfDNA frei wird, muss es für die schnellere Freisetzung innerhalb von Minuten eine andere Erklärung geben. So konnte bei akutem Stress die aktive Freisetzung von cfDNA beobachtet werden (41). Verschiedene Freisetzungsmechanismen werden im Folgenden erläutert.

Eine spontane, aktive Freisetzung von cfDNA aus Lymphozyten konnte in vitro ohne jegliche Stimulation gezeigt werden (51). Auch bei der humanen leukämischen HL-60-Zelllinie, die menschliche promyelozytische Leukämiezellen darstellt, wurde dies beschrieben (52).

Exosomen sind extrazelluläre Vesikel, die von fast jeder Zelle abgegeben werden können. Es konnte festgestellt werden, dass sogar über 90 % der cfDNA im Plasma von Exosomen zu finden war und die Fragmentlänge um die 200 bp beziehungsweise darunter lag (53). In einer Sport-Studie wurde diese Behauptung widerlegt, wobei die Ergebnisse ergaben, dass der Großteil der cfDNA bei akutem Sport nicht von extrazellulären Vesikeln stammte, sondern eher frei im Blutplasma zirkulierte (54). Dass hierbei nur etwa 5 % der cfDNA mit extrazellulären Vesikeln assoziiert war, könnte durch die kurze Halbwertszeit von cfDNA und die unterschiedlichen Handhabungsverfahren, einschließlich zeitlicher Verzögerung der Probenmessung in der erstgenannten Studie, zurückzuführen sein (55). Bezüglich der Halbwertszeit von cfDNA gibt es verschiedene Angaben, beginnend bei einigen Minuten bis zu 1 h oder 2 h, am ehesten 16 min mit einer Spannweite von 9 min bis 23 min (44, 56).

Bei intensiver sportlicher Belastung kann es zu Mikroverletzungen in der Skelettmuskulatur kommen, genauer in den Z-Scheiben. Dadurch kam es auch zu Zellmembranschäden und Zellinhalte wie cfDNA konnten frei werden (57). Bemerkbar können sich die Mikroverletzungen durch Muskelkater machen. Zudem wurde vermutet, dass eine akute Entzündung aufgrund des sportinduzierten Muskelkaters zu einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten führen könnte. Dies wiederum könnte die aktive Freisetzung von cfDNA verursachen (58). Zunächst wurde angenommen, dass bei sportlichen Trainingseinheiten cfDNA hauptsächlich durch die hämatopoetische Zellreihe frei wurde. Die genaue Aufteilung war dabei jedoch noch unbekannt. Beispielsweise konnte cfDNA auch im Rahmen der Bildung von reifen Erythrozyten aus Stammzellen (Erythropoese) während des Vorganges der Kernausschleusung

(E nukleation) aktiv ins Blutplasma losgelöst werden (59). Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass cfDNA beim Sport vor allem von Granulozyten stammte (60). Granulozyten gehören zu den Leukozyten und damit zum unspezifischen Immunsystem. Dabei repräsentieren die neutrophilen Granulozyten mit etwa 50 % bis 60 % die größte Gruppe. Unter sportlicher Belastung wurden die Neutrophilen zuerst aufgrund der Katecholamine und Scherkräfte aus den Endothelzellen frei, später aufgrund von Kortisol induzierter Freisetzung aus dem Knochenmark. Insgesamt stieg mit Intensität und Dauer der Belastung die Anzahl der Neutrophilen (Neutrophilie). Dass das Immunsystem mit sportlicher Belastung in Zusammenhang stand, wurde schon mehrfach beschrieben (41, 61, 62).

Des Weiteren beschreibt die sogenannte „NETose“ einen aktiven Freisetzungsmechanismus von neutrophilen Granulozyten. Hierbei werden von eben diesen extrazelluläre Neutrophilenfallen (NETs, engl. neutrophil extracellular traps), die unter anderem aus DNA bestehen, gebildet und ausgeschleust. Dieser Mechanismus kommt bei der Abwehr von Mikroorganismen oder bei der aseptischen Inflammation zum Einsatz. Es wird zwischen zwei verschiedenen Formen der NETose unterschieden. Zum einen die suizidale NETose, welche im Zelluntergang endete und etwa 2 h bis 4 h dauerte. Zum anderen die schnellere, vitale NETose, wobei die Zellmembran intakt blieb und etwa 5 min bis 60 min dauerte (63). NETose kann auch durch andere Zellen wie beispielsweise Mastzellen, basophile Granulozyten und Makrophagen stattfinden. Der Vorgang wird hierbei dann als „ETosis“ bezeichnet (50). Die Bedeutung von NETs wurde bei einer Studie dargelegt, die annahm, dass über 95 % der durch eine Kapillarelektrophorese detektierten DNA-Fragmente von NETs stammten. Es wurde gemutmaßt, dass NETs lange cfDNA-Fragmente produzierten, jedoch wurden im Blutserum hauptsächlich Mononukleosomen gefunden. Darin sahen die Autoren die Hypothese bestätigt, dass die langen Fragmente zu Mononukleosomen degradiert wurden und diese die stabilste Struktur darstellten, mit der die cfDNA assoziiert sein könnte. Neben den bisher genannten Genesen könnten NETs somit eine signifikante Quelle von cfDNA darstellen. Auch wurden NETs im Zusammenhang mit unterschiedlichen Pathologien wie Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen, Sepsis, COVID-19 und Krebs beschrieben (64). Darüber hinaus wurde beim Sport während einer Laufbandanalysestudie beobachtet, dass NETs freigesetzt wurden (65).

Während sportlicher Belastung entstehen vor allem in der Skelettmuskulatur reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was in einer aktiven Freisetzung in Form von oxidativem Stress mündet. Oxidativer Stress wurde als Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien mit Überhang von Oxidantien und daraus resultierender Störung der Signalwege und molekularem Schaden definiert (66). Sportinduzierte Entstehung von ROS könnte positive und negative Auswirkungen haben. Zum einen förderten moderate ROS-Level die Muskeladaption

sowie die Muskelkraft nach dem Training. Zum anderen kam es bei hohen ROS-Leveln zum molekularen Schaden an DNA, Proteinen und Lipiden (66). Zudem induzierte ROS die NETose, der genaue Vorgang blieb jedoch unbekannt (67).

In einer Studie wurde die sogenannte „Bläschen“-Hypothese als ein weiterer Mechanismus der Freisetzung von cfDNA vorgestellt. Hier konnte bei Kardiomyozyten während einer Ischämie festgestellt werden, dass auf der Plasmamembranoberfläche Bläschen mit Zellinhalt produziert und freigelassen wurden, ohne dass die Kardiomyozyten selbst in die Nekrose gingen. Die Bläschen konnten bei Re-Oxygenierung sogar wieder in die Zelle aufgenommen werden. Falls die Bläschen zu groß wurden, kollabierten diese und die Zelle endete letztlich doch in der Nekrose. Die Hypothese zur Freisetzung von Zellinhalten durch Bläschen sei auch auf sportliche Aktivitäten mit moderater bis hoher Intensität übertragbar. Mit steigender Trainingsintensität veränderte sich auch die Zellmembranpermeabilität. Überdies kam es durch exzessives Schwitzen beim Sport zur Hypokaliämie, was die Vasodilatation behinderte und Ischämie erzeugte (57).

Außerdem könnte cfDNA durch Chromosomeninstabilität während der Zellteilung (Mitose) entstehen. Wenn bei der Mitose Fehler passieren, kann ein sogenannter Mikronukleus erzeugt werden. Dies wurde nicht nur in gesunden Zellen, sondern auch bei Krebszellen gefunden (55).

Schließlich beschreibt der Begriff „Virtosomen“ zirkulierende Komplexe aus DNA, RNA und Lipoproteinen, die von lebenden Zellen synthetisiert und aktiv freigesetzt werden. Dabei umgab keine Membran den Komplex und die DNA-Fragmentlänge betrug ungefähr 450–700 bp. Andere Zellen konnten die Virtosomen wieder aufnehmen und dadurch modifiziert werden, was auf eine Beteiligung an Signalwegen hindeuten könnte (55).

2.2.3 CfDNA-Entitäten

Entitäten von cfDNA beschreiben die zellfreie Tumor-DNA (cf-tDNA), die zellfreie fetale DNA (cffDNA) sowie die zellfreie mitochondriale DNA (cf-mtDNA).

Zunächst wurde bei Tumorpatienten vermutet, dass cf-tDNA aus der Lyse von Tumorzellen oder von Mikrometastasen stammte. Diese Hypothese wurde wieder verworfen, weil die Menge an cf-tDNA nicht mit der Anzahl der Tumorzellen erklärt werden konnte. Es wurde davon ausgegangen, dass die cf-tDNA eher auf die Tumorapoptose und Tumornekrose zurückzuführen war (68, 69). Im Vergleich zum gesunden Menschen betrug bei Neoplasien die Konzentration der cf-tDNA zwischen 0 und mehr als 1 000 ng/ml mit einem durchschnittlichen Wert von 180 ng/ml (10). Sonderformen für die Freisetzung von cf-tDNA

sind die Pyroptose sowie die Ferroptose, eine eisenabhängige Form des programmierten Zelltodes. Bei der Nekrose ist die Onkose mit Schwellung der Zelle als Sonderform der Freisetzung von cf-tDNA zu nennen (70). Eine weitere Möglichkeit der Verbreitung beschreibt die Genometastasen-Hypothese mit einem horizontalen Transfer von cf-tDNA auf andere Zellen (10, 71). Zum einen durch im Plasma zirkulierende Onkogene, welche vom Primärtumor abstammen und in anfällige Zellen eindringen (72). Zum anderen konnte ein horizontaler Transfer durch Phagozytose von Apoptosekörpern gezeigt werden (73). Dadurch könnte es sein, dass durch die Phagozytose von Tumorapoptosekörpern die Metastasierung vorangetrieben wird. Die Endoreplikation mit Polyploidie steht auch im Verdacht, bei der Karzinogenese eine Rolle zu spielen. Polyploidie bedeutet einen vielfachen Chromosomensatz, welcher bei der Endoreplikation durch das Fehlen von Zellteilung entsteht. Im gesunden Menschen ist ein Beispiel für Polyploidie der Megakaryozyt, die Vorstufe der Thrombozyten. Bei der Tumorentstehung schien die Endoreplikation fehlerhaft abzulaufen und könnte darüber hinaus ein Weg zur Therapieresistenz von Krebszellen darstellen (74, 75).

Eine weitere Entität von cfDNA beschreibt die zellfreie fetale DNA (cffDNA). Diese wurde nicht nur im Fruchtwasser, sondern auch im mütterlichen Plasma/Serum, Urin, Liquor und Peritonealflüssigkeit gefunden. Im Fruchtwasser wurde ungefähr 200 Mal so viel cffDNA wie im mütterlichen Plasma gefunden. Dies könnte auf einen Konzentrationsgradienten mit direktem Transfer von cffDNA über die Plazenta oder Membranen hindeuten (76). Mit Fortschreiten der Schwangerschaft stieg auch die Konzentration der cffDNA an. Gegen Ende des letzten Trimesters wurde eine Zunahme um fast 30 % jede Woche beobachtet. Aufgrund der kürzeren Fragmentlänge und der Konzentrationsverteilung über die Schwangerschaft hinweg erschien die Apoptose als die plausibelste Genese von cffDNA (77).

Schließlich gibt es noch die zellfreie mitochondriale DNA (cf-mtDNA). Mitochondrien sind ubiquitär vorkommende Zellorganellen, welche zur Energiegewinnung dienen. Es wurden verschiedene Formen von cf-mtDNA beschrieben, ganz ohne Membran oder von einer Membranhülle umgeben, wie bei extrazellulären Vesikeln/Exosomen sowie Apoptosekörpern. Gefunden wurde cf-mtDNA in Blutplasma und -serum, im Speichel wie auch im Liquor cerebrospinalis (78). Die Genese der cf-mtDNA wurde in der Apoptose, der Nekrose oder der aktiven Freisetzung vermutet. Zudem könnte cf-mtDNA während der Bildung von NETs oder dem Prozess der Autophagie („Selbstverdauung“) frei werden. Die Fragmente waren mit 30-80 bp und nicht länger als 220 bp insgesamt kürzer als die von cfDNA. Cf-mtDNA wurde mit unterschiedlichen Krankheiten, einschließlich Krebserkrankungen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, in Verbindung gebracht (46). Ein Zusammenhang in Bezug auf Sport konnte bei einer Laufbandanalysestudie nicht gefunden werden, die cf-mtDNA-Werte waren im Vergleich zur cfDNA nicht betroffen (56).

2.2.4 Abbau von cfDNA

CfDNA kann auf mehreren Wegen abgebaut werden. Den größten Anteil bildeten die Kupffer-Zellen (Makrophagen) der Leber. Bei einem Experiment wurden Mäusen radioaktiv markierte Nukleosomen verabreicht, wodurch gezeigt werden konnte, dass innerhalb von 10 min ungefähr 70 % bis 85 % der Nukleosomen aus der Leber eliminiert wurden. Zudem phagozytierten die Kupffer-Zellen vor allem die längeren cfDNA-Fragmente (70).

Desoxyribonukleinsäuren (kurz DNasen) dienen zur Spaltung von Nukleinsäuren und werden im Pankreas gebildet (6). Die im Blut zirkulierenden DNasen spalteten cfDNA, welche dann in der Leber oder in der Niere abgebaut wurde. Dabei machte die Ausscheidung über die Nieren mit < 2 % nur einen geringen Anteil aus (79). Überdies dienten DNasen auch zum Abbau von NETs (65).

Die Makrophagen der Milz und der Lymphknoten sowie die im Blutstrom vorhandenen Immunzellen waren weitere Wege des Abbaus von cfDNA (70).

Als weiterer alternativer Abbauweg von cfDNA könnte in Geweben mit hohem Zellumsatz, wie es bei Darmepithelzellen der Fall ist, cfDNA ins Darmlumen anstatt ins Blut abgegeben werden. Ähnliche Überlegungen gab es auch zur Lunge (40).

Bei mehreren Erkrankungen, die mit einem erhöhten cfDNA-Level assoziiert waren, konnte eine reduzierte DNase-Aktivität gefunden werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei pathologisch erhöhten cfDNA-Werten die Abbaumechanismen beeinträchtigt oder inadäquat waren (79). Des Weiteren konnten beim systemischen Lupus erythematodes Autoantikörper cfDNA vor der DNase schützen und mit dieser interagieren, was zu einer erniedrigten Aktivität führte (50).

Mit zunehmender cfDNA-Konzentration konnte im Zusammenhang mit Sport auch eine steigende DNase-Aktivität gefunden werden (79). Vermutet wurde, dass sich cfDNA während aerobem Training aufgrund der begrenzten Leberaufnahme anhäufen könnte (80). Eine erhöhte DNase-Aktivität bei steigender cfDNA-Konzentration wurde auch in Verbindung mit einer Fahrradergometrie und Laufbandanalyse bestätigt. Dabei war der Effekt unabhängig vom Trainingsstatus (65).

2.3 Anwendung von cfDNA

Die Erforschung und klinische Anwendung von cfDNA-Messungen ist vielgestaltig und cfDNA wird als aufstrebender Biomarker in unterschiedlichen Bereichen bereits eingesetzt. Einige Beispiele seien nachfolgend erläutert.

2.3.1 Neoplasien

Viele Menschen leiden unter einer Tumorerkrankung. Frauen in Deutschland erkrankten im Jahr 2020 am häufigsten an Brustkrebs, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Männer hingegen erkrankten am meisten an Prostatakrebs, dann an Lungen- und Darmkrebs (81). Cf-tDNA kristallisierte sich immer mehr als verlässlicher Biomarker für Krebserkrankungen heraus (10, 12, 70). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an cf-tDNA je nach Tumortyp variierte. So hing die Menge nicht nur vom Zeitpunkt des Tumorwachstums ab, sondern auch von der Herkunft. Geringere Mengen fanden sich beispielsweise beim Prostata- oder Schilddrüsenkrebs, größere Mengen beim Lungenkrebs und wiederum mehr bei Gastrointestinaltumoren. Auch für metastasierte Tumore konnten verschiedene Mengenverhältnisse abgeleitet werden. Gehirnmetastasen wiesen geringere Mengen an cf-tDNA als viszerale Metastasen auf (70).

Eingesetzt wurde cf-tDNA als Biomarker beispielsweise in der Früherkennung, bei der Diagnosestellung, dem Outcome-Monitoring sowie als Anhaltspunkt für das Ansprechen von Behandlungen (82, 83). Dies bewies sich unter anderem beim kolorektalen Karzinom (84), aber auch in der Magenkarzinomfrüherkennung, dessen Tumorlast und Prognose (85). Mit Hilfe von cf-tDNA konnte herausgefunden werden, welche Patienten mit chronischer Hepatitis B innerhalb von 5 Jahren ein hepatozelluläres Karzinom entwickelten (86). Zudem war beim Pankreaskarzinom die Hoffnung, dass sich cf-tDNA als ein verlässlicher Biomarker entwickelt, da dieses Karzinom oft erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt wurde und hohe Letalitätsraten aufwies (87, 88).

Das Lungenkarzinom wird in kleinzelliges (etwa 20 %) und nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (etwa 80 %) unterteilt. Auch diese Krebsart wurde oft erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt und hatte eine schlechte Überlebensrate. Cf-tDNA konnte bei einer früheren Diagnosestellung und zur Vorhersage der Prognose helfen (89, 90). Für das Gesundheitsrisiko „Rauchen“ fand eine Studie heraus, dass Raucher durch vermehrte Apoptose erhöhte cfDNA-Werte aufwiesen. Dadurch könnte vor allem nach der Raucherentwöhnung der Gesundheitsstatus mittels cfDNA überwacht werden (91).

In der Frauenheilkunde wurde cf-tDNA bei Brustkrebs erforscht, wobei dies zusätzlich zur Früherkennung, Diagnosestellung und Prognose sowie zum Therapiemonitoring, insbesondere bei der Individualtherapie des frühen und metastasierten Brustkrebses, relevant war (92). Des Weiteren spielte cf-tDNA eine aufkommende Rolle bei Eierstockkrebs (93). Hierbei wurde vor allem die Ergänzung zum Tumormarker CA-125 hervorgehoben, welcher auch bei anderen Tumoren, Infektionen oder in der Schwangerschaft erhöht sein könnte,

sowie die Ermittlung von Therapieresistenzen mit Hilfe von cf-tDNA. Darüber hinaus wurde cf-tDNA auch im Rahmen der Diagnose und Prognose des Zervixkarzinoms hinzugezogen (94).

In der Urologie zeigte cf-tDNA bei Prostatakrebs vergleichbare Sensitivität, jedoch höhere Spezifität als das prostataspezifische Antigen (95). Für das Diagnose- und Behandlungskonzept von Prostatakrebs wurde cf-tDNA bereits unterstützend angewandt (96).

Hämatologische Tumorerkrankungen wie Leukämie, multiples Myelom und Lymphome gehörten auch zum Forschungsfeld der cf-tDNA (97). Hierbei konnten auch Mutationen entdeckt werden, welche zur besseren, zielgerichteteren Therapieentscheidung beitragen (98, 99). Beispielhaft sei hier die akute myeloische Leukämie genannt, welche mit Hilfe des DNA-Methylierungsstatus durch das erste Zwischenprodukt 5-Hydroxymethylcytosin als zellfreie DNA klassifiziert werden konnte (100).

Zusätzliche Anwendungsgebiete der cf-tDNA und damit der personalisierten Medizin stellten die Kopf-Hals-Tumore (101) sowie das maligne Melanom dar (102).

2.3.2 Autoimmun- und chronisch entzündliche Erkrankungen

CfDNA als potenzieller Biomarker spielte immer mehr eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen, wovon im Jahr 2008 etwa 5 % bis 10 % der Weltbevölkerung betroffen waren (44).

Darunter fallen eine Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. In diesem Bereich ist die Erforschung der cfDNA noch am Anfang, lässt jedoch auf einen nicht-invasiven Biomarker für die Früherkennung, den Krankheitsverlauf sowie die frühe Entdeckung einer Progression zur Dysplasie hoffen (103).

Die Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis befällt hauptsächlich die Gelenke, wobei aber auch innere Organe betroffen sein können. CfDNA-Menge und Krankheitsaktivität waren miteinander verknüpft, sodass dies nicht nur bei der Früherkennung, sondern auch beim Krankheitsverlauf und dem Ansprechen der Behandlung hilfreich sein konnte. Zu den sogenannten Kollagenosen, bei denen sich das Immunsystem hauptsächlich gegen die Zellen des Bindegewebes richtet, zählen unter anderem der Lupus erythematodes und das Sjögren-Syndrom. Bei beiden konnte eine signifikante Korrelation zwischen cfDNA-Menge und Krankheitsaktivität gefunden werden (44, 104).

Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung. Ein Zusammenhang der Menge an Tumornekrosefaktor-Alpha-Kopien in der cfDNA und der Schwere einer Psoriasis-Erkrankung konnte gezeigt werden (105).

Beim Diabetes mellitus Typ 1 war vor allem die cfDNA-Menge der insulinproduzierenden Betazellen der Bauchspeicheldrüse interessant, welche bei der Autoimmunreaktion zerstört wurden. Die Messung der cfDNA bei an Typ-1-Diabetes mellitus Erkrankten und bei Personen mit erhöhtem Risiko, daran zu erkranken, ist ein vielversprechender Ansatz (106).

2.3.3 Neurologie

Auch in der Neurologie fand die cfDNA Einzug und wurde bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, amyotropher Lateralsklerose, Multipler Sklerose, neuroinfektiösen Erkrankungen und Schlaganfällen (Apoplex) sowie bei Epilepsie erforscht (107).

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Form der Demenz. Hierbei spielte cfDNA eher als zusätzlicher Hilfs-Biomarker eine Rolle, insbesondere bei der spät einsetzenden Alzheimer-Erkrankung (108). Die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung ist der Morbus Parkinson, wobei cfDNA aus dem Liquor cerebrospinalis als diagnostischer Biomarker für die früh einsetzende Parkinson-Erkrankung verwendet wurde. Es konnten signifikante Korrelationen für den Mini-Mental-Status-Test, den Uhrentest, die Hamilton-Angst-Skala, den Arbeitsstatus und die Bildung sowie die alkoholische Vorgeschichte festgestellt werden (109). Darüber hinaus diente cfDNA zur Identifizierung von Personen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer Demenz und war assoziiert mit schnellerem kognitivem Zerfall sowie gesteigerter Gebrechlichkeit (110).

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung stellt die amyotrophe Lateralsklerose dar, wobei es zur Schädigung der Motorneurone im zentralen Nervensystem, zur Lähmung und schließlich zum Tod kommt. CfDNA fungierte als Hilfe bei der Diagnosestellung (111).

Durch Neuroinflammation und Neurodegeneration zeichnet sich die Multiple Sklerose (MS) aus. Bei der schubförmig remittierenden MS konnte gezeigt werden, dass sich cfDNA zur Erkennung und Diagnose eignete (112). Zudem stellte sich heraus, dass das Epstein-Barr-Virus mit der Entwicklung einer MS zusammenhing (113). So könnte die Analyse von cfDNA als Biomarker für MS dienen (114).

Im Hinblick auf neuroinfektiöse Erkrankungen hat cfDNA den Vorteil, dass keine Zeit beim Anlegen von Kulturen zur Identifikation des Erregers verloren geht. Anwendungsbereiche sind beispielsweise die zerebrale Malaria bei der Malaria tropica durch den Parasit Plasmodium falciparum oder die tuberkulöse Meningitis durch das Mycobacterium tuberculosis (114).

Beim Apoplex konnte gezeigt werden, dass die Menge der gemessenen cfDNA mit der Schwere eines Anfalles und der damit verbundenen Hämatomgröße korrelierte. Ebenso

konnte mit Hilfe der cfDNA die Mortalität während der nächsten 6 Monate vorhergesagt werden (115). Somit könnte sich cfDNA als wertvoller diagnostischer und prognostizierbarer Outcome-Biomarker erweisen (8).

Die Übererregbarkeit der Neurone ist ein Merkmal der Epilepsie, wobei unterschiedliche Areale betroffen sein können. Erwachsene mit fokaler Epilepsie leiden am häufigsten unter Temporallappenepilepsie. Mit dem Fortschreiten der Erkrankungsdauer veränderte sich die cfDNA-Methylierung, was als potentieller Marker verwendet werden kann (116).

2.3.4 Kardiologie

Maßgebliche Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die Atherosklerose. Diese entsteht durch endotheliale Dysfunktion, Lipidablagerungen und Plaquebildung. Besonders gefährlich sind Verschlüsse oder Plaquerupturen, wodurch es zu Herzinfarkten und Schlaganfällen kommen kann. Die cfDNA-Menge hing hierbei mit dem Fortschreiten der Atherosklerose zusammen und kann somit zur Früherkennung beziehungsweise zum Monitoring verwendet werden (117).

CfDNA deutete auf einen verlässlichen Biomarker bei Myokardverletzungen hin, wie sie beispielsweise bei einem Herzinfarkt auftreten. Das kardiale Protein Troponin ist der Goldstandard zur Diagnosestellung eines akuten Herzinfarktes. Obwohl die Halbwertszeit von cfDNA kürzer als die des Troponins ist, kann dies aufgrund dessen als Vorteil bei der Beobachtung von sofortigen Behandlungserfolgen gesehen werden. Ein weiterer Vorteil ist die Unabhängigkeit von chronischen Nierenerkrankungen im Gegensatz zur Beeinflussung dieser beim Troponin (118).

Die Aortenklappenstenose als Folge von Verkalkung ist in Deutschland die häufigste Herzklappenerkrankung, die einer Behandlung bedarf. CfDNA ist ein aufstrebender diagnostischer Biomarker für die kalzifizierte Aortenklappenstenose. Wurde cfDNA mit den Risikofaktoren Geschlecht, BMI (engl. Body-Mass-Index = Körpermassenindex) und arterielle Hypertonie kombiniert, dann war die Vorhersage sogar noch effizienter (119).

Bei Herztransplantationen mit Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion musste bisher unter anderem eine Biopsie entnommen werden. Hinweise ergaben, dass es bei Abstoßung zu einer Erhöhung der cfDNA-Menge bereits bis zu 5 Monate vor dem Auftreten von Schäden in einer Biopsie kam (120).

2.3.5 Sport

Auch bei verschiedenen sportlichen Aktivitäten gewann cfDNA als möglicher Biomarker und Leistungsdiagnostikmarker immer mehr an Bedeutung (41).

Unter standardisierten Bedingungen wurde cfDNA während einer Laufbandanalyse gemessen. Die Geschwindigkeit wurde alle 3 min um 2 km/h bis zur Erschöpfung gesteigert. Hierbei kam es direkt oder kurz nach der Anstrengung zu einem 9,9-fachen Anstieg des cfDNA-Spiegels. Die Konzentration fiel konsequent und nach 30 min war der cfDNA-Spiegel nur noch um das 5-fache erhöht, was auf einen schnellen Abbau hindeutete. Als Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels dient Laktat der objektiven Beurteilung der Leistungsfähigkeit. Es konnte gezeigt werden, dass cfDNA mit der Kinetik von Laktat während der Belastung nahezu übereinstimmte (56).

Kurz nach einem 10-km-Lauf erhöhte sich die cfDNA-Menge im Plasma signifikant um das 7,6-fache des Ausgangswertes, wobei es zu individuellen Unterschieden zwischen den Freiwilligen kam. Diese waren jedoch nicht mit dem Alter, Geschlecht oder BMI verknüpft (56).

Für einen Halbmarathon wurde ermittelt, dass die cfDNA-Höhe direkt nach dem Lauf anstieg und bereits 2 h danach wieder den Ausgangswert erreicht hatte (121). Auch beim Marathon kehrten die cfDNA-Werte 2 h danach wieder zu den Ausgangswerten zurück (122).

Nach einem Ultramarathon über 6 h kam es auch direkt nach der Belastung zu den höchsten cfDNA-Werten. Jedoch waren noch 2 h später die Werte erhöht und erreichten erst 24 h nach dem Lauf wieder die Ausgangswerte. Dies könnte auf die längere Belastungszeit mit unterschiedlichem Ausmaß an Stress im Vergleich zum Halbmarathon zurückgeführt werden (48).

Ein Ironman mit 9 h bis zu 14 h Belastung führte erst 24 h danach zu den höchsten cfDNA-Werten und benötigte 5 Tage, um wieder auf die Ausgangswerte zu gelangen. Während der letzten Messung nach 19 Tagen sanken die cfDNA-Werte sogar noch weiter (123).

Beim Fußball sind im Wechsel verschiedene sportliche Ansprüche gefragt, wie beispielsweise Sprint, Joggen und Gehen. Zum einen wurde cfDNA während einer regulären Saisonwoche (Training am Montag, Mittwoch und Freitag sowie Spiel am Samstag), zum anderen während einer standardisierten Sprinttrainingseinheit über 40 m entnommen. Beides Mal kam es zu signifikanten cfDNA-Anstiegen nach der Belastung. Überdies konnte eine signifikante Korrelation zwischen cfDNA und Laktat festgestellt werden, wobei cfDNA im Unterschied zu Laktat sowohl die aerobe als auch die anaerobe Leistung abzubilden schien (124). Zu dieser Erkenntnis der Leistungsabbildung gelangte auch eine Studie, in der das maximale aerobe

Fitnesslevel mittels Laufbandergometrie und das maximale anaerobe Fitnesslevel mittels Fahrradergometrie erhoben wurde (125).

Während einer anderen Fahrradergometrie-Studie wurde standardisiert bei 50 W begonnen und alle 3 min um 50 W bis zur Erschöpfung eskaliert. Ebenfalls stieg hier die Konzentration von cfDNA direkt nach der Belastung auf den Höchstwert an und sank innerhalb von 90 min auf das Ausgangsniveau zurück. Der durchschnittliche Anstieg war jedoch nicht so stark wie bei den Laufaktivitäten. Dies könnte darauf hinweisen, dass es zusätzlich eine Intensitätsbeziehungsweise dauerabhängige Freisetzung der cfDNA gibt (126, 127).

Für das Krafttraining stand bislang nur die Creatinkinase (CK) als indirekter Marker für Muskelzellschädigung mit limitiertem Potenzial zur Einschätzung der Trainingsbelastung zur Verfügung. Im Gegensatz zur CK zeigte cfDNA einen schnelleren Anstieg der Werte, sogar innerhalb von Minuten, und könnte damit als Biomarker für das Training dienen. Insgesamt kam es zu einem höheren cfDNA-Anstieg nach einer einzelnen Einheit mit hoher Intensität und weniger Wiederholungen als nach einer Einheit mit geringerer Intensität und mehreren Wiederholungen (14).

Kraft wird auch beim Rudern benötigt. Während einer Ruderergometrie wurde beginnend bei 200 W schrittweise um 50 W alle 4 min bis zur Erschöpfung gesteigert. In einer Pause von 30 s zwischen den Stufen wurden Blutproben zur cfDNA-Messung entnommen. Es kam zu einem 2,5-fachen Anstieg der cfDNA direkt nach der Belastung, welche 30 min danach wieder auf den Ausgangswert sank (79).

Insgesamt könnte mit Hilfe der cfDNA Übertraining beaufsichtigt und so gegebenenfalls vermieden werden. Die Konzentration von cfDNA nahm während eines Krafttraining-Programmes proportional mit der Trainingsbelastung zu (13).

2.3.6 Weitere Anwendungsbereiche

Bei Traumata zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen cfDNA-Menge und Mortalitätsrate sowie der Schwere der Traumata. Zudem konnten die posttraumatischen Komplikationen mit Hilfe von cfDNA vorhergesagt werden (128).

Die Krankenhausaufenthaltsdauer nach Verbrennungen hing mit der Höhe der cfDNA-Menge zusammen. Insgesamt war die Menge bei Verbrennungen beziehungsweise Blitzschlag höher als bei Verbrühungen (129). Somit könnte cfDNA als prognostischer Faktor dienen (130). Das Ausmaß an Verletzungen beziehungsweise Schäden nach Rauchvergiftungen kann sich erst mit Verzögerung von 1 bis 2 Tagen herauskristalisieren, weshalb hier cfDNA als ein vielversprechendes Triage-Hilfsmittel zur Frühdiagnostik eingesetzt werden könnte (131).

Ein weiteres Anwendungsbeispiel bietet die Sepsis als Organdysfunktion, welche in einen lebensbedrohlichen septischen Schock übergehen kann. Wenn CfDNA innerhalb der ersten 24 h gemessen wurde, diente diese am besten zur Mortalitätsvorhersage (132). Darüber hinaus deutete eine signifikante Korrelation zwischen dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein sowie Organversagen und cfDNA auf einen hilfreichen prognostischen Marker für die Intensivstation hin (133).

In der Pränataldiagnostik fand cfDNA seit 2012 Einzug bei den nichtinvasiven Pränataltests. Diese basieren auf der Bestimmung von cffDNA und können unter anderem eine Trisomie 13/18/21, eine Fehlverteilung der Chromosomen sowie das Geschlecht feststellen (134). Zudem konnte cffDNA in Verbindung mit verschiedenen Schwangerschaftserkrankungen wie Präeklampsie, Hyperemesis gravidarum und intrauterinen Wachstumsstörungen gebracht werden. Hierbei war die cffDNA-Konzentration erhöht, sogar schon vor Beginn der klinischen Symptomatik. Zusätzlich konnte mit großer Genauigkeit der Rhesusfaktor bestimmt und so Rhesus-Inkompatibilitäten frühzeitig erkannt werden (77).

Verschiedenste Viruserkrankungen wurden bezüglich cfDNA erforscht. Beispielhaft seien hier das Dengue-Virus (135), das Hepatitis-Virus sowie das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) erwähnt (136). Weiterhin gab es auch Untersuchungen von cfDNA bei Covid-19-Erkrankungen mit dem Coronavirus SARS-CoV-2. Zunächst schien es so, dass keine direkte Verbindung von cfDNA und der Covid-19-Erkrankung gefunden werden konnte. Jedoch wurde cfDNA als ein effektiver Biomarker für Komplikationen vermutet und könnte damit Hochrisikopatient*innen mit einer schlechten Prognose identifizieren (137). Weitere Untersuchungen bewiesen, dass es durchaus eine signifikante Korrelation zwischen cfDNA und der Covid-19-Erkrankung gab und auch die Schwere der Erkrankung mit cfDNA als prognostischer Faktor abgebildet werden konnte (138).

Schließlich sollen auch die psychiatrischen Erkrankungen, die einen Großteil der globalen Krankheitslast ausmachen, im Zusammenhang mit cfDNA-Messungen genannt werden. Hierbei erfolgten Studien zur Depression, Angststörung, posttraumatischen Belastungsstörung und bipolaren Störung sowie Schizophrenie (139). Oft ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse, sodass sich cfDNA eher nicht als Biomarker verwenden ließ. Lediglich bei der Schizophrenie konnten erhöhte cfDNA-Mengen bei Erkrankten nachgewiesen werden (140).

3 Material und Methoden

3.1 Auflistung genutzter Chemikalien, Geräte, Materialien und Software

Die untenstehende Tabelle 3.1 listet alle verwendeten Chemikalien, Geräte, Materialien und Software auf.

Tabelle 3.1: Auflistung genutzter Chemikalien, Geräte, Materialien und Software

Chemikalien	Hersteller/Vertrieb
DNA-Away	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Destilliertes Wasser H ₂ O	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
dNTPs	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Ethanol 70%/100%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hifi Buffer	BioCat GmbH, Heidelberg
Mausplasma	s. (141)
Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
SYBR Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Geräte	Hersteller/Vertrieb
Autoklav Systec VX 150	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Eismaschine Scotsman Flockeneisbereiter, AF-80	MS Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Kolbenhubpipette 2,5/10/100/1000µl	Eppendorf AG Hamburg
Mini Tischzentrifuge Mini-Zentrifuge Rotilabo	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Mini Tischzentrifuge Spectrafuge Mini Laboratory Centrifuge	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Mini Tischzentrifuge Sprout	G. Kisker GbR, Steinfurt
PCR-Arbeitsbank UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Spülmaschine Miele Reinigungs- und Desinfektionsautomat, G 7883	Miele & Cie. KG, Friedberg
Thermocycler CFX 384 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Vortexer RS-VA 10	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Vortexer Vortex Mixer Labnet	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Vortexer Vortex-Genie 2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Zentrifuge Centrifuge 5810R, Rotor FA-45-24-11	Eppendorf AG Hamburg
Material	Hersteller/Vertrieb
Einmalhandschuhe Nitril	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserlautern
Eppendorf-Tubes 200/500µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf
Eppendorf-Tube Racks 200µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf
Falcon-Tubes 15/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterspitzen 10/100/1000µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasware (Messbecher)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Low retention Spitzen 10/100/1000µl	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserlautern
Mundschutz	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Plastikware (Messbecher, Messzylinder)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10/100/1000µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
qPCR-Platten Klebefolie	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
qPCR-Platten, weiß (96/384-Well)	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserlautern
Reaktionsgefäße 0,2/0,5/1,5/2ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Scharfer Löffel nach Willinger 2/3mm	Kosmetex GmbH, Unterhaching
Software	Hersteller/Vertrieb
Bio-Rad CFX Manager 3.1 (3.1.1517.0823)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Endnote 20.6	Clarivate Analytics, London
Jamovi 1.8.1.0 (plus Module: jmv 1.6.14, scatr 1.2.0, gamlj 2.4.8, jjstatsplot 0.0.2)	The jamovi project (2021). Jamovi (Version 1.8.1.0) [Computer Software]. Retrieved from https://www.jamovi.org (142)
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA

3.2 Ethikantrag und Genehmigung

Im Zuge der Verwendung von Blutproben aus den unter Kapitel 4 durchgeführten Studien musste die Zustimmung der Ethik-Kommission eingeholt werden (s. Anhang 9.1). Die Genehmigung erfolgte in zweifacher Ausführung. Zum einen in Litauen mit zusätzlichem Bestätigungsbrief, da die Studien dort von Herrn Prof. Marius Brazaitis (Lithuanian Sports University, Institute of Sports Science and Innovation, Department of Applied Biology and Rehabilitation) durchgeführt wurden (s. Anhang 9.2.2). Zum anderen erfolgte die Genehmigung des Antrages für die Verwendung der gewonnenen Proben aus Litauen durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz am 23. Mai 2019 (s. Anhang 9.2.1).

3.3 Versuche: Etablierung Abkratzmethode tiefgefrorener Proben

Von Herrn Prof. Marius Brazaitis kamen die Plasma- und Serumproben auf Trockeneis (bei etwa $-78,4\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert aus Litauen. In Deutschland wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren aufbewahrt.

Bei bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen von cfDNA bestand das Problem, dass durch zu viele Auftau- und Einfrierzyklen diese zerstört wurde (143). Damit Proben für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen, wurde deshalb die Abkratzmethode tiefgefrorener Proben mit dieser Dissertation etabliert.

Hierfür erfolgte zunächst eine Überprüfung, ob es einen Unterschied zwischen einer oberflächlich abgekratzten Probe und einer Probe gab, die anfänglich auf Eis gekühlt und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut wurde. Die Testung fand anhand von Plasmaproben aus der „Drop Jump“-Studie (s. Kapitel 4.7) mit den Probanden „DJ 5“ und „DJ 2“ statt. Bei beiden wurden die Proben jeweils einmal abgekratzt und einmal komplett aufgetaut mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) gemessen. Nähere Erläuterungen zur Messmethode erfolgen in Kapitel 3.5.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob die Pipettierhöhe innerhalb eines Eppendorf-Tubes beziehungsweise eines Falcon-Tubes einen Unterschied bei der Messung ausmachte. In dem Eppendorf-Tube stammte die Plasmaprobe von „D“. Diese wurde von einem ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung für Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation des Instituts für Sportmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz während einer Laufbandbelastung gewonnen. Die Plasmaprobe aus dem Falcon-Tube kam von Proband 11 der „Fahrrad-Exosomen“-Studie derselben Abteilung (144). Diese war im Gegensatz zum Eppendorf-Tube schräg eingefroren, sodass die verschiedenen Pipettierhöhen besser erreicht werden konnten.

Es wurde im gefrorenen Zustand an fünf unterschiedlichen Höhen (a – e) abgekratzt, welche in Abbildung 3.1 veranschaulicht sind. Die aufgetauten Proben wurden zweimal 1:10 verdünnt, sodass es von einer Pipettierhöhe je zwei Verdünnungen mit 1:10 gab, die mittels qPCR gemessen und verglichen werden konnten.

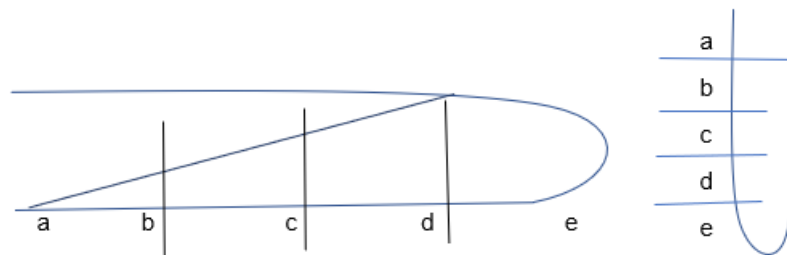


Abbildung 3.1: Abkratzhöhe a-e Falcon-Tube und Eppendorf-Tube

Skizziert sind hier links das Falcon-Tube und rechts das Eppendorf-Tube mit den fünf verschiedenen Abkratzhöhen: a = ganz oben, b = 25 % unterhalb, c = in der Mitte, d = 75 % unterhalb der Oberfläche und e = ganz unten.

Für die Etablierung einer Abkratzmethode tiefgefrorener Proben wurde eine Versuchsreihe zur Bestimmung der Zeit für die Reinigung und Trocknung des benötigten scharfen Löffels mit 100 % Ethanol und DNA-Away angelegt.

Das Protokoll und die Ergebnisse finden sich in Kapitel 5.1.

3.4 Primer

Folgende, von Frau Dr. Sarah Breitbach (ehemalige Doktorandin der Abteilung für Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation des Instituts für Sportmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) etablierte Primersequenzen (145) wurden als Multilocus-Primer zur Amplifikation zweier Fragmentlängen des L1PA2-Retrotransposons verwendet: Für die Längen von 90 bp und 222 bp wurde die Vorwärts-Primersequenz 5' TGC CGC AAT AAA CAT ACG TG 3' sowie für die Rückwärts-Primersequenz 5' GAC CCA GCC ATC CCA TTA C 3' für 90 bp und 5' AAC AAC AGG TGC TGG AGA GG 3' für 222 bp eingesetzt.

Der Aufbau des menschlichen Genoms ist in Abbildung 3.2 vereinfacht dargestellt. Hieraus kann auch die Herkunft des L1PA2-Retrotransposons nachvollzogen werden, welches die zweite Familie der LINE-1 (engl. long interspersed nuclear element 1 = langes eingestreutes Kernelement 1) darstellt und ungefähr 17 % des menschlichen Genoms ausmacht (146). Zudem ist das L1PA2-Retrotransposon sehr spezifisch für das menschliche Genom (147).

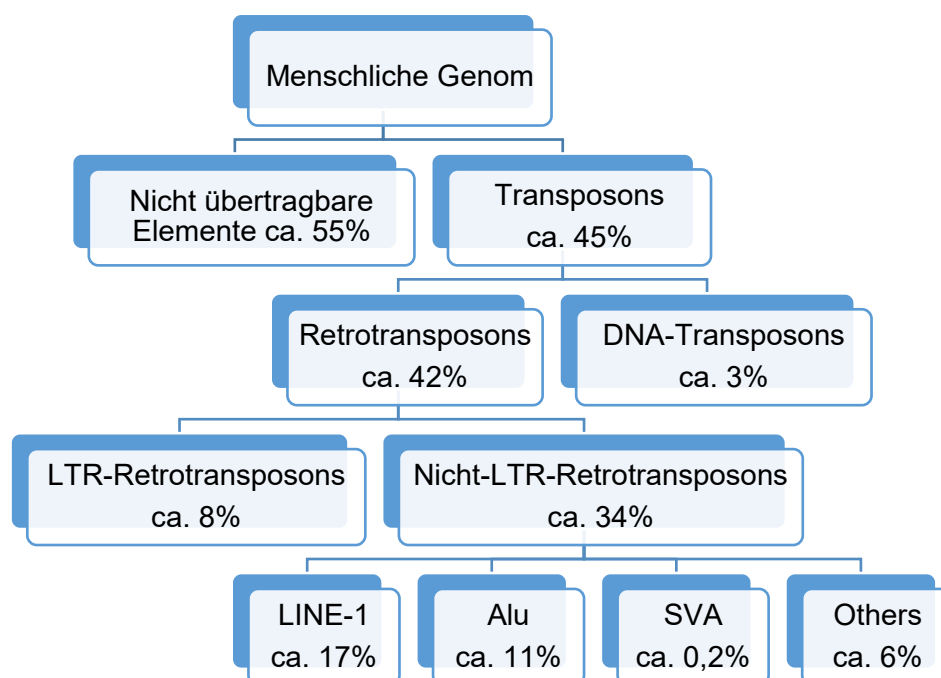


Abbildung 3.2: Aufbau des menschlichen Genoms

Die Hierarchie zeigt, wie das menschliche Genom aufgebaut ist. Hier kann die Herkunft des L1PA2-Retrotransposons nachverfolgt werden, welches die zweite Familie der LINE-1 darstellt. Engl. LTR (long terminal repeats) = lange Endwiederholungen, engl. LINE-1 (long interspersed nuclear element 1) = langes eingestreutes Kernelement 1, engl. Alu = Alu, engl. SVA (SINE-VNTR-Alu = Short interspersed nuclear element – variable number tandem repeats - Alu) = kurzes eingestreutes Kernelement – variable Anzahl Tandemwiederholungen – Alu, engl. Others = Weitere.

Durch die Verwendung eines Multilocus-Primer kann eine höhere Sensitivität erreicht werden, da dieser an verschiedene Stellen des menschlichen Genoms bindet (10). Dadurch, dass Plasma-cfDNA bei 166 bp (148) beziehungsweise 167 bp (149) die höchste Gesamtmenge aufweist, wurden die Fragmentlängen von 90 bp und 222 bp für den Primer ausgewählt. Darüber hinaus kommen das 90-bp-Fragment insgesamt 3345 Mal und das 222-bp-Fragment insgesamt 3134 Mal im menschlichen Genom vor (145). Dadurch ist die Vervielfältigung schon bei geringster Anzahl von 90- oder 222-bp-Fragmenten gewährleistet.

3.5 Messung des L1PA2-Fragments mittels qPCR

Die Methode zur Messung des L1PA2-Fragments, sprich der Menge an cfDNA, mittels qPCR wurde von Frau Dr. Sarah Breitbach entwickelt und übernommen (145). Diese beruht auf dem Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei es um die exponentielle Amplifikation von DNA geht. Damit können schon kleinste Mengen von cfDNA nachgewiesen werden. Der Ablauf der PCR gliedert sich in mehrere Zyklen mit entsprechend drei Phasen unterschiedlicher Temperatur: Zuerst wird bei der Denaturierung die DNA unter hohen

Temperaturen (etwa 95 °C) durch Erhitzen in ihre Einzelstränge aufgespalten. Darauf folgt das Annealing, die komplementäre Anlagerung der Primer an den Einzelstrang. Die optimale Temperatur variiert je nach Anzahl der Wasserstoffbrücken der Primer zwischen 40 °C und 70 °C. Die sogenannte „Elongation“ entspricht der dritten Phase und schließt einen Zyklus ab. In dieser Phase findet die eigentliche Vervielfältigung mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase statt. Diese bindet bei meist 70 °C bis 72 °C an das freie 3'-OH-Ende der Primer und synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Nach der PCR erfolgt eine Gel-Elektrophorese zum Nachweis der vervielfältigten DNA. Bei diesem Verfahren wird die DNA durch ein elektrisches Feld nach Größe aufgetrennt. Aufgrund der negativ geladenen DNA wandert diese zum Pluspol. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch das Gel (6).

Eine Erweiterung zur PCR stellt die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) dar, welche die Möglichkeit einer Echtzeitquantifizierung von DNA bietet. Proportional zur Menge der cfDNA steigt das Fluoreszenzsignal des dafür verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green. Durch diese proportionale Korrelation des Farbstoffes mit der cfDNA entstammt der Name der quantitativen Echtzeit-PCR (engl. real-time-PCR) (150). Es entfällt der Schritt der Gel-Elektrophorese, wie es nach einer herkömmlichen PCR notwendig ist.

Die gemessenen Fluoreszenzkurven beschreiben einen sigmoidalen Verlauf. Zu Beginn werden nur Hintergrundfluoreszenzen erfasst, bis genügend Reporter-Fluoreszenzmoleküle zur Detektion frei geworden sind und die exponentielle Phase folgt. Sobald dieser Schwellenwert erreicht ist, wird die Quantifizierung erhoben und entsprechend Quantifizierungszyklus (C_q, engl. quantification cycle) genannt (151). Zum Schluss wird eine Plateau-Phase erreicht, bei der das Fluoreszenzsignal unverändert bleibt. Die Reaktion wird möglicherweise durch eine verminderte Enzymaktivität, den Verbrauch an Reagenzien oder Kumulation von hemmenden Stoffen (Pyrophosphat) limitiert (150, 152). Abbildung 3.3 stellt den Verlauf von Fluoreszenzkurven und den Schwellenwert dar.

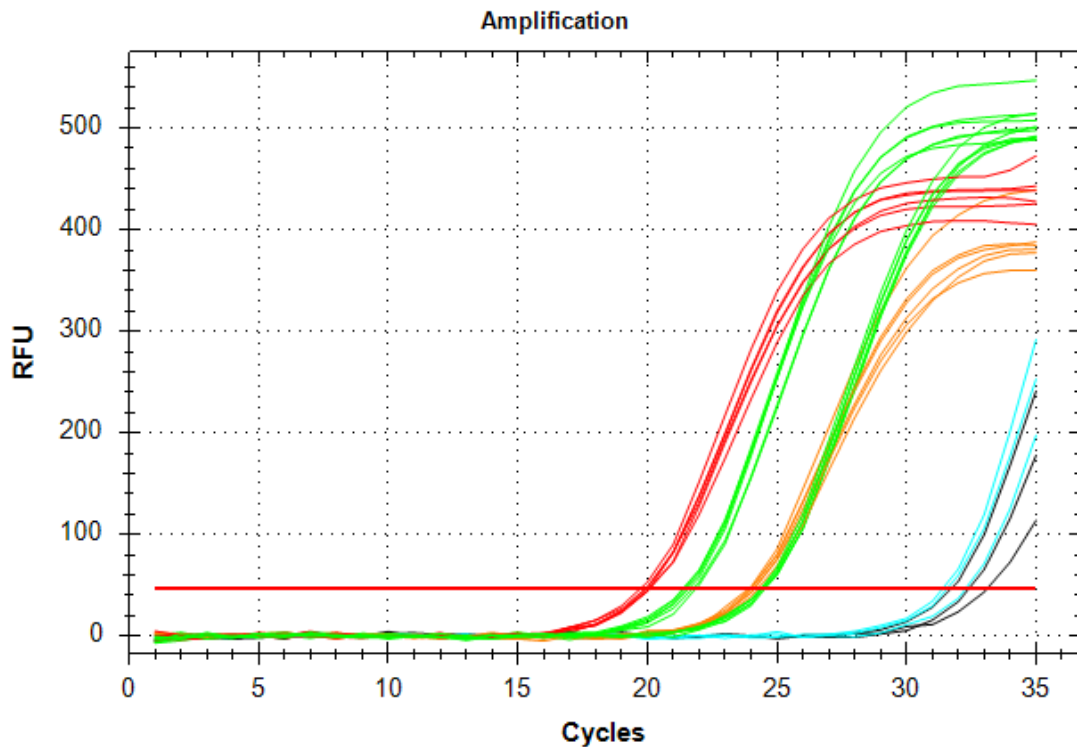


Abbildung 3.3: Fluoreszenzkurven

Die Grafik zeigt verschiedene sigmoide Fluoreszenzkurven der Amplifikation von Plasma-DNA-Proben (grün) sowie die Standardlaborkontrollen (Negativkontrollen: H₂O = hellblau, Maus = schwarz; Positivkontrollen D pre = orange, D post = rot) aus einer Messung von Kirsten Heinkel. Die rote Linie stellt den Schwellenwert der Quantifizierung dar. Engl. RFU (Relative Fluorescence Units) = relative Fluoreszenzeinheiten, engl. cycles = Zyklen (eines PCR-Durchlaufes).

Die qPCR-Messung der in dieser Dissertation analysierten Proben erfolgte in den nachfolgend beschriebenen Phasen: Zu Beginn fand eine zweiminütige initiale Denaturierung bei 98 °C statt. Anschließend kamen 35 Zyklen mit jeweils 10 s Denaturierung bei 94 °C, 40 s Annealing bei 64 °C sowie 10 s Elongation bei 75 °C (145, 153).

Die Anzahl von 35 Zyklen erzeugte eine ausreichende Menge an DNA für die Analyse der Schmelzkurve (154). Während des Schmelzvorganges wurde zwischen 65 °C und 95 °C alle 10 s die Temperatur um 0,5 °C gesteigert. Durch ein unterschiedliches Schmelzverhalten konnte zwischen spezifischen und unspezifischen Nebenprodukten, exemplarisch Primer-Dimeren, unterschieden und die Spezifität der qPCR kontrolliert werden.

Um eine qPCR-Messung durchzuführen, waren folgende Schritte notwendig: die Aufbereitung der Proben, die Herstellung des Master- und Primermixes sowie die Verwendung von Standardkontrollen.

Die abgekratzte Probe wurde auf Eis aufgetaut und dann etwa 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Aus der vorher mit einem Vortexer durchmischten Probe wurden 2,2 µl

entnommen und mit 18 µl destilliertem Wasser verdünnt, damit ein Verhältnis von 1:10 entstand. Direkt nach der Verdünnung wurden die Proben abermals mit dem Vortexer vermischt und für wenige Sekunden mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nachdem die Verdünnung auf Eis gestellt worden war, wurde sie bei -20 °C eingefroren.

Der Mastermix enthält die notwendigen Reagenzien zur qPCR-Messung (s. Tabelle 3.2). Für die Herstellung des Mastermixes wurde die Menge auf x Proben in Bezug auf 15 µl (Triplet von 3 x 5 µl plus 15 % Überschuss) mit folgenden Grundkonzentrationen hochgerechnet:

Tabelle 3.2: Reagenzien Mastermix

dNTPs	41,4 µl
FITC	14,4 µl
H ₂ O	683,1 µl
HiFi Buffer	331,2 µl
Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase	27,6 µl
SYBR Green	20,7 µl

Für die Herstellung von 2,1 µM Primermix wurden folgende Reagenzien und Grundkonzentrationen verwendet (s. Tabelle 3.3):

Tabelle 3.3: Reagenzien Primermix

H ₂ O	383,2 µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	8,4 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	8,4 µl

Für den benötigten Primer-Mastermix wurden dann 12 µl Mastermix mit 1 µl Primermix für das Volumen von einem Triplett verwendet. Diese Menge wurde dann auf die Anzahl der Proben inklusive 15 % Überschuss hochgerechnet und mit dem Vortexer vermischt. Der Überschuss diente zur Absicherung eines möglichen Pipettierverlustes.

Anschließend wurde für die qPCR 14,3 µl Primer-Mastermix (10 % Überschuss eingerechnet) mit 2,2 µl 1:10 verdünnter Probe ebenfalls mit dem Vortexer vermischt. Hieraus wurden 3 x 5 µl für ein Triplett einer Probe entnommen und auf die qPCR-Platte pipettiert. Durch die Triplets sollte die Erfassung von Pipettierfehlern vermieden werden.

Für die im Rahmen der qPCR empfohlene gleichzeitige Messung von Standardkontrollen (155) dienen im Labor der oben bereits erwähnten Abteilung für Sportmedizin destilliertes Wasser (H₂O) und Mausplasma (1:10 in H₂O verdünnt) als

Negativkontrollen. Der Vorteil von Mausplasma ist, dass das L1PA2-Fragment darin nicht vorkommt. Für die Positivkontrollen dienten „D pre/post“ (während einer im Labor der Sportmedizin gewonnenen Probe bei Laufbandbelastung). Die „D“-Proben wurden 10 min bei 4 °C und 1 600 x g, gefolgt von 16 000 x g bei 4 °C für 5 min, mit der Eppendorf-Centrifuge 5810R zentrifugiert (145). Die Standardkontrollen wurden bei -20 °C gelagert und höchstens dreimal aufgetaut und wieder eingefroren.

Die fertig pipettierte qPCR-Platte wurde folgend bei 20 °C und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 1 500 x g 2 min lang mit der Eppendorf-Centrifuge 5810R zentrifugiert (Beschleunigung von 9, Bremse von 7).

Danach erfolgte die Messung der 90-bp- und 222-bp-Fragmente des L1PA2-Retrotransposons mit Hilfe des Thermocycler CFX 384 Touch Real-Time PCR Detection Systems.

3.6 Kalibrierung und Berechnung

Die Kalibrierung und Berechnung der gemessenen cfDNA-Menge erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad CFX Manager 3.1. Das Programm bestimmt den Cq-Wert (s. Kapitel 3.5), indem es den Schnittpunkt der Fluoreszenzkurven mit einem automatisch berechneten Schwellenwert nimmt. In Abhängigkeit von der Fluoreszenzsignalstärke und der Anzahl der Proben variiert dieser automatisch berechnete Cq-Wert. Dadurch, dass bei jeder Messung die Positivkontrollen „D pre/post“ (s. Kapitel 3.5) als Kalibrierungsproben vorkamen, konnten die Unterschiede zwischen verschiedenen qPCR-Platten behoben werden (155). Für die Kalibrierung der Platte wurde der Cq-Schwellenwert so angepasst, dass der Mittelwert der Cq-Werte der einzelnen Positivkontrollen einem vordefinierten Cq-Mittelwert glich. Die Grundlage des vordefinierten Cq-Mittelwertes bildeten die durch den Bio-Rad CFX Manager automatisch berechneten Cq-Mittelwerte von 10 PCR-Platten, gemessen von zwei Mitarbeitern des Labors der oben bereits erwähnten Abteilung für Sportmedizin (141). Daraus resultierten folgende Cq-Werte der Positivkontrollen für die 90 bp mit Daniel pre von 24,20 und Daniel post von 19,90 sowie für die 222 bp mit Daniel pre von 24,82 und Daniel post von 20,46. Diese Werte bildeten für die Positivkontrollen gleichzeitig die sogenannte Cq-LOQ-Reihe.

Als Quantifizierungsgrenze (LOQ = engl. limit of quantification) wird die niedrigste Konzentration definiert, die gerade noch mit einer 80 %igen Zuverlässigkeit bestimmt werden kann. Diese niedrigste DNA-Konzentration beschreibt die geringste Kopienanzahl einer errechneten Konzentration, die nicht > 20 % von der vordefinierten Konzentration variieren darf. Die vordefinierte Konzentration wurde beim L1PA2-90 bp-Fragment mit 2,0 ng/ml und

beim L1PA2-222-bp-Fragment mit 2,2 ng/ml Plasma-cfDNA angegeben. Damit kann durch die Masse des Fragments die Konzentration an cfDNA errechnet werden (5).

Für die Kalibrierung musste also der automatisch berechnete Cq-Mittelwert der Positivkontrollen durch Verschiebung des Cq-Schwellenwertes im Bio-Rad CFX Manager an die vordefinierten Werte der Cq-LOQ-Reihe adaptiert werden.

Die Nachweisgrenze (LOD = engl. limit of detection) beschreibt die niedrigste Konzentration an cfDNA, bei der noch 95 % der Positivproben in der qPCR erfasst werden. Diese dient der Beschreibung der Sensitivität (155).

Eine in Microsoft Excel 365 erstellte Auswertungsdatei des Labors der oben bereits erwähnten Abteilung für Sportmedizin wurde als Grundlage für die Berechnung der cfDNA-Konzentration verwendet. Mit Hilfe einer ermittelten Standardkurve für 90 bp und 222 bp konnte über die Cq-Werte auf die unbekannte Menge an cfDNA geschlossen werden. Dies wurde aufgrund der Logarithmierung der cfDNA ermöglicht, weil damit der exponentielle Zusammenhang von Cq-Werten und cfDNA-Menge linearisiert werden konnte. Die Einheit der cfDNA-Menge wurde in dieser Dissertation mit ng/ml angegeben.

3.7 Vorgehen bei Fehlmessungen

Durch die Messung der einzelnen Proben in Triplets (s. Kapitel 3.5) wurde der jeweilige Cq-Mittelwert des Triplets ermittelt. Sobald dieser um $> 0,4$ Cq von der Standardabweichung beziehungsweise um mehr als die doppelte Standardabweichung bei den Positivkontrollen variierte, wurde die Probe als Fehlmessung angesehen und nicht mehr in der Berechnung berücksichtigt. Zudem wurden Proben mit einem Cq-Wert von $> 27,32$ bei 90 bp und einem Cq-Wert von $> 26,48$ bei 222 bp nicht toleriert. Diese Proben wurden nochmals neu mit destilliertem H₂O 1:10 verdünnt und auf einer anderen qPCR-Platte nachgemessen. Aus Kostengründen fand höchstens eine dreimalige Nachmessung statt. Ansonsten wurde die Probe nicht in die Auswertung mit einbezogen. Bei den Negativkontrollen musste der niedrigste Cq entweder mindestens zwei Zyklen über dem höchsten Probenwert liegen oder mindestens einen Wert von 28 aufweisen. Falls dies nicht der Fall war, musste die ganze qPCR-Platte verworfen werden (156).

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Jamovi 1.8.1 und Microsoft Excel 365. Alle Werte wurden zur besseren Darstellbarkeit dekadisch mit der Basis von 10

logarithmiert und über den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % mit $p < 0,05$ festgelegt. Für die deskriptive Statistik umfasste die Auswertung die Anzahl der Proben, den Mittelwert, den Median, die Standardabweichung sowie das Minimum und Maximum. Eine graphische Darstellung erfolgte mittels Box-Plots, Streu- / Balken- und Liniendiagrammen. Bei der explorativen Statistik wurden die Werte mit Hilfe des gemischten Modells (engl. Mixed Model) analysiert. Das Konfidenzintervall betrug 95 %. Durch den Omnibus-Test wurde auf Unterschiede zwischen den Grundgesamtheiten (Gruppen) überprüft. Mehrfachvergleiche in Bezug auf einen Ausgangswert erfolgten mit Hilfe des Dunnett's Tests. Für die Korrelationsanalyse wurde bei normalverteilten Werten die Pearson-Korrelation und bei nicht normalverteilten Werten der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (R_s) verwendet. Die Durchführung des gepaarten Vergleiches der Proben erfolgte anhand der T-Tests für parametrische und der Wilcoxon-Tests für nichtparametrische Daten. Auch hier lag das Signifikanzniveau einheitlich bei 5 % ($p < 0,05$).

3.9 Validierung der Chemikalien, Geräte, Materialien und Software

Alle genutzten Chemikalien und Materialien entsprachen der vom Hersteller geprüften Qualität. Die Wartungen der Geräte wurden gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt und die Geräte regelmäßig auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. So lief beispielsweise vor jedem Gebrauch des Thermocyclers CFX 384 Touch Real-Time PCR Detection System eine Systemprüfung.

Als Richtlinien wurden die „ISO 20395:2019 Biotechnology - Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences - qPCR and dPCR“ herangezogen, welche auch die „MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PGCR Experiments“ (155) und die „CLSI Guidelines“ (Clinical and Laboratory Standards Institute) enthalten. Außerdem wurden die Standardvorgehensweisen des Labors der Sportmedizin eingehalten.

Um die Interassay-Variabilität (Diskrepanz der Messwerte unterschiedlicher PCR-Durchgänge) zu überwachen, wurden zwei Positivkontrollen bei jedem PCR-Durchgang zur Kalibrierung mitgemessen. Dieses Vorgehen führte zu einer genügenden Zuverlässigkeit (141, 157). Die Intraassay-Variabilität ergab sich aus der Überwachung der Diskrepanz unter den Messwerten innerhalb eines PCR-Durchganges. Die Wiederholbarkeit betrug $< 12\%$ (141). Eine ausreichende Sensitivität und Spezifität ließ sich durch die Verwendung eines Multilocus-Primers beziehungsweise durch die Schmelzkurvenanalyse erreichen.

4 Studien

4.1 Studiendesign/-ziele und Rekrutierungsmaßnahmen

Bei den nachfolgend beschriebenen Studien handelt es sich um Interventionsstudien. Durchgeführt wurden die Studien in Litauen von Herrn Prof. Marius Brazaitis (Lithuanian Sports University, Institute of Sports Science and Innovation, Department of Applied Biology and Rehabilitation).

Als Rekrutierungsmaßnahmen in Litauen wurden Informationsveranstaltungen bei Sportvereinen, Massensport- (Lauf- und Radwettbewerbe) und Wellnessveranstaltungen herangezogen. Die Rekrutierung weiterer Probanden erfolgte während Universitätsvorlesungen an der litauischen Universität für Gesundheitswissenschaften in Kaunas.

Ziele der Studien für diese Dissertation waren die Quantifizierung der cfDNA mittels qPCR im Zusammenhang mit verschiedenen physikalischen und psychischen Stresseinflüssen. Im Speziellen die Anwendung arbeitsmedizinisch relevanter Stresseinflüsse wie Schlafentzug, Hitze- und Kälteexposition sowie sportliche Aktivität.

4.2 Ein-/Ausschlusskriterien und Datenmanagement

In den Studien wurden ausschließlich freiwillige, gesunde Probanden eingeschlossen. Es erfolgte eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung und eine ärztliche Überwachung der Vitalparameter während der Studien. Nachfolgend sind die Einschlusskriterien der unterschiedlichen Studien beschrieben.

Die „Cooling H3“-Studie entspricht der „Intermittent acute whole-body cold immersion study“ (dt. intermittierende akute Ganzkörper-Kälteimmersionsstudie). Hierbei waren die Kriterien für die Aufnahme, genauso wie für die „Brief Cooling“-Studie (dt. Kurzzeit-Kältestudie) und die „Control“-Studie (dt. Kontrollstudie): das Alter von 18 bis 35 Jahren; keine übermäßigen sportlichen Aktivitäten, das heißt weniger als dreimal pro Woche; keine Beteiligung an einem Temperaturmanipulationsprogramm oder extreme Temperaturbelastung während der letzten 3 Monate; Nichtraucher und keine Einnahme von Medikamenten, die die natürliche Thermoregulation beeinträchtigen könnten.

Als Einschlusskriterien der „Sleep Deprivation“-Studie (dt. Schlafentzugsstudie) sollten die Teilnehmer körperlich aktiv ohne übermäßige sportliche Aktivitäten (weniger als dreimal pro Woche) sein, hatten eine normale oder korrigierte Sehschärfe und nahmen keine

psychotropen Substanzen oder andere Medikamente zu sich. Vor der Studie wurden die Probanden nicht an die Hitze gewöhnt. Innerhalb von 48 h vorher sollten die Probanden auf anstrengende Übungen und jeglichen Alkoholkonsum verzichten und bestenfalls 7-8 h in der Nacht schlafen. Während des Testtages sollten sie geistige und körperliche Arbeit, jegliche Lebensmittel und Getränke (außer Wasser) innerhalb von 4 h vor dem Test, sowie jegliches Essen und Trinken, während beider Studienversuche vermeiden.

In der „Drop Jump“-Studie (dt. Tief-Hoch-Sprung-Studie) beinhalteten die Einschlusskriterien: Männlich, Alter von 20 +/- 2 Jahren, Gewicht 84,4 +/- 11,2 kg, Größe 184 +/- 7,4 cm, Nichtraucher sowie keine übermäßigen sportlichen Aktivitäten, das heißt zwei- oder dreimal pro Woche. Auch hier wurden die Teilnehmer gebeten innerhalb von 72 h vorher auf anstrengende Übungen und jeglichen Alkoholkonsum zu verzichten. Während des Testtages sollten sie körperliche Arbeit, sowie jegliche Lebensmittel und Getränke (außer Wasser) innerhalb von 4 h vor dem Test vermeiden.

Für die „Wingate“-Studie wurden männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 25 Jahren, sowie im Alter von 63 bis 72 Jahren mit drei bis fünf Sporteinheiten pro Woche eingeschlossen. Die Probanden sollten gesund sein, keine kardiovaskulären, metabolischen oder muskuloskelettalen Erkrankungen, sowie Adipositas oder kognitive Einschränkungen aufweisen. Zudem sollten sie keine Medikamente einnehmen und keinen Alkohol, Nikotin oder Drogen konsumieren.

Die Ausschlusskriterien der Studien stimmten größtenteils überein und sind im Folgenden aufgeführt. Nicht eingeschlossen wurden Schwangere. Ohne Angaben von Gründen durften die Studienteilnehmer die betroffene Studie jederzeit abbrechen oder verlassen. Beim Auftreten von Nebenwirkungen wie beispielsweise Kühlung und / oder Erwärmung, sowie bei Nichteinhaltung der Anweisungen des Studienleiters, sollte die Untersuchung eingestellt werden. Bei Auftreten von Schwindel oder Übelkeit, während der körperlichen Anstrengung mit hoher Intensität, hätte ein überwachender Arzt eingreifen können. Bei der „Cooling H3-Studie“ wurden zudem explizit Personen mit Raynaud-Syndrom, Asthma, neurologischer Pathologie oder Erkrankungen, die sich durch Kaltwassereinwirkung verschlimmern könnten, ausgeschlossen. Für die „Drop Jump“-Studie galten als Ausschlusskriterien Medikamenteneinnahme, sowie neuromuskuläre oder kardiovaskuläre Erkrankungen.

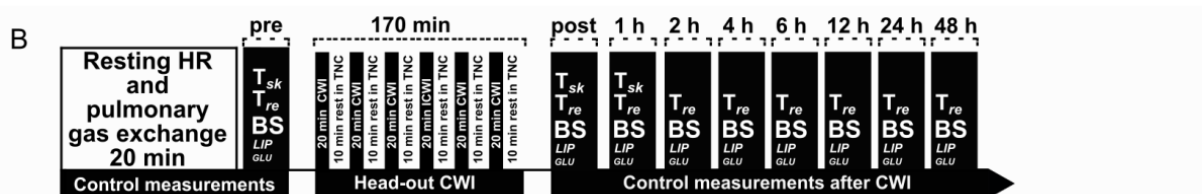
In Bezug auf das Datenmanagement wurden bestehende Gesetze, Vorschriften und Richtlinien beachtet und eingehalten. So wurden auch die letzte Fassung der Deklaration des Weltärztebundes über biomedizinische Forschung am Menschen, die Berufsordnung der deutschen Ärzte und das Datenschutzgesetz erfüllt. Eine Pseudonymisierung und Durchnummerierung erfolgte für die erhobenen Daten. Der Studienleiter in Litauen bewahrt

die Probandendaten, weitere Informationen inklusive Untersuchungsplan, Dokumentationen, Genehmigungen und alle anderen studienbezogenen Daten in einem geschützten Studiendokumentenordner auf. Hierüber ist auch eine Rückführung der Daten möglich.

4.3 Studienprotokoll „Cooling H3“

Der Name „Cooling H3“-Studie kommt aufgrund von etwa 3 h Kälteexposition zustande. Das Studienprotokoll beschreibt folgenden Ablauf: Hierbei wurden zehn Probanden vor dem Start gebeten, sich für 20 min hinzulegen und auszuruhen. Nachfolgend wurden Kontrollmessungen (Herzfrequenz, pulmonaler Gasaustausch, Haut- und Rektaltemperatur, Blutprobe („pre“) mit der Bestimmung von Lipiden und Glukose) durchgeführt. Danach begann die Intervention um etwa 7 Uhr morgens. Die Probanden wurden intermittierend 20 min lang 14° C kaltem Wasser, in halbliegender Position bis auf Höhe des Brustbeins, ausgesetzt. Nach jedem Durchlauf konnten sich die Probanden 10 min bei Raumtemperatur (23° C) ausruhen. Dieser Ablauf wiederholte sich insgesamt 170 min oder bis die Rektaltemperatur < 35,5° C sank. Direkt im Anschluss wurde die Temperatur erhoben und eine Blutprobe entnommen. Dies erfolgte erneut 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach der Intervention. Eine leichte Mahlzeit (beispielsweise warme Suppe und grüner Salat) wurde gegen 13 Uhr und 19 Uhr eingenommen. Den Studienablauf veranschaulicht Abbildung 4.1.

Intermittent acute whole-body cold immersion study



CWI - cold water (14°C) immersion; TNC – thermoneutral condition (23°C); Tre – rectal temperature; Tsk – skin temperature; HR – heart rate; BS – blood sample; LIP - lipids; Glu – glucose. Repeated bout (acute adaptation to cold) was performed one week after the first bout.

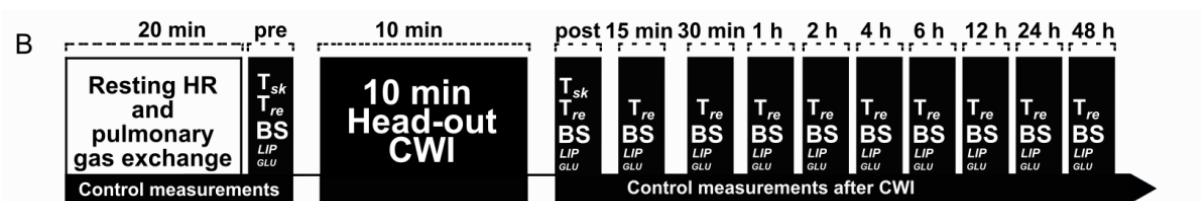
Abbildung 4.1: Studienprotokoll „Cooling H3“ (158)

Das Studienprotokoll der „Cooling H3“ zeigt schematisch die Zeitpunkte der Blutentnahmen (engl. BS = Blood sample) sowie die 170 min Intervention mit jeweils intermittierend 20 min im kalten Wasser und 10 min in Ruhe. Übersetzung der in der Abbildung verwendeten englischen Begriffe: „Control measurements“ (Kontrollmessungen), „Head-out“ (Kopf raus), „CWI = cold water immersion“ (Kaltwasserexposition), „thermoneutral condition“ (thermoneutrale Umgebung), „rectal temperature“ (Rektaltemperatur), „skin temperature“ (Hauttemperatur), „heart rate“ (Herzfrequenz).

4.4 Studienprotokoll „Brief Cooling“

Die Vorbereitungen und Kontrollmessungen der „Brief Cooling“-Studie gleichen der „Cooling H3“-Studie (s. Kapitel 4.3). Anschließend verharren die neun Probanden einmalig insgesamt 10 min am Stück im 14° C kalten Wasser (wieder halb liegend bis auf Höhe des Brustbeins). Nachfolgend wurden direkt im Anschluss an die Intervention die Kontrollmessungen (Haut- und Rektaltemperatur, Blutprobe) erhoben. Diese wiederholten sich 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach der Intervention. Eine leichte Mahlzeit (beispielsweise warme Suppe und grüner Salat) wurde gegen 13 Uhr und 19 Uhr eingenommen. Bildlich erklärt Abbildung 4.2 das Studienprotokoll.

Brief (10 min) acute whole-body cold immersion study



CWI - cold water (14°C) immersion; T_{re} – rectal temperature; T_{sk} – skin temperature; HR – heart rate; BS – blood sample; LIP - lipids; GLU – glucose.

Abbildung 4.2: Studienprotokoll „Brief Cooling“ (158)

Wie bereits bei der „Cooling H3“-Studie veranschaulicht das Protokoll ebenfalls die Zeitpunkte der Blutproben (engl. BS = Blood sample) sowie die 10-min-Intervention im kalten Wasser. Übersetzung der in der Abbildung verwendeten englischen Begriffe: „Control measurements“ (Kontrollmessungen), „Head-out“ (Kopf raus), „CWI = cold water immersion“ (Kaltwasserexposition), „rectal temperature“ (Rektaltemperatur), „skin temperature“ (Hauttemperatur), „heart rate“ (Herzfrequenz).

4.5 Studienprotokoll „Control“

Die Kontrollgruppe (engl. „Control“) zu den Kältestudien aus Litauen beinhaltete neun Probanden ohne Intervention zur gleichen Uhrzeit. Die Messzeitpunkte wurden wie folgt bezeichnet: davor, danach, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h danach. Auch hier fand die Einnahme einer leichten Mahlzeit (beispielsweise warme Suppe und grüner Salat) gegen 13 Uhr und 19 Uhr statt.

4.6 Studienprotokoll „Sleep Deprivation“

Die „Sleep Deprivation“-Studie beinhaltete sechs verschiedene Interventionsprogramme, welche den acht Probanden randomisiert zugeteilt wurden. Probanden eins bis fünf durchliefen alle sechs Interventionsprogramme.

Nachfolgend werden als „mentale Arbeit“ kognitive Aufgaben mit sieben Sitzungen je 50 min mentaler Tests sowie 10 min Pause beschrieben. Korrespondierend zur mentalen Arbeit hatten andere Interventionen stattdessen einen „regulären Tag“. Der Begriff „Sauna“ repräsentiert insgesamt vier Saunadurchgänge einer finnischen Sauna (80°-90° C, relative Luftfeuchtigkeit von 30 %), dazwischen konnten die Probanden 15 min in thermoneutraler Umgebung ausruhen. Der erste Durchgang war 15 min lang, die darauffolgenden drei dauerten jeweils 10 min. Korrespondierend zur Sauna hatten andere Interventionen stattdessen „Erholung“ in einer thermoneutralen Umgebung.

Die Blutproben wurden jeweils zu drei Zeitpunkten entnommen: am Morgen, nach der mentalen Arbeit beziehungsweise dem regulären Tag sowie am Abend nach der Sauna beziehungsweise der Erholung. Der Beobachtungszeitraum endete am Morgen des dritten Tages nach der Blutentnahme.

Bei der Bedingung 1 hatten die Probanden einen regulären Tag, Erholung (keine Sauna) und konnten in der ersten und zweiten Nacht jeweils 8 h schlafen. Bedingung 2 unterschied sich nur darin, dass die Probanden anstatt Erholung abends in die Sauna gingen. Für Bedingung 3 absolvierten die Probanden tagsüber mentale Arbeit, hatten Erholung und 4 h bis 5 h Schlaf in der ersten Nacht sowie 8 h Schlaf in der zweiten Nacht. Bedingung 4 war das Gleiche wie Bedingung 3, nur dass hier wieder anstatt Erholung in die Sauna gegangen wurde. Demgegenüber stand Bedingung 5, wobei die Probanden tagsüber und nachts mentale Arbeit verrichten mussten und in der ersten Nacht überhaupt nicht schlafen durften (Schlafentzug 40-42 h). In der zweiten Nacht konnten sie 8 h schlafen. Vor den Nächten war Erholung vorgesehen. Bei der Bedingung 6 unterlagen die Probanden demselben Prozedere wie bei Bedingung 5, nur dass an beiden Abenden anstatt Erholung wieder Sauna auf dem Programm stand. Zusammenfassend verdeutlicht Abbildung 4.3 die verschiedenen Bedingungen.

		1st day					Night	2nd day					Night	3rd day
Total sleep deprivation	BS	Mental Work	BS	REST	BS	0 h sleep	BS	Mental Work	BS	REST	BS	8h sleep	BS	
	BS	Mental Work	BS	SAUNA	BS	0 h sleep	BS	Mental Work	BS	SAUNA	BS	8h sleep	BS	
Partial sleep deprivation	BS	Mental Work	BS	REST	BS	4-5 h sleep	BS	Mental Work	BS	REST	BS	8h sleep	BS	
	BS	Mental Work	BS	SAUNA	BS	4-5 h sleep	BS	Mental Work	BS	SAUNA	BS	8h sleep	BS	
8 hours sleep	BS	regular day	BS	REST	BS	8 h sleep	BS	regular day	BS	REST	BS	8h sleep	BS	
	BS	regular day	BS	SAUNA	BS	8 h sleep	BS	regular day	BS	SAUNA	BS	8h sleep	BS	

Abbildung 4.3: Studienprotokoll „Sleep Deprivation“ (158)

Das Schaubild über die „Sleep Deprivation“-Studie stellt die verschiedenen Bedingungen in horizontaler Abfolge dar. Zu sehen ist, wann die Blutproben (engl. BS = Blood sample) genommen wurden und wie die unterschiedlichen Abschnitte mit mentaler Arbeit oder einem regulären Tag, Erholung bzw. Sauna sowie die Anzahl an Stunden Schlaf aufgeteilt wurden. Paarweise Bedingungen von unten nach oben: 1= 8 h Schlaf, keine Sauna, keine mentale Arbeit; 2= 8 h Schlaf, mit Sauna, keine mentale Arbeit; 3= 4 h bis 5 h Schlaf, keine Sauna, mit mentaler Arbeit; 4= 4 h bis 5 h Schlaf, mit Sauna, mit mentaler Arbeit; 5= 0 h Schlaf, keine Sauna, mit mentaler Arbeit; 6= 0 h Schlaf, mit Sauna, mit mentaler Arbeit. Übersetzung der in der Abbildung verwendeten englischen Begriffe: „Total sleep deprivation“ (totaler Schlafentzug), „Partial sleep deprivation“ (partieller Schlafentzug), „8 hours sleep“ (8 Stunden Schlaf), „Mental work“ (mentale Arbeit), „regular day“ (regulärer Tag), „Night“ (Nacht).

4.7 Studienprotokoll „Drop Jump“

Drei Tage vor Beginn der „Drop Jump“-Studie gab es für die 14 Probanden eine Eingewöhnungseinheit der Tief-Hoch-Sprünge. Ein „Drop Jump“ wurde dabei aus 0,5 m Höhe begonnen und von einem Tief- in einen Hochsprung umgewandelt. Das rechte Bein wurde getestet. Dabei sollte der Kniewinkel nicht < 90° werden. Der Bodenkontakt sollte möglichst kurz sein und die Hände sollten an der Hüfte gehalten werden. Am Anfang der Studie gab es Kontrollmessungen, nachdem die Probanden 10 min Ruhezeit hatten. Anschließend erfolgte eine 8–10-minütige Aufwärmphase auf dem Fahrradergometer. Die Intervention beinhaltete 50 Drop Jumps mit jeweils einem 20-s-Intervall zwischen den Sprüngen. Bei dieser Studie wurden die Blutproben 15 min vor und unmittelbar vor der Intervention sowie direkt im Anschluss, 5 min, 45 min, 90 min, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h danach entnommen. Abbildung 4.4 zeigt das „Drop Jump“-Protokoll.

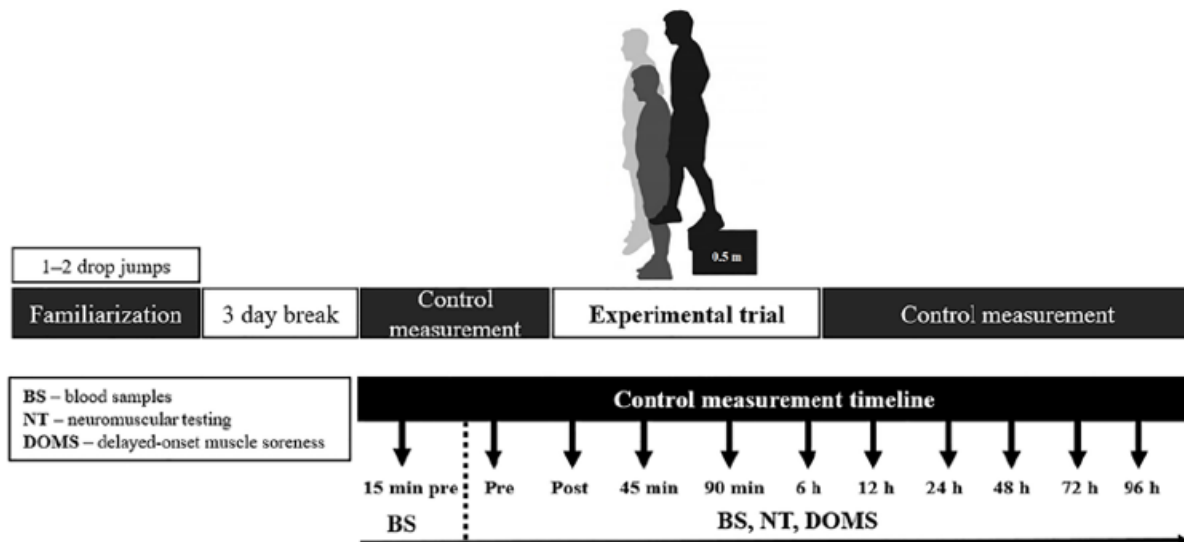


Abbildung 4.4: Studienprotokoll „Drop Jump“ (159)

Das Schaubild veranschaulicht die Abfolge des Studienprotokolls. Die 50 Drop Jumps erfolgten aus 0,5 m Höhe und hatten ein 30-s-Intervall zwischen den Sprüngen. Durch die Zeitachse werden die Zeitpunkte der Blutentnahmen verdeutlicht. Übersetzung der in der Abbildung verwendeten englischen Begriffe: „BS = Blood sample“ (Blutprobe), „Familiarization“ (Kennenlernen), „3 day break“ (3 Tage Pause), „Control measurement“ (Kontrollmessung), „Experimental trial“ (experimenteller Versuch), „Control measurement timeline“ (Zeitlinie der Kontrollmessung).

4.8 Studienprotokoll „Wingate“

Einen Zeitraum von 3 Wochen umfasste die „Wingate“-Studie. Hierbei leisteten zehn jüngere Probanden (20 bis 25 Jahre) sowie neun ältere Probanden (63 bis 72 Jahre) jeweils drei Trainingseinheiten pro Woche (insgesamt neun Einheiten). Als Aufwärmprogramm wurde 10 min auf dem Fahrradergometer bei einer individuellen Wattzahl in Bezug auf den Body-Mass-Index bei 70–80 Umdrehungen pro Minute gefahren. Während der ersten Trainingseinheit sollten die Probanden sechsmal 30 s möglichst intensiv auf dem Fahrradergometer fahren. In der zweiten und dritten Trainingseinheit absolvierten die Probanden viermal 30 s Belastungsintervalle. Bei den Trainingseinheiten 4-6 umfasste die Belastung fünfmal 30 s und bei den letzten drei Einheiten wieder sechsmal 30 s. Die Erholung zwischen den Intervallen betrug jeweils 4 min. Diese Trainingsform gehört zum hochintensiven Intervalltraining (HIIT). Blutentnahmen erfolgten vor und nach der ersten Trainingseinheit sowie vor und nach der letzten. Das „Wingate“-Protokoll wird in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Studienprotokoll „Wingate“

Die Tabelle zeigt die Zeitpunkte der jeweiligen Einheit sowie die Anzahl der Belastungsintervalle und Blutentnahmen. Die Pause zwischen den einzelnen Belastungsintervallen betrug 4 min.

Wingate Protokoll

	1. Woche		1. Woche	1. Woche	2. Woche	2. Woche	2. Woche	3. Woche	3. Woche	3. Woche		
BS	1. Einheit 6x 30 s	BS	2. Einheit 4x 30 s	3. Einheit 4x 30 s	4. Einheit 5x 30 s	5. Einheit 5x 30 s	6. Einheit 5x 30 s	7. Einheit 5x 30 s	8. Einheit 6x 30 s	BS	9. Einheit 6x 30 s	BS

Pause je Intervall = 4 min

BS = Blood sample = Blutprobe

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung Abkratzmethode tiefgefrorener Proben

Wie bereits eingehend erwähnt wurde, sollte mit der Abkratzmethode tiefgefrorener Proben eine Verschwendung von cfDNA-Proben vermieden werden. Zunächst ergab die angelegte Versuchsreihe zur Bestimmung der Zeit für die Reinigung und Trocknung des benötigten scharfen Löffels 30 s bei 100 % Ethanol und über 2 min bei DNA-Away, was zu lange für eine schnelle Verarbeitung dauerte. Deshalb entstand folgendes Protokoll:

Zuerst beschriften von 500 µl Eppendorf-Tubes und bereitstellen in 200 µl Eppendorf-Tube-Racks. 1 bis 5 tiefgefrorene Proben auf Eis lagern und tief eindrücken. Hiervon eine Probe in Alufolie wickeln, damit sie nicht von der Körperwärme der Finger auftaut. Mit einem kleinen, scharfen Löffel etwa eine Löffelfüllung (mindestens etwa 5 µl) abkratzen und in das beschriftete 500-µl-Eppendorf-Tube füllen. Die tiefgefrorene Probe direkt wieder in das Eis drücken sowie die entnommene, geschmolzene Probe mit der Tischzentrifuge zentrifugieren und ebenfalls auf Eis lagern. Den benutzten scharfen Löffel zunächst mit 70 % Ethanol über einem Becherglas abspritzen, um eine mechanische Reinigung zu erzielen. Anschließend den scharfen Löffel etwa 3 s in einem 50-ml-Falcon-Tube mit DNA-Away schwenken, dann schwungvoll einmalig ausschütteln und danach in einem 50-ml-Falcon-Tube mit 100 % Ethanol schwenken. Nochmals einmalig ausschütteln und 30 s vor Wiederverwendung an der Luft trocknen lassen.

Bei der Untersuchung zwischen einer oberflächlich abgekratzten Plasmaprobe und einer aufgetauten Plasmaprobe ergab sich bei den Proben der Probanden DJ 5 und DJ 2 aus der „Drop Jump“-Studie kein Unterschied. Insgesamt wurden die Daten dekadisch mit der Basis von 10 logarithmiert und mit Hilfe des 90-bp-Primers gemessen. Die Werte von DJ 2 waren nicht normalverteilt, da der Shapiro-Wilk-Test p-Werte von $< 0,05$ ergab. Somit wurde hier der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (R_s) angewandt, welcher $R_s = 0,915$ betrug und einem starken Effekt entsprach. Das Signifikanzniveau lag hierbei sogar bei $< 0,001$. Beim gepaarten Vergleich ergab sich mit einem p-Wert von $> 0,05$ kein statistisch signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test (s. Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Zusammenfassende Statistik Probe DJ 2 Vgl. Gekratzt/Aufgetaut

In dieser Tabelle ist eine zusammenfassende Statistik des Drop-Jump-Probanden 2 beschrieben, in der abgekratzte und aufgetaute Proben verglichen werden. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Der Shapiro-Wilk-Test hatte bei beiden Bedingungen „aufgetaut“ bzw. „gekratz“ jeweils einen p-Wert von $< 0,05$ ergeben, die Daten waren damit nicht normalverteilt. Der dafür verwendete Spearman-Rangkorrelationskoeffizient betrug $R_s = 0,915$, was einem starken Effekt entsprach. Beim Wilcoxon-Test ergab sich mit einem p-Wert von $> 0,05$ kein statistisch signifikanter Unterschied.

Descriptives

	Bedingung	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng_ml_90bp	aufgetaut	10	0	1.98	1.76	0.691	1.34	3.25	0.842	0.046
	gekratz	10	0	1.95	1.74	0.729	1.35	3.31	0.801	0.015

Correlation Matrix

		LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut
LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	Spearman's rho	—	—
	p-value	—	—
	N	—	—
LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut	Spearman's rho	0.915***	—
	p-value	< .001	—
	N	10	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Paired Samples T-Test

			Statistic	p
LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut	Wilcoxon W	17.0	0.322

Der Boxplot sowie die Gegenüberstellung im Streudiagramm veranschaulichen die Daten der abgekratzten und aufgetauten Proben im Vergleich (s. Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2).

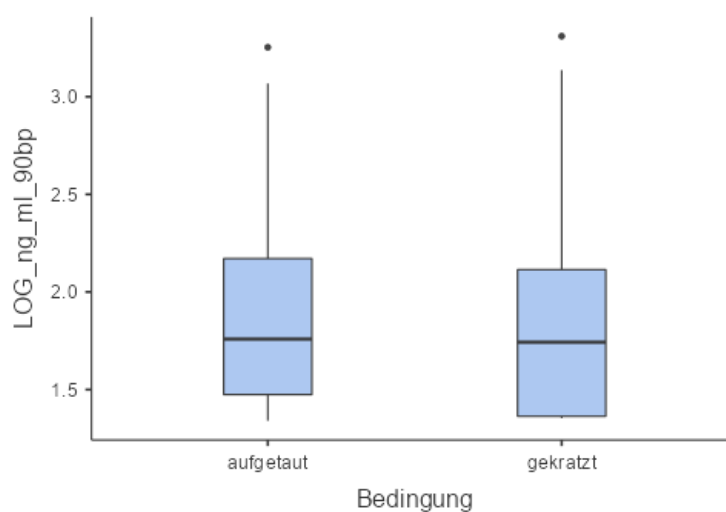


Abbildung 5.1: Boxplot Drop Jump DJ 2 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut

Abgebildet sind zwei Boxplots des Probanden 2 der „Drop Jump“-Studie im Vergleich zwischen „aufgetaut“ und „gekratz“. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen.

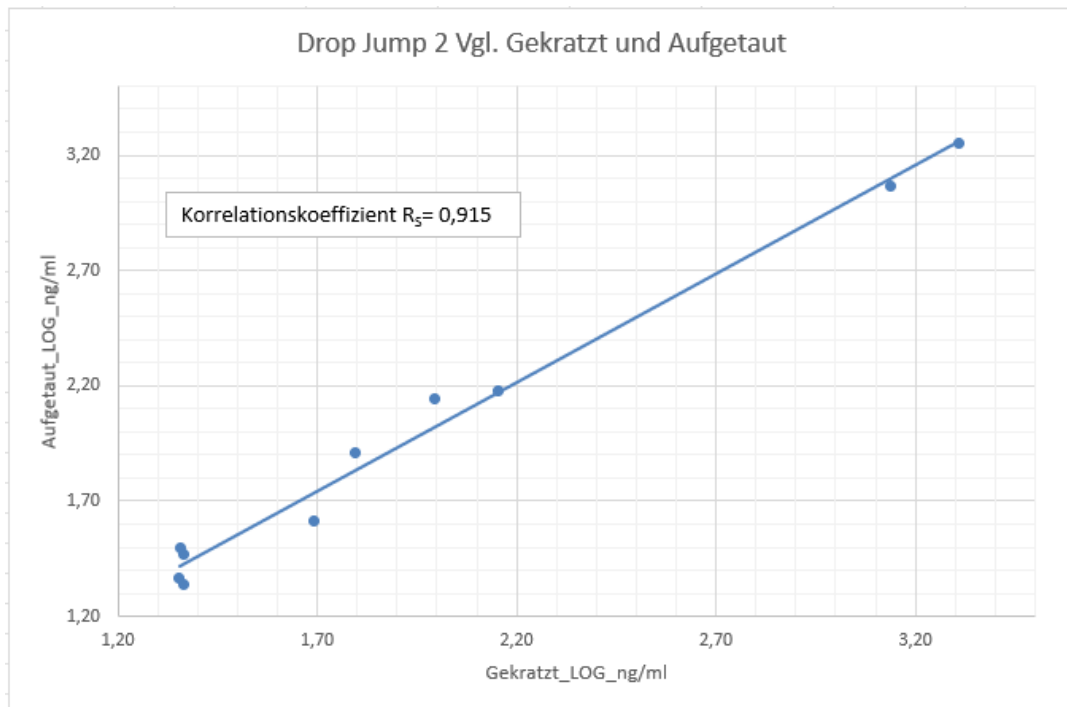


Abbildung 5.2: Streudiagramm Drop Jump DJ 2 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut

Gegenübergestellt sind hier die Drop-Jump-Proben von Proband 2 im Vergleich zwischen „gekratzt“ und „aufgetaut“. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient betrug $R_s = 0,915$, was einem starken Effekt entsprach.

Im Gegensatz dazu waren die Werte von Proband DJ 5 normalverteilt, der Shapiro-Wilk-Test ergab p-Werte von $> 0,05$. Somit konnte hier der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet werden, welcher $R = 0,856$ betrug und eine sehr hohe Korrelation bedeutet. Auch hierbei war das Signifikanzniveau sogar bei $< 0,001$. Beim gepaarten Vergleich ergab sich mit einem p-Wert von $> 0,05$ kein statistisch signifikanter Unterschied im T-Test (s. Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Zusammenfassende Statistik Probe DJ 5 Vgl. Gekratzt/Aufgetaut

Hier ist eine zusammenfassende Statistik des Drop-Jump-Probanden 5 im Vergleich zwischen „gekratzt“ und „aufgetaut“ zu sehen. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Der Shapiro-Wilk-Test hatte bei beiden Bedingungen „aufgetaut“ bzw. „gekratzt“ jeweils einen p-Wert von > 0,05, womit die Daten normalverteilt waren. Der dafür verwendete Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $R = 0,856$, was einer sehr hohen Korrelation entsprach. Der gepaarte T-Test konnte angewandt werden, welcher mit einem p-Wert von > 0,05 keinen statistisch signifikanten Unterschied ergab.

Descriptives

	Bedingung	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng_ml_90bp	aufgetaut	12	0	1.26	1.20	0.442	0.720	2.25	0.920	0.288
	gekratzt	12	0	1.34	1.37	0.367	0.853	2.03	0.955	0.711

Correlation Matrix

		LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut
LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	Pearson's r	—	—
	p-value	—	—
	N	—	—
LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut	Pearson's r	0.856***	—
	p-value	< .001	—
	N	12	—

Note. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Paired Samples T-Test

			statistic	df	p
LOG_ng_ml_90bp_Gekratzt	LOG_ng_ml_90bp_Aufgetaut	Student's t	1.28	11.0	0.227

Zur grafischen Darstellung dienen wieder der Boxplot sowie die Gegenüberstellung im Streudiagramm (s. Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4).

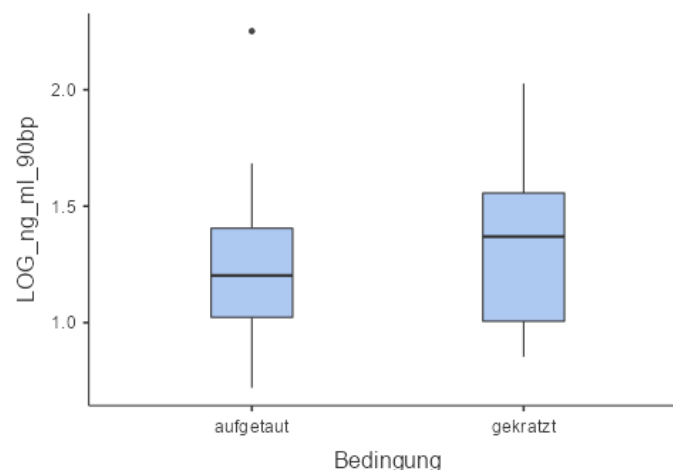


Abbildung 5.3: Boxplot Drop Jump DJ 5 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut

Zu sehen sind zwei Boxplots des Probanden 5 der „Drop Jump“-Studie im Vergleich zwischen „aufgetaut“ und „gekratzt“. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen.

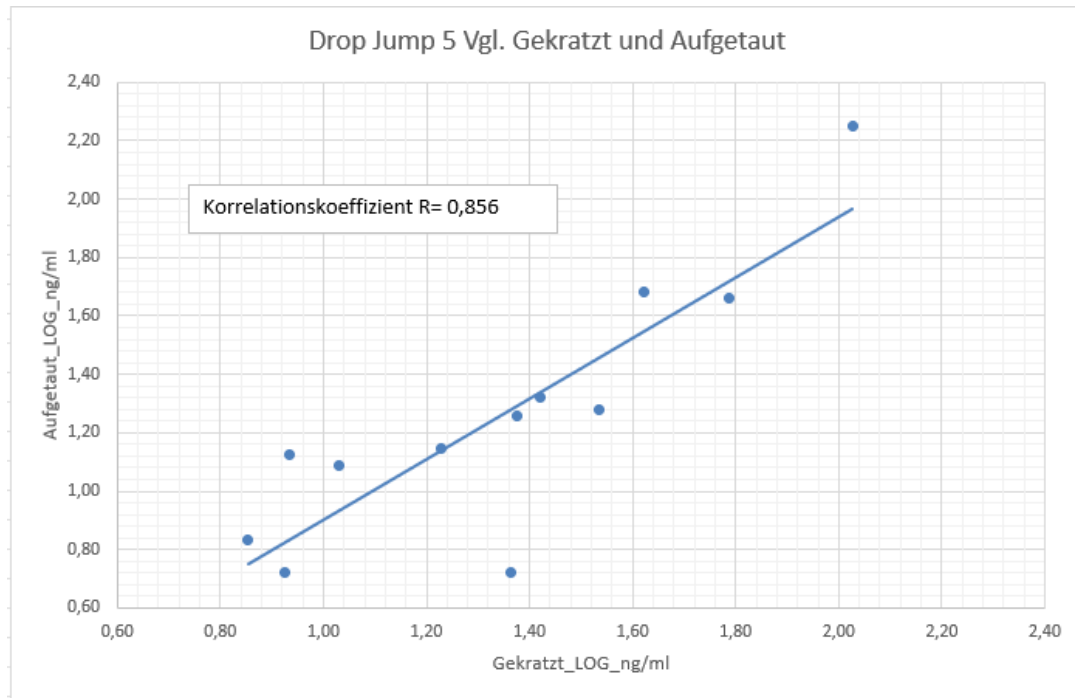


Abbildung 5.4: Streudiagramm Drop Jump DJ 5 Vgl. Gekratzt / Aufgetaut

Dargestellt sind hier die Drop-Jump-Proben von Proband 5 im Vergleich zwischen „gekratzt“ und „aufgetaut“. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $R = 0,856$, was einer sehr hohen Korrelation entsprach.

Bei der Überprüfung des Einflusses der Abkratzhöhe innerhalb eines Eppendorf-Tubes beziehungsweise eines Falcon-Tubes auf die Messung einer Plasmaprobe mit dem 90-bp-Primer konnte ebenfalls mit einem p-Wert von $> 0,05$ kein Unterschied zwischen den beiden Verdünnungen 1 und 2 festgestellt werden. Die Daten wurden ebenfalls dekadisch mit der Basis von 10 logarithmiert und mit Hilfe des 90 bp Primers gemessen. Die aus der Eppendorf-Tube stammende Plasmaprobe von „D“ hatte bei der Verdünnungsreihe 2 in der Abkratzhöhe „c“ (in der Mitte) und „e“ (ganz unten) eine Fehlmessung mit einer Abweichung von $> 0,4$ Cq von der Standardabweichung. Es wurde jedoch beschlossen, die beiden Ausreißer in die Analyse einzubeziehen, da sich beim Shapiro-Wilk-Test das Signifikanzniveau nicht änderte und die p-Werte weiterhin mit $> 0,05$ eine Normalverteilung anzeigten. Zudem variierte der Pearson-Korrelationskoeffizient mit seiner sehr hohen Korrelation von $R = 0,8507$ (mit Ausreißer) auf $R = 0,8802$ (ohne Ausreißer) nur marginal. Im gepaarten Vergleich der Proben konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beim T-Test festgestellt werden, die p-Werte blieben bei $> 0,05$ (s. Tabelle 5.3 und Tabelle 5.4).

Tabelle 5.3: Zusammenfassende Statistik Probe „D“ mit Ausreißer

Dargestellt ist die zusammenfassende Statistik der Probe „D“ inklusive der Ausreißer sowie die Verdünnung 1 (= 1) und Verdünnung 2 (= 2). Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Die p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests betragen > 0,05 und entsprachen somit der Normalverteilung. Im gepaarten T-Test ergab sich mit einem p-Wert von > 0,05 kein statistisch signifikanter Unterschied.

Descriptives									
	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
								W	p
LOG ng/ml (1)	5	0	1.37	1.35	0.0382	1.34	1.42	0.849	0.192
LOG ng/ml (2)	5	0	1.39	1.37	0.0700	1.32	1.51	0.859	0.225

Paired Samples T-Test					
			statistic	df	p
LOG ng/ml (1)	LOG ng/ml (2)	Student's t	-0.922	4.00	0.409

Tabelle 5.4: Zusammenfassende Statistik Probe „D“ ohne Ausreißer

Zu sehen ist die zusammenfassende Statistik der Probe „D“ ohne die Ausreißer sowie die Verdünnung 1 (= 1) und Verdünnung 2 (= 2). Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Die p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests betragen weiterhin > 0,05 und entsprachen weiterhin der Normalverteilung. Auch beim gepaarten T-Test ergab sich weiterhin kein statistisch signifikanter Unterschied.

Descriptives									
	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
								W	p
LOG ng/ml (1)	3	0	1.39	1.40	0.0445	1.34	1.42	0.916	0.437
LOG ng/ml (2)	3	0	1.40	1.38	0.0959	1.32	1.51	0.973	0.686

Paired Samples T-Test					
			statistic	df	p
LOG ng/ml (1)	LOG ng/ml (2)	Student's t	-0.417	2.00	0.717

Im Balkendiagramm wurden die Verdünnungen 1 und 2 je nach Abkratzhöhe im Vergleich bildlich dargestellt (s. Abbildung 5.5).

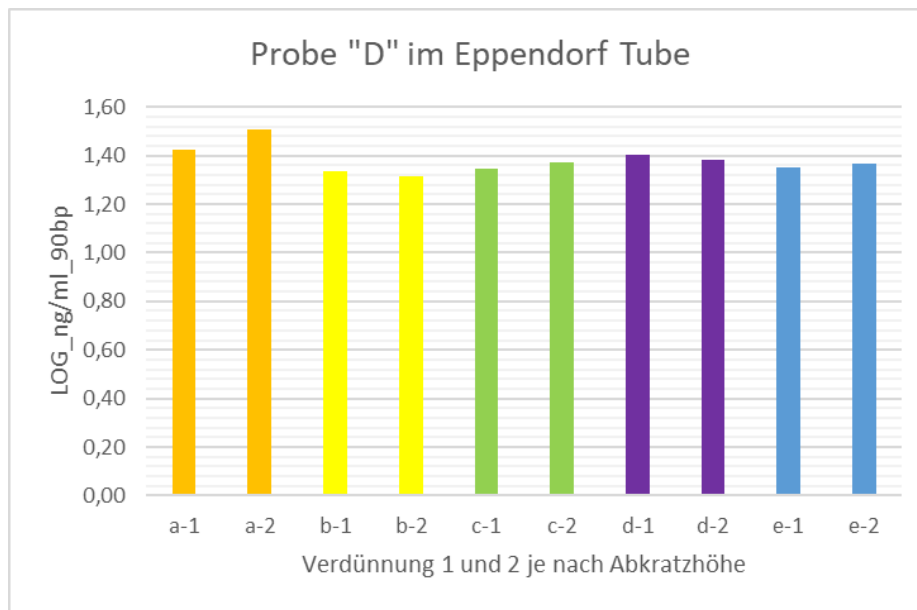


Abbildung 5.5: Balkendiagramm Einfluss der Abkratzhöhe im Eppendorf-Tubes

Abgebildet ist das Balkendiagramm zum Einfluss der Abkratzhöhe innerhalb eines Eppendorf-Tubes. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Farblich verglichen sind die gepaarten Verdünnungen 1 und 2 je nach Abkratzhöhe (a = ganz oben, b = 25 % unterhalb, c = in der Mitte sowie d = 75 % unterhalb der Oberfläche und e = ganz unten).

Bei der schräg eingefrorenen Plasmaprobe aus dem Falcon-Tube von Proband 11 der „Fahrrad-Exosomen“-Studie wies der Shapiro-Wilk-Test mit p-Werten von $> 0,05$ auf eine Normalverteilung hin. Im gepaarten Vergleich der Proben konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beim T-Test festgestellt werden, die p-Werte zeigten $> 0,05$ an (s. Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Zusammenfassende Statistik Probe Proband 11

Beschrieben ist die zusammenfassende Statistik der Probe von Proband 11 sowie die Verdünnung 1 (= 1) und Verdünnung 2 (= 2), gemessen in LOG ng/ml. Die p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests betragen $> 0,05$ und zeigten somit eine Normalverteilung an. Im gepaarten T-Test ergab sich mit einem p-Wert von $> 0,05$ kein statistisch signifikanter Unterschied.

Descriptives

	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
								W	p
LOG ng/ml (1)	5	0	1,77	1,77	0,0650	1,69	1,85	0,958	0,794
LOG ng/ml (2)	5	0	1,78	1,79	0,0379	1,73	1,82	0,935	0,631

Paired Samples T-Test

			statistic	df	p
LOG ng/ml (1)	LOG ng/ml (2)	Student's t	-0,180	4,00	0,866

Veranschaulicht wurden die gepaarten Vergleiche im Balkendiagramm (s. Abbildung 5.6).

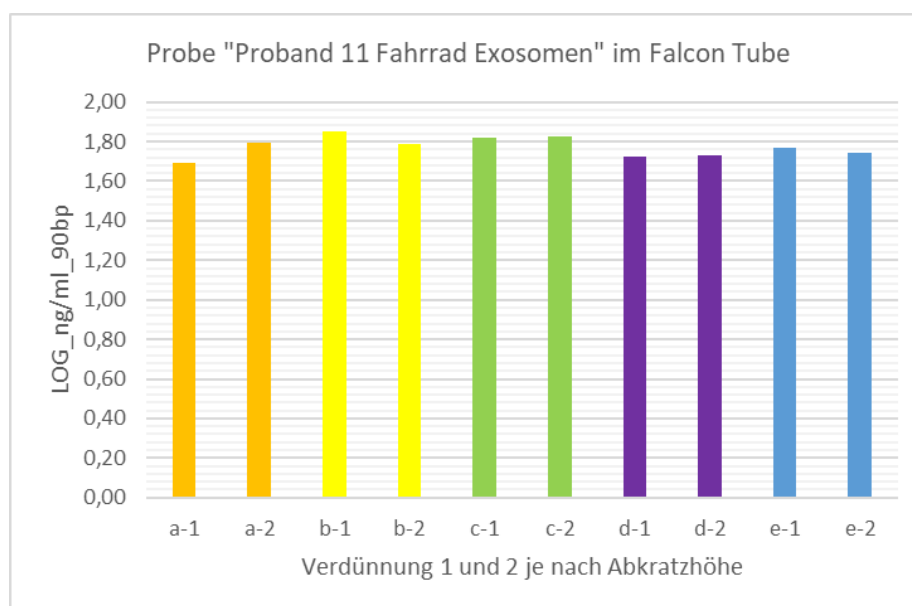


Abbildung 5.6: Balkendiagramm Einfluss der Abkratzhöhe im Falcon-Tubes

Abgebildet ist das Balkendiagramm zum Einfluss der Abkratzhöhe innerhalb eines Falcon-Tubes. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Farblich verglichen sind die gepaarten Verdünnungen 1 und 2 je nach Abkratzhöhe (a = ganz oben, b = 25 % unterhalb, c = in der Mitte sowie d = 75 % unterhalb der Oberfläche und e = ganz unten).

5.2 Vergleich Verwendung von Blutplasma und Blutserum

Blutplasma enthält im Gegensatz zum Blutserum noch die Gerinnungsfaktoren. Ein Vergleich zwischen Blutplasma und Blutserum wurde mit Hilfe von Kontrollproben der Kältestudien aus Litauen ermittelt. Eine dekadische Logarithmierung der cfDNA-Werte erfolgte mit der Basis von 10 und anschließend wurde die Messung mit Hilfe des 90-bp-Primers beziehungsweise 222-bp-Primers durchgeführt. Für die statistische Analyse kam ein gemischtes Modell (engl. „Mixed Model“) zum Einsatz, mit Zeitpunkt als Faktor und Proband als Clustervariable. Die Festlegung des Signifikanzniveaus erfolgte auf 5 %. Der Omnibus-Test zeigte mit einem p-Wert von $> 0,05$, dass es keinen Unterschied beim 90-bp-Plasma beziehungsweise beim 222-bp-Plasma gab. Dies war zu erwarten, da es die Kontrollgruppe war (s. Tabelle 5.6 und Tabelle 5.7).

Tabelle 5.6: Modellergebnisse „Control“-Studie 90 bp Blutplasma

Die Tabelle fasst die Modellergebnisse der „Control“-Studie, gemessen im Blutplasma mit dem 90-bp-Primer für den Omnibus-Test und Dunnett's Test zusammen. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von $> 0,05$ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	0.801	8	40.0	0.605

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.11500	0.0479	1.0212	1.209	5.00	23.2980	<.001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.08393	0.1010	-0.1141	0.282	40.00	0.8306	0.411
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.00551	0.1010	-0.2036	0.193	40.00	-0.0545	0.957
Zeitpunkt3	4 - 1	0.15177	0.1010	-0.0463	0.350	40.00	1.5020	0.141
Zeitpunkt4	5 - 1	0.08263	0.1010	-0.1154	0.281	40.00	0.8178	0.418
Zeitpunkt5	6 - 1	0.12535	0.1010	-0.0727	0.323	40.00	1.2406	0.222
Zeitpunkt6	7 - 1	-0.00801	0.1010	-0.2061	0.190	40.00	-0.0793	0.937
Zeitpunkt7	8 - 1	0.08418	0.1010	-0.1139	0.282	40.00	0.8332	0.410
Zeitpunkt8	9 - 1	0.14630	0.1010	-0.0517	0.344	40.00	1.4479	0.155

Tabelle 5.7: Modellergebnisse „Control“-Studie 222 bp Blutplasma

In der Tabelle sind die Modellergebnisse der „Control“-Studie, gemessen im Blutplasma mit dem 222-bp-Primer für den Omnibus-Test und Dunnett's Test, zu sehen. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von $> 0,05$ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	0.830	8	45.0	0.581

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	0.65145	0.0428	0.568	0.735	45.0	15.2291	<.001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.19825	0.1815	-0.157	0.554	45.0	1.0924	0.280
Zeitpunkt2	3 - 1	0.14385	0.1815	-0.212	0.500	45.0	0.7926	0.432
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.08006	0.1815	-0.436	0.276	45.0	-0.4412	0.661
Zeitpunkt4	5 - 1	0.19653	0.1815	-0.159	0.552	45.0	1.0829	0.285
Zeitpunkt5	6 - 1	0.22910	0.1815	-0.127	0.585	45.0	1.2624	0.213
Zeitpunkt6	7 - 1	-0.03977	0.1815	-0.395	0.316	45.0	-0.2191	0.828
Zeitpunkt7	8 - 1	-0.00924	0.1815	-0.365	0.346	45.0	-0.0509	0.960
Zeitpunkt8	9 - 1	0.04323	0.1815	-0.312	0.399	45.0	0.2382	0.813

Im Omnibus-Test wurde mit einem p-Wert von $> 0,05$ ebenfalls kein Unterschied beim 90-bp-Serum festgestellt. Dies war genauso zu erwarten, da es die Kontrollgruppe war. Lediglich beim 222-bp-Serum ergab sich in den Zeitpunkten mit einem p-Wert von $< 0,05$ ein Unterschied. Genauer betrachtet wurden im Dunnett's Test und dem Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte mit dem Ausgangszeitpunkt 1 („davor“) signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von $< 0,05$ bei der Messung mit dem 90-bp-Primer im Serum beim Zeitpunkt 7 („12 h danach“), sowie bei der Messung mit dem 222-bp-Primer im Serum beim Zeitpunkt 6 („6 h danach“) und Zeitpunkt 7 („12 h danach“) gesehen. Diese Zeitpunkte entsprachen Messungen nach dem Mittag- beziehungsweise Abendessen und lassen spekulieren, dass nur das Blutserum beziehungsweise eher die längeren 222 bp cfDNA-Fragmente aufgrund einer Mahlzeit frei wurden und erhöht waren (s. Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9).

Tabelle 5.8: Modellergebnisse „Control“-Studie 90 bp Blutserum

Die Tabelle beschreibt die Modellergebnisse der „Control“-Studie, gemessen im Blutserum mit dem 90-bp-Primer für den Omnibus-Test und Dunnett's Test. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von $> 0,05$ zeigten sich bis auf den Vergleich mit dem Ausgangszeitpunkt 1 und Zeitpunkt 7 keine signifikanten Unterschiede. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	1.64	8	62.0	0.132

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.6894	0.104	1.4861	1.893	7.97	16.293	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0364	0.142	-0.2428	0.316	62.07	0.256	0.799
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.0264	0.138	-0.2964	0.244	61.97	-0.192	0.849
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.0183	0.142	-0.2975	0.261	62.07	-0.129	0.898
Zeitpunkt4	5 - 1	0.2320	0.138	-0.0379	0.502	61.97	1.685	0.097
Zeitpunkt5	6 - 1	0.2133	0.138	-0.0566	0.483	61.97	1.549	0.126
Zeitpunkt6	7 - 1	0.3153	0.138	0.0453	0.585	61.97	2.289	0.026
Zeitpunkt7	8 - 1	0.0323	0.138	-0.2377	0.302	61.97	0.234	0.816
Zeitpunkt8	9 - 1	0.1403	0.138	-0.1296	0.410	61.97	1.019	0.312

Tabelle 5.9: Modellergebnisse „Control“-Studie 222 bp Blutserum

Die Tabelle fasst die Modellergebnisse der „Control“-Studie, gemessen im Blutserum mit dem 222-bp-Primer, für den Omnibus-Test und Dunnett's Test zusammen. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von $< 0,05$ ergaben sich im Vergleich mit dem Ausgangszeitpunkt 1 und Zeitpunkt 6 bzw. 7 signifikante Unterschiede. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	2.62	8	62.0	0.015

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	0.9942	0.0974	0.8032	1.185	7.93	10.204	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	-0.0384	0.1448	-0.3222	0.245	62.05	-0.265	0.792
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.0639	0.1400	-0.3383	0.211	61.94	-0.456	0.650
Zeitpunkt3	4 - 1	0.0527	0.1448	-0.2312	0.337	62.05	0.364	0.717
Zeitpunkt4	5 - 1	0.2280	0.1400	-0.0464	0.503	61.94	1.628	0.109
Zeitpunkt5	6 - 1	0.3103	0.1400	0.0359	0.585	61.94	2.216	0.030
Zeitpunkt6	7 - 1	0.3127	0.1400	0.0383	0.587	61.94	2.233	0.029
Zeitpunkt7	8 - 1	-0.1073	0.1400	-0.3818	0.167	61.94	-0.766	0.446
Zeitpunkt8	9 - 1	0.0430	0.1400	-0.2315	0.317	61.94	0.307	0.760

Die Proben gemessen mit dem 90-bp-Primer waren im Blutplasma und Blutserum mit einem p-Wert von $> 0,05$ im Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Beim gepaarten Vergleich ergab sich zudem ein statistisch signifikanter Unterschied im T-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ (s. Tabelle 5.10).

Keine Normalverteilung zeigten die Proben mit dem 222-bp-Primer im Blutplasma und Blutserum (p-Wert von $< 0,05$). Beim gepaarten Vergleich resultierte ein statistisch signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ (s. Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: Zusammenfassende Statistik Vgl. Plasma/Serum mit 90 bp/222 bp Primer

Die untenstehenden Tabellen zeigen eine zusammenfassende Statistik des Vergleichs zwischen Blutplasma und Blutserum mit dem 90-bp- bzw. 222-bp-Primer. Die cfDNA-Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Der Shapiro-Wilk-Test hatte bei den Messungen mit dem 222-bp-Primer einen p-Wert von $< 0,05$, die Daten waren damit nicht normalverteilt. Beim gepaarten Vergleich Blutplasma mit Blutserum ergab sich beim Wilcoxon-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ ein statistisch signifikanter Unterschied, genauso wie beim T-Test für die Normalverteilung beim 90-bp-Primer.

Descriptives

	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
								W	p
LOG_ng_ml_90bp_plasma	54	1	1.115	1.133	0.196	0.678	1.45	0.974	0.297
LOG_ng_ml_222bp_plasma	54	1	0.651	0.664	0.310	-1.000	1.22	0.774	$< .001$

Descriptives

	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
								W	p
LOG_ng_ml_90bp_serum	79	1	1.684	1.703	0.411	0.752	2.88	0.980	0.242
LOG_ng_ml_222bp_serum	79	1	0.988	0.963	0.413	0.249	2.35	0.967	0.039

Die normalverteilten Proben wurden mit dem 90-bp-Primer gemessen und ergaben einen Pearson-Korrelationskoeffizienten von $R = 0,132$, was einer geringen Korrelation entsprach (s. Tabelle 5.11).

Tabelle 5.11: Korrelationsmatrix Vgl. 90 bp Plasma und Serum

Zu erkennen ist die Korrelationsmatrix mit einem $R = 0,132$, was einer geringen Korrelation entsprach.

Correlation Matrix

		LOG_ng_ml_90bp_plasma	LOG_ng_ml_90bp_serum
LOG_ng_ml_90bp_plasma	Pearson's r	—	
	p-value	—	
	N	—	
LOG_ng_ml_90bp_serum	Pearson's r	0.132	—
	p-value	0.343	—
	N	54	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Da die Proben mit dem 222-bp-Primer im Blutplasma und Blutserum nicht normalverteilt waren, wurde hier der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient angewandt. Dieser betrug $R_s = 0,077$ und bedeutete ebenfalls einen geringen Effekt (s. Tabelle 5.12).

Tabelle 5.12: Korrelationsmatrix Vgl. 222 bp Plasma und Serum

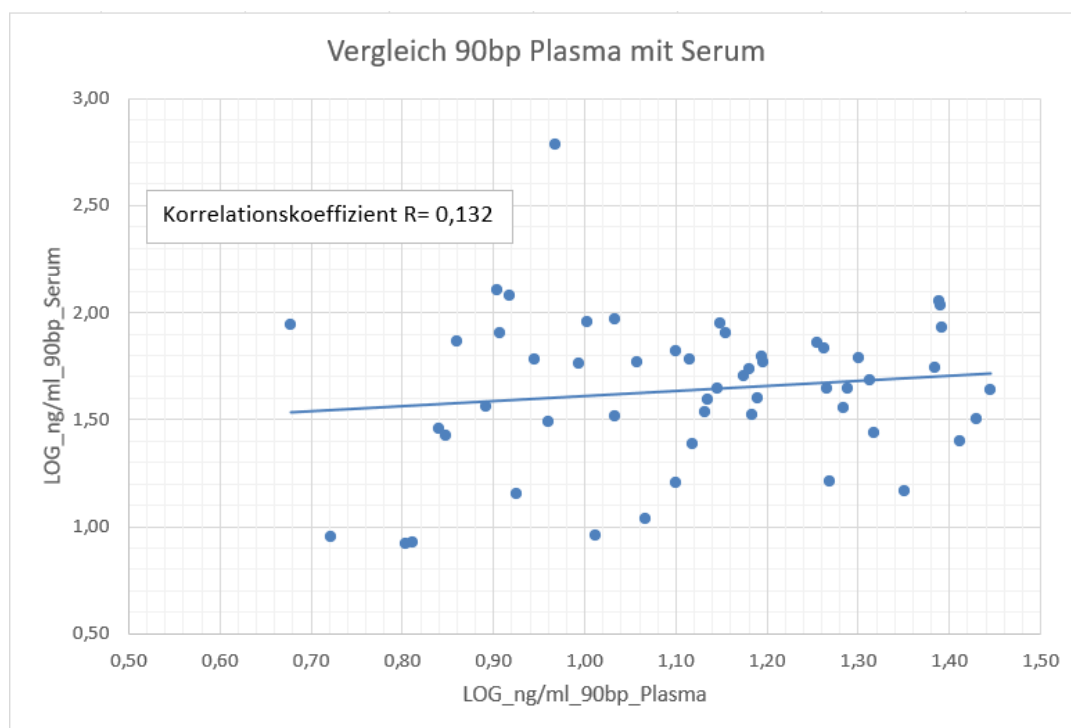
Zu sehen ist die Korrelationsmatrix mit einem $R_s = 0,077$, was ebenfalls einen geringen Effekt bedeutete.

Correlation Matrix

		LOG_ng_ml_222bp_serum	LOG_ng_ml_222bp_plasma
LOG_ng_ml_222bp_serum	Spearman's rho	—	—
	p-value	—	—
	N	—	—
LOG_ng_ml_222bp_plasma	Spearman's rho	0.077	—
	p-value	0.579	—
	N	54	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Für die grafische Darstellung und zur Gegenüberstellung der Daten im Vergleich dienen die Streudiagramme (s. Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8).

**Abbildung 5.7: Streudiagramm Vgl. 90 bp Plasma/Serum**

Dargestellt sind die cfDNA-Messungen mit dem 90 bp Primer im Vergleich zwischen Plasma und Serum mit logarithmierten cfDNA-Werten gemessen in ng/ml. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $R = 0,132$, was einer geringen Korrelation entsprach.

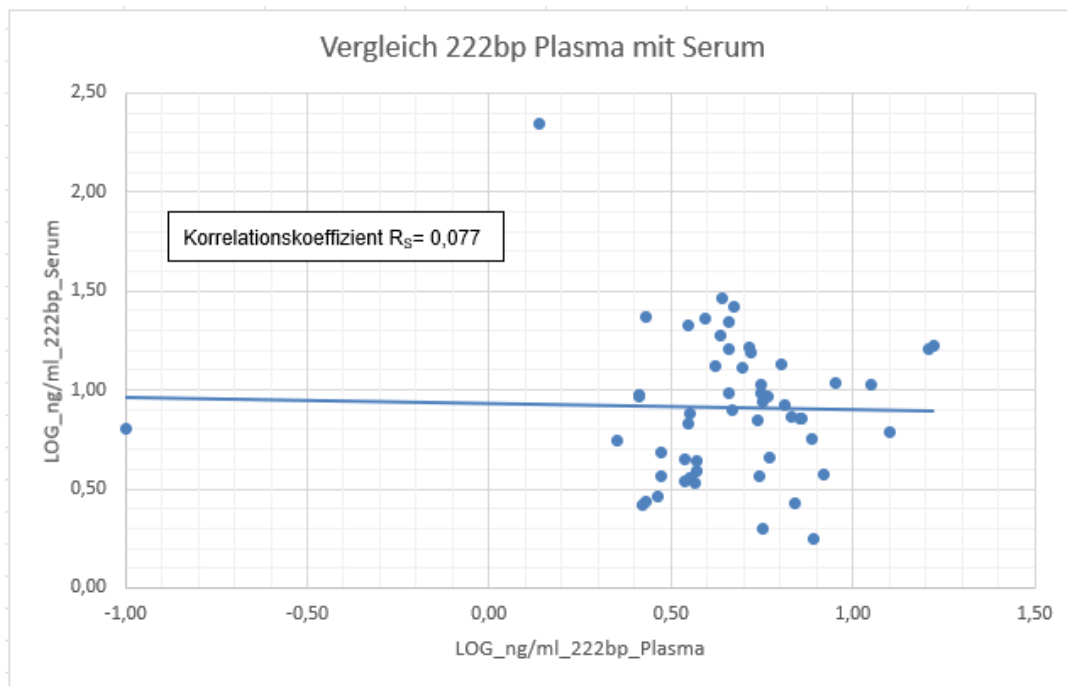


Abbildung 5.8: Streudiagramm Vgl. 222 bp Plasma/Serum

Veranschaulicht sind die cfDNA-Messungen mit dem 222-bp-Primer im Vergleich zwischen Plasma und Serum mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient betrug $R_s = 0,077$, was einem geringen Effekt entsprach.

Insgesamt konnte eine größere Varianz bei den Serumproben beobachtet werden, was auch schon in der Literatur bei anderen Studien festgestellt wurde (160). Deshalb konzentrierte sich diese Dissertation im weiteren Verlauf ausschließlich auf die Plasmaproben.

5.3 Vergleich Messung verschiedener cfDNA-Fragmentlängen

Das Verhältnis von langen (222 bp) zu kurzen (90 bp) cfDNA-Fragmenten wird durch den cfDNA-Integritätsindex beschrieben. Berechnet wird dieser als Quotient aus langen geteilt durch die kurzen Fragmente. Für das Blutplasma betrug der Integritätsindex 222 bp/90 bp = 0,584 und beim Blutserum 0,586. Der Referenzbereich in gesunden Probanden betrug in der Literatur zwischen 0,3 und 0,8 (143). Somit liegen die gemessenen Werte der Kontrollgruppe in diesem Bereich.

Der Vergleich der 90-bp- mit den 222-bp-cfDNA-Fragmenten im Blutplasma ergab bei durch den Shapiro-Wilk-Test als nicht normalverteilt identifizierten Daten einen Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten von $R_s = 0,575$, was einem erwartungsgemäß starken Effekt entsprach. Das Signifikanzniveau war hierbei sogar bei $< 0,001$ (s. Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13: Korrelationsmatrix Plasma 90 bp und 222 bp

Die Tabelle zeigt die Korrelationsmatrix mit einem R_s von 0,575, was einem sehr starken Effekt entsprach.

Correlation Matrix

		LOG_ng/ml_90bp_plasma	LOG_ng/ml_222bp_plasma
LOG_ng/ml_90bp_plasma	Spearman's rho	—	
	p-value	—	
	N	—	
LOG_ng/ml_222bp_plasma	Spearman's rho	0.575***	—
	p-value	< .001	—
	N	54	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Das Streudiagramm veranschaulicht die Daten in der Gegenüberstellung (s. Abbildung 5.9).

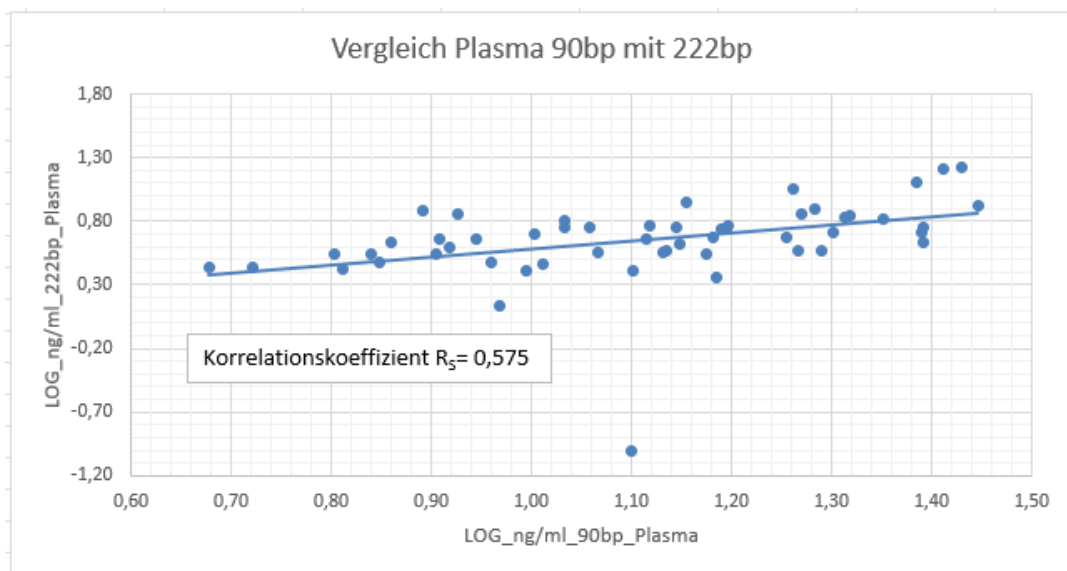


Abbildung 5.9: Streudiagramm Vgl. Plasma 90 bp/222 bp

Veranschaulicht sind die cfDNA-Messungen im Blutplasma mit dem 90-bp- und 222-bp-Primer im Vergleich. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen.

Der Vergleich von 90 bp mit 222 bp cfDNA-Fragmenten im Blutserum stellte sich für die im Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilten Daten mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ein Wert von $R_s = 0,807$ heraus, was einem sehr starken Effekt entsprach. Das Signifikanzniveau war auch hierbei $< 0,001$ (s. Tabelle 5.14).

Tabelle 5.14: Korrelationsmatrix Serum 90 bp und 222 bp

Die Tabelle zeigt die Korrelationsmatrix mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $R_s = 0,807$, was einem sehr starken Effekt entsprach.

Correlation Matrix		LOG_ng_ml_90bp_serum	LOG_ng_ml_222bp_serum
LOG_ng_ml_90bp_serum	Spearman's rho	—	
	p-value	—	
	N	—	
LOG_ng_ml_222bp_serum	Spearman's rho	0.807***	—
	p-value	< .001	—
	N	79	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Das Streudiagramm stellt die Daten in der Gegenüberstellung dar (s. Abbildung 5.10). Die bessere Korrelation der Werte im Serum gegenüber dem Blutplasma hängt sehr wahrscheinlich mit den insgesamt höheren cfDNA-Konzentrationen im Serum zusammen (161). Umso größer der Wertebereich, umso höher werden auch die Korrelationen.

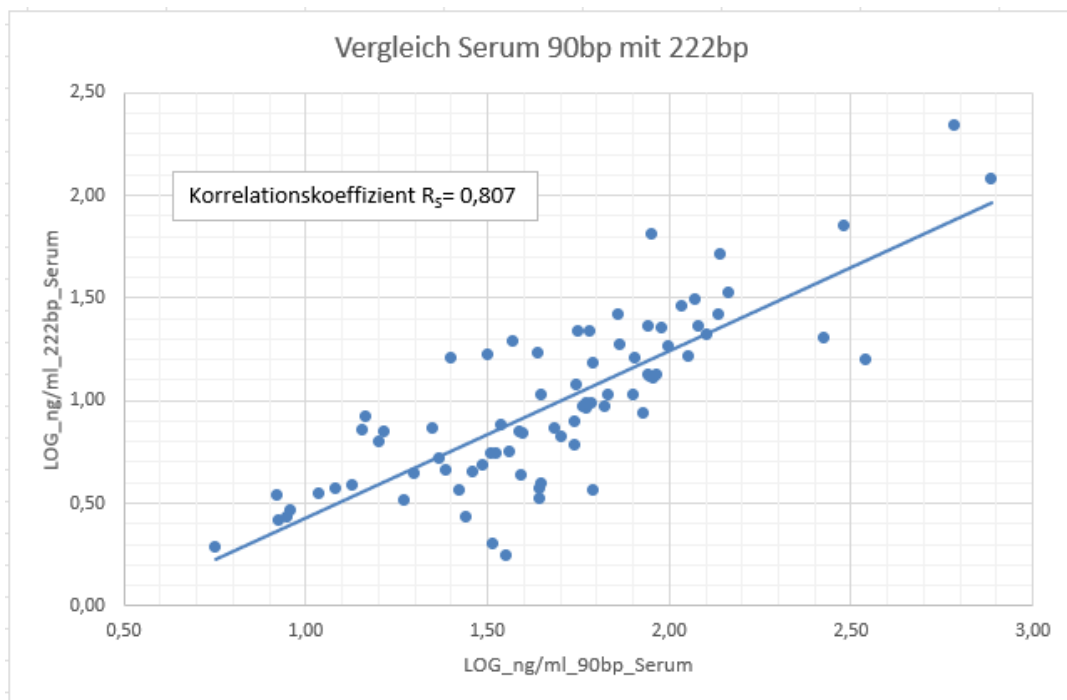


Abbildung 5.10: Streudiagramm Vgl. Serum 90 bp/222 bp

Verdeutlicht sind die cfDNA-Messungen im Blutserum mit dem 90-bp- und 222-bp-Primer im Vergleich. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen.

Die starke Korrelation zwischen den 90-bp- und 222-bp-Fragmenten resultiert daraus, dass das 90-bp-Fragment ein Teil des 222-bp-Fragments repräsentiert. Demnach ist für jedes 222-bp-Fragment ein zusätzliches 90-bp-Fragment zu erwarten, welches somit höhere Messwerte aufweist. Die Variation der cfDNA-Fragmentlängen ist abhängig von der Genese. Wie im

Kapitel 2.2 beschrieben, gibt es einen Peak bei 166 bp, welches der Länge von DNA-Fragmenten gebunden an ein Nukleosom entspricht. Mit dem 222-bp-Primer werden nur die größeren cfDNA-Fragmente gemessen, die länger als ein Nukleosom sind. Diese Dissertation konzentriert sich im weiteren Verlauf auf die Messung der kürzeren cfDNA-Fragmente mit Hilfe des 90-bp-Primers.

5.4 Studienergebnisse „Cooling H3“

Für die Kälteexposition bei der „Cooling H3“-Studie wurde für die statistische Analyse ein gemischtes Modell aufgestellt, wobei Zeitpunkt, Sitzung und Geschlecht als Faktoren sowie Proband als Clustervariable eingesetzt wurden. Es erfolgte eine dekadische Logarithmierung der cfDNA-Werte mit der Basis von 10 und die Messung mit Hilfe des 90-bp-Primers. Anhand der zusammenfassenden Statistik kann die Verteilung der Daten über die Faktoren eingesehen werden. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Der Shapiro-Wilk-Test zeigte mit einem p-Wert von $> 0,05$ eine Normalverteilung der Daten an (s. Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Zusammenfassende Statistik „Cooling H3“-Studie

Die Tabelle stellt die zusammenfassende Statistik der „Cooling H3“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten dar, gemessen in ng/ml. Dabei repräsentieren die weiblichen Probanden Geschlecht 1 und die männlichen Probanden Geschlecht 2. Sitzung 1 bedeutet „erste Sitzung“ und Sitzung 2 „wiederholte Sitzung“. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Descriptives										
	Geschlecht	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	72	0	1.05	1.05	0.245	0.502	1.68	0.993	0.963
	2	99	0	1.16	1.14	0.254	0.683	1.75	0.982	0.192

Descriptives										
	Sitzung	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	90	0	1.12	1.11	0.266	0.502	1.75	0.988	0.592
	2	81	0	1.11	1.10	0.246	0.573	1.68	0.984	0.390

Descriptives										
	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	19	0	0.987	1.06	0.272	0.502	1.47	0.958	0.530
	2	19	0	1.133	1.14	0.263	0.720	1.72	0.973	0.830
	3	19	0	1.097	1.03	0.288	0.743	1.75	0.910	0.073
	4	19	0	1.066	1.05	0.234	0.708	1.54	0.964	0.652
	5	19	0	1.197	1.25	0.232	0.681	1.60	0.983	0.970
	6	19	0	1.240	1.21	0.231	0.810	1.59	0.964	0.644
	7	19	0	1.085	1.01	0.290	0.686	1.59	0.938	0.239
	8	19	0	1.116	1.07	0.226	0.741	1.65	0.926	0.145
	9	19	0	1.112	1.18	0.221	0.678	1.53	0.969	0.760

Die Boxplots liefern eine Übersicht über die grundsätzliche Verteilung der cfDNA-Werte aller Probanden, aufgeteilt nach Geschlecht, Sitzungen und Zeitpunkten. Zudem können die Ausreißer erkannt werden (s. Abbildung 5.11).

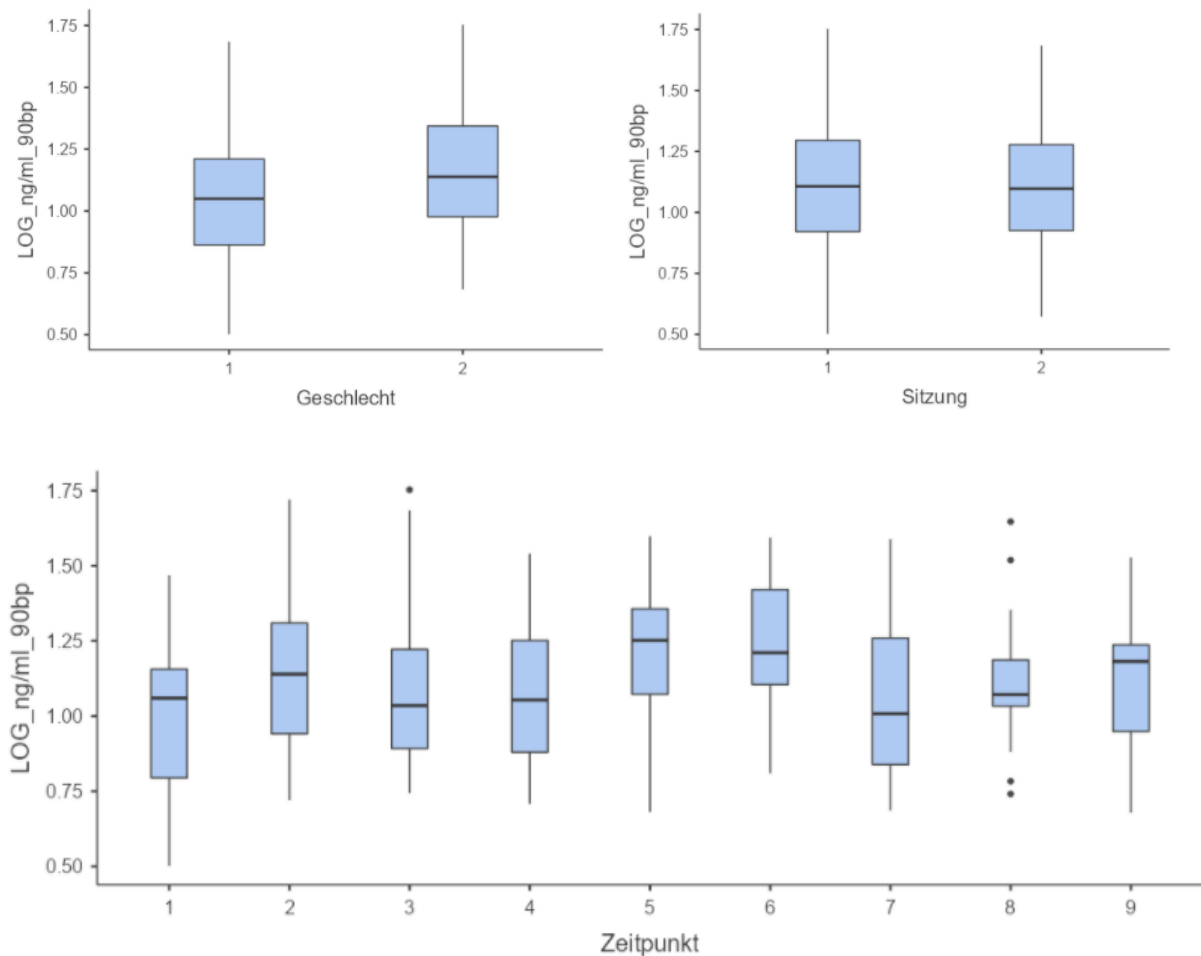


Abbildung 5.11: Boxplots „Cooling H3“-Studie

Abgebildet sind die Boxplots des Geschlechts (1= weiblich, 2= männlich), der Sitzung (1= erste Sitzung, 2= wiederholte Sitzung) sowie der Zeitpunkte (1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“) der „Cooling H3“-Studie über alle Probanden hinweg mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml.

Bei den Modellergebnissen offenbarte der Omnibus-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$, dass es einen Unterschied über die Zeitpunkte gab. Es machte jedoch keinen Unterschied, ob es die erste beziehungsweise wiederholte Sitzung oder weibliches beziehungsweise männliches Geschlecht war. Die Interaktionen zwischen den verschiedenen Faktoren ergaben keinen Unterschied, lediglich bei der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Geschlecht wurde ein Signifikanztrend mit einem p-Wert von 0,057 gesehen. Dies könnte aber auch aufgrund der wenigen Probanden (4 Frauen und 6 Männer) noch nicht signifikant sein (s. Tabelle 5.16).

Tabelle 5.16: Modellergebnisse „Cooling H3“-Studie im Omnibus-Test

Die Tabelle fasst die Modellergebnisse der „Cooling H3“-Studie im Omnibus-Test zusammen. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von $< 0,05$ zeigte sich lediglich der Faktor Zeitpunkt signifikant. Ein Signifikanztrend war bei der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Geschlecht zu sehen.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	2.566	8	127.09	0.013
Sitzung	0.100	1	127.91	0.752
Geschlecht	0.944	1	8.05	0.360
Zeitpunkt * Sitzung	1.287	8	127.09	0.256
Zeitpunkt * Geschlecht	1.960	8	127.09	0.057
Sitzung * Geschlecht	0.432	1	127.91	0.512
Zeitpunkt * Sitzung * Geschlecht	0.540	8	127.09	0.824

Beim Dunnett's Test wurden die verschiedenen Zeitpunkte mit dem Ausgangszeitpunkt 1 („davor“) verglichen und es konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Anstieg von cfDNA direkt zum Zeitpunkt 2 („danach“) sowie als Spätfolge zum Zeitpunkt 5 („4 h danach“) und Zeitpunkt 6 („6 h danach“) gab. Ein Signifikanztrend mit einem p-Wert von 0,052 konnte beim Zeitpunkt 8 („24 h danach“) vermutet werden. Dies scheint nicht von der Sitzung abzuhängen, egal ob erste Sitzung oder wiederholte Sitzung. Wie bereits beim Omnibus-Test konnte kein Zusammenhang im Vergleich der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Sitzung sowie zwischen Zeitpunkt, Sitzung und Geschlecht festgestellt werden. Jedoch fallen signifikante p-Werte von $< 0,05$ beim Vergleich von Geschlecht mit Zeitpunkt 2 („danach“), Zeitpunkt 5 („4 h danach“), Zeitpunkt 6 („6 h danach“), Zeitpunkt 7 („12 h danach“), Zeitpunkt 8 („24 h danach“) sowie Zeitpunkt 9 („48 h danach“) auf. Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden kann nur spekuliert werden, ob das Geschlecht bei Kälteexposition doch einen größeren Einfluss haben könnte (s. Tabelle 5.17).

Tabelle 5.17: Modellergebnisse „Cooling H3“-Studie im Dunnett’s Test

Dargestellt sind in dieser Tabelle die Modellergebnisse der „Cooling H3“-Studie im Dunnett’s Test. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % und einem p-Wert von < 0,05 zeigte sich im Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit Zeitpunkt 2 sowie Zeitpunkt 5 und Zeitpunkt 6 ein signifikanter Unterschied. Zudem ließen sich im Vergleich Geschlecht mit Zeitpunkt 2 sowie Zeitpunkten 5 bis 9 signifikante Werte beobachten. Geschlecht: 1= weiblich, 2= männlich; Sitzung: 1= erste Sitzung, 2= wiederholte Sitzung; Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.10751	0.0601	0.98965	1.2254	8.05	18.418	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.12165	0.0575	0.00889	0.2344	127.09	2.114	0.036
Zeitpunkt2	3 - 1	0.09389	0.0575	-0.01887	0.2067	127.09	1.632	0.105
Zeitpunkt3	4 - 1	0.05812	0.0575	-0.05464	0.1709	127.09	1.010	0.314
Zeitpunkt4	5 - 1	0.18033	0.0575	0.06757	0.2931	127.09	3.135	0.002
Zeitpunkt5	6 - 1	0.22340	0.0575	0.11064	0.3362	127.09	3.883	< .001
Zeitpunkt6	7 - 1	0.07945	0.0575	-0.03331	0.1922	127.09	1.381	0.170
Zeitpunkt7	8 - 1	0.11299	0.0575	2.26e-4	0.2257	127.09	1.964	0.052
Zeitpunkt8	9 - 1	0.10156	0.0575	-0.01120	0.2143	127.09	1.765	0.080
Sitzung1	2 - 1	0.00878	0.0276	-0.04530	0.0628	127.91	0.318	0.751
Geschlecht1	2 - 1	0.11689	0.1203	-0.11883	0.3526	8.05	0.972	0.359
Zeitpunkt1 * Sitzung1	2 - 1 * 2 - 1	-0.04196	0.1151	-0.26748	0.1836	127.09	-0.365	0.716
Zeitpunkt2 * Sitzung1	3 - 1 * 2 - 1	0.01845	0.1151	-0.20707	0.2440	127.09	0.160	0.873
Zeitpunkt3 * Sitzung1	4 - 1 * 2 - 1	-0.09800	0.1151	-0.32352	0.1275	127.09	-0.852	0.396
Zeitpunkt4 * Sitzung1	5 - 1 * 2 - 1	-0.11850	0.1151	-0.34402	0.1070	127.09	-1.030	0.305
Zeitpunkt5 * Sitzung1	6 - 1 * 2 - 1	0.05282	0.1151	-0.17270	0.2783	127.09	0.459	0.647
Zeitpunkt6 * Sitzung1	7 - 1 * 2 - 1	0.04909	0.1151	-0.17643	0.2746	127.09	0.427	0.670
Zeitpunkt7 * Sitzung1	8 - 1 * 2 - 1	0.15967	0.1151	-0.06585	0.3852	127.09	1.388	0.168
Zeitpunkt8 * Sitzung1	9 - 1 * 2 - 1	0.11777	0.1151	-0.10775	0.3433	127.09	1.024	0.308
Zeitpunkt1 * Geschlecht1	2 - 1 * 2 - 1	0.28728	0.1151	0.06176	0.5128	127.09	2.497	0.014
Zeitpunkt2 * Geschlecht1	3 - 1 * 2 - 1	0.17210	0.1151	-0.05342	0.3976	127.09	1.496	0.137
Zeitpunkt3 * Geschlecht1	4 - 1 * 2 - 1	0.21670	0.1151	-0.00882	0.4422	127.09	1.883	0.062
Zeitpunkt4 * Geschlecht1	5 - 1 * 2 - 1	0.34283	0.1151	0.11731	0.5684	127.09	2.980	0.003
Zeitpunkt5 * Geschlecht1	6 - 1 * 2 - 1	0.37841	0.1151	0.15289	0.6039	127.09	3.289	0.001
Zeitpunkt6 * Geschlecht1	7 - 1 * 2 - 1	0.28133	0.1151	0.05581	0.5069	127.09	2.445	0.016
Zeitpunkt7 * Geschlecht1	8 - 1 * 2 - 1	0.25524	0.1151	0.02972	0.4808	127.09	2.218	0.028
Zeitpunkt8 * Geschlecht1	9 - 1 * 2 - 1	0.33160	0.1151	0.10608	0.5571	127.09	2.882	0.005
Sitzung1 * Geschlecht1	2 - 1 * 2 - 1	-0.03628	0.0552	-0.14442	0.0719	127.91	-0.657	0.512
Zeitpunkt1 * Sitzung1 * Geschlecht1	2 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.08742	0.2301	-0.53846	0.3636	127.09	-0.380	0.705
Zeitpunkt2 * Sitzung1 * Geschlecht1	3 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.23796	0.2301	-0.68900	0.2131	127.09	-1.034	0.303
Zeitpunkt3 * Sitzung1 * Geschlecht1	4 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.09775	0.2301	-0.54879	0.3533	127.09	-0.425	0.672
Zeitpunkt4 * Sitzung1 * Geschlecht1	5 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	0.04629	0.2301	-0.40475	0.4973	127.09	0.201	0.841
Zeitpunkt5 * Sitzung1 * Geschlecht1	6 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.12377	0.2301	-0.57481	0.3273	127.09	-0.538	0.592
Zeitpunkt6 * Sitzung1 * Geschlecht1	7 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	0.19002	0.2301	-0.26102	0.6411	127.09	0.826	0.411
Zeitpunkt7 * Sitzung1 * Geschlecht1	8 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.05276	0.2301	-0.50380	0.3983	127.09	-0.229	0.819
Zeitpunkt8 * Sitzung1 * Geschlecht1	9 - 1 * 2 - 1 * 2 - 1	-0.07520	0.2301	-0.52624	0.3758	127.09	-0.327	0.744

Die Verläufe und Zusammenhänge werden in Liniendiagrammen nochmals genauer veranschaulicht. Aufgetrennt nach Geschlecht kann im Vergleich die erste Sitzung mit der wiederholten Sitzung gesehen werden. Die Daten der Frauen weisen Schwankungen auf, ohne dass sich ein konkreter Trend ableiten lässt (s. Abbildung 5.12).

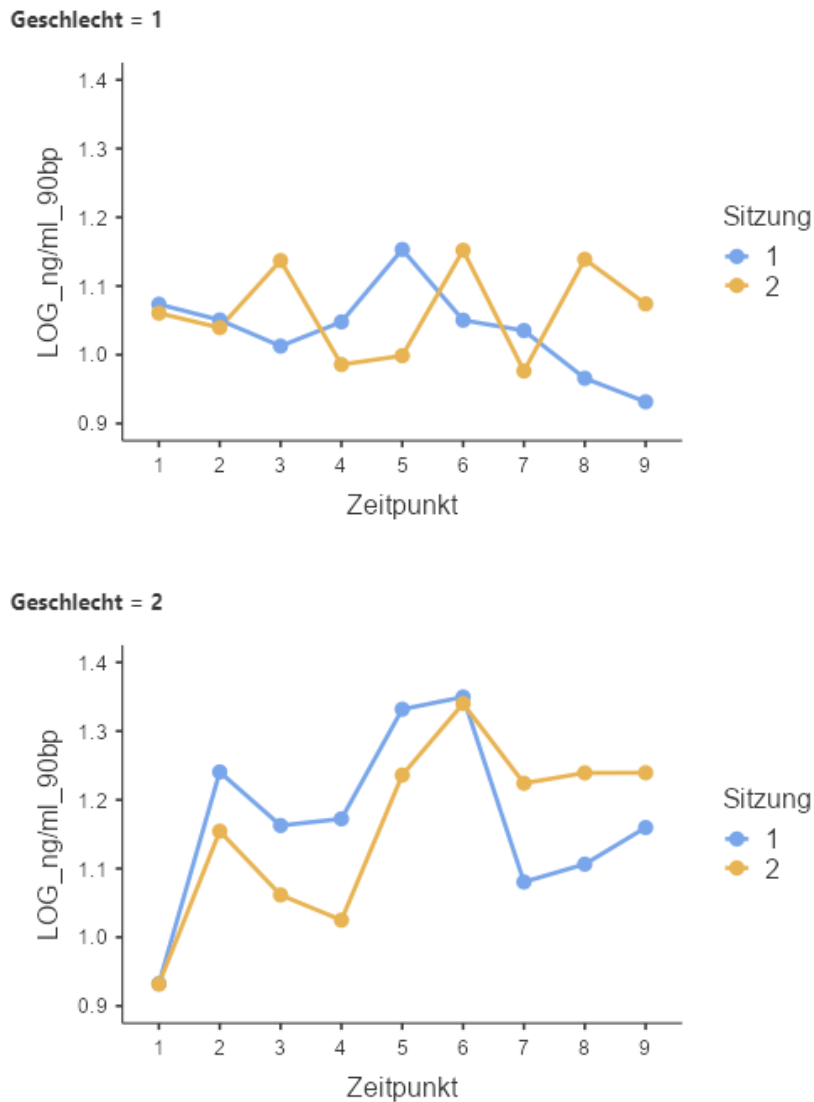


Abbildung 5.12: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie getrennt nach Geschlecht

Zu sehen sind zwei Liniendiagramme der „Cooling H3“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, getrennt nach Geschlecht (1= weiblich, 2= männlich) und gemessen in ng/ml. Die Linie der Sitzung 1 stellt die „erste Sitzung“, die Linie der Sitzung 2 die „wiederholte Sitzung“ dar. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Auch im direkten Vergleich der Liniendiagramme, aufgetrennt nach Sitzung, scheinen die Männer in der ersten und wiederholten Sitzung ähnlich mit den cfDNA-Werten anzusteigen. Ein Verlaufstrend, wie zuvor im Dunnett's Test mit den Signifikanzen beschrieben, lässt sich vermuten. Ein direkter Anstieg von cfDNA-Werten ist beim Zeitpunkt 2 („danach“) als Sofortreaktion und als Spätfolge bei Zeitpunkt 5 („4 h danach“) und Zeitpunkt 6 („6 h danach“) zu erkennen. Insgesamt scheinen Männer auch mit höheren cfDNA-Werten zu reagieren (s. Abbildung 5.13).

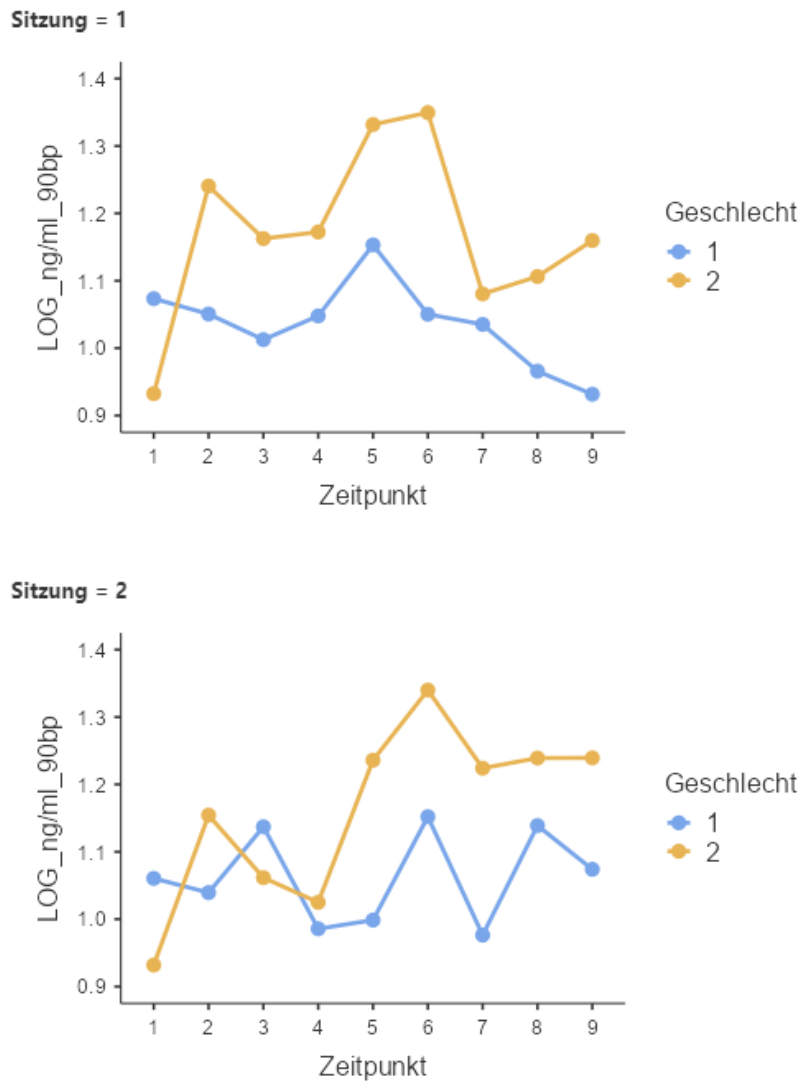


Abbildung 5.13: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie getrennt nach Sitzung

Erkennbar sind die zwei Liniendiagramme der „Cooling H3“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, getrennt nach Sitzung (1= erste Sitzung, 2= wiederholte Sitzung) und gemessen in ng/ml. Die Linien repräsentieren das Geschlecht (1= weiblich, 2= männlich). Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „2 h danach“, 5= „4 h danach“, 6= „6 h danach“, 7= „12 h danach“, 8= „24 h danach“, 9= „48 h danach“.

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Probanden, aufgetrennt nach Sitzung und Geschlecht, sind die individuellen Verläufe zu erkennen. Zunächst werden im Liniendiagramm der ersten Sitzung der weiblichen Probanden die einzelnen Schwankungen sichtbar. Bei fast allen ist ein Peak bei Zeitpunkt 5 mit „4 h danach“ zu beobachten (s. Abbildung 5.14).

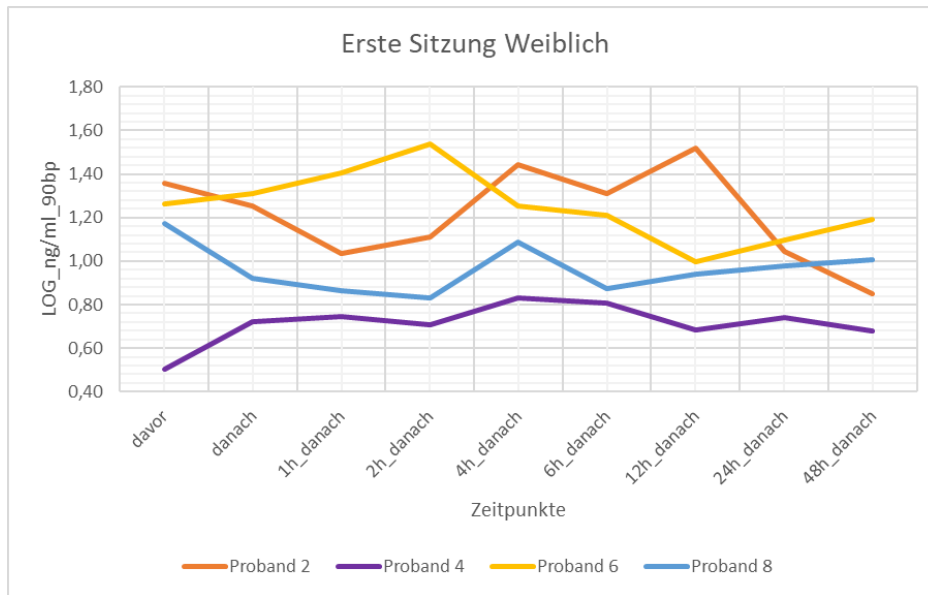


Abbildung 5.14: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Erste Sitzung Weiblich

Im Liniendiagramm abgebildet ist die erste Sitzung mit den verschiedenen Zeitpunkten der „Cooling H3“-Studie, aufgetrennt nach weiblichen Probanden. Die cfDNA-Werte wurden logarithmiert und gemessen in ng/ml.

Dahingegen ist im Liniendiagramm der ersten Sitzung der männlichen Probanden ein Verlaufstrend mit den Anstiegen bei Zeitpunkt 2 („danach“) und Zeitpunkt 5 („4 h danach“) sowie Zeitpunkt 6 („6 h danach“) zu sehen (s. Abbildung 5.15).

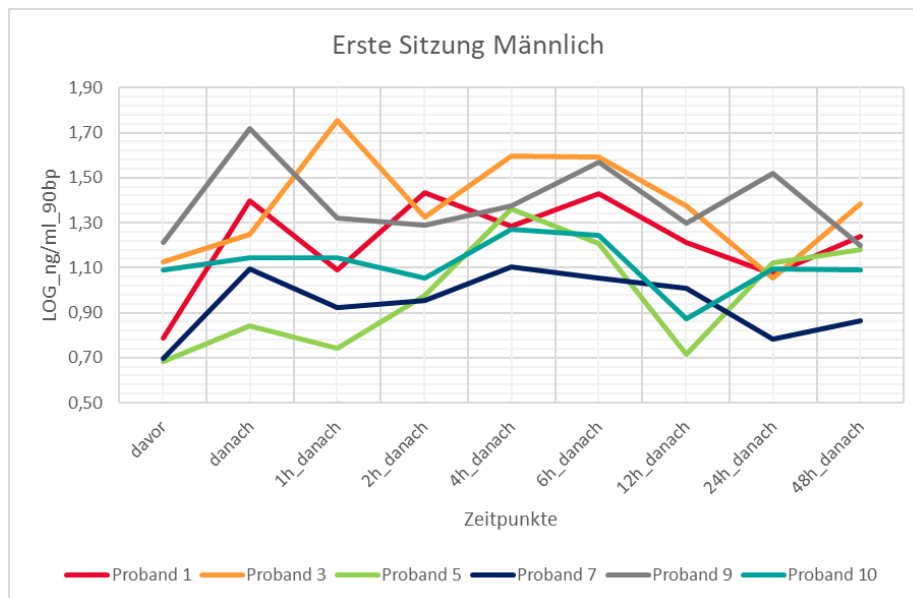


Abbildung 5.15: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Erste Sitzung Männlich

Dargestellt ist Im Liniendiagramm die erste Sitzung mit den verschiedenen Zeitpunkten der „Cooling H3“-Studie, aufgetrennt nach männlichen Probanden. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden in ng/ml gemessen.

Für die genauere Betrachtung der einzelnen Probanden im Liniendiagramm der wiederholten Sitzung der weiblichen Probanden sind die einzelnen Schwankungen wieder dargestellt.

Ein cfDNA-Anstieg lässt sich bei Zeitpunkt 6 mit „6 h danach“ beobachten (s. Abbildung 5.16).

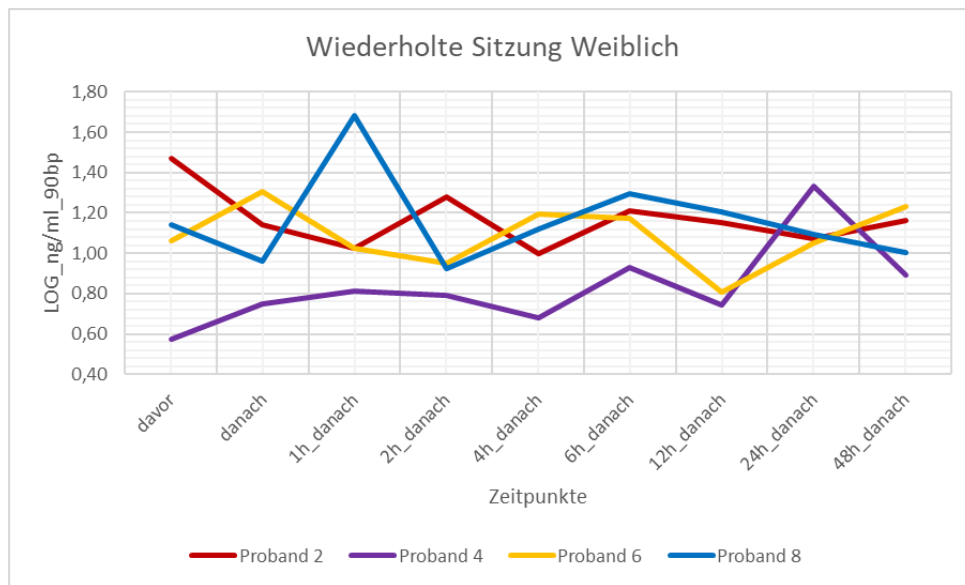


Abbildung 5.16: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Wiederholte Sitzung Weiblich

Gezeigt ist im Liniendiagramm die wiederholte Sitzung mit den unterschiedlichen Zeitpunkten der „Cooling H3“-Studie, aufgetrennt nach weiblichen Probanden. Die cfDNA-Werte wurden logarithmiert und gemessen in ng/ml.

Schließlich illustriert das Liniendiagramm der wiederholten Sitzung die individuellen Verläufe der männlichen Probanden. Hierbei lässt sich derselbe Trend wie bei der ersten Sitzung erkennen. Zusätzlich steigen bei fast allen Probanden die cfDNA-Werte bei Zeitpunkt 8 mit „24 h danach“ (s. Abbildung 5.17).

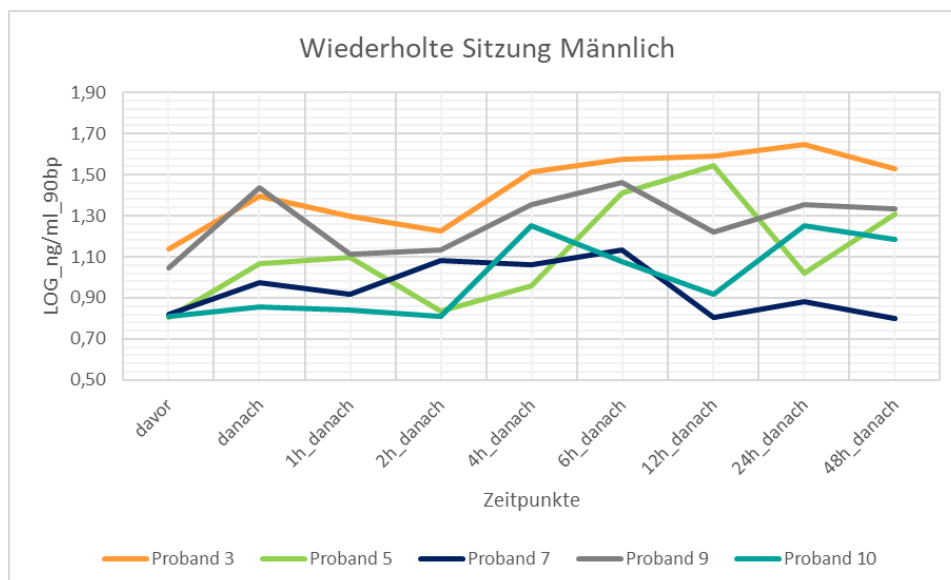


Abbildung 5.17: Liniendiagramm „Cooling H3“-Studie Wiederholte Sitzung Männlich

In der Abbildung wird die wiederholte Sitzung der „Cooling H3“-Studie über mehrere Zeitpunkte hinweg dargestellt, aufgetrennt nach männlichen Probanden. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden in ng/ml gemessen.

5.5 Studienergebnisse „Brief Cooling“

Für die statistische Analyse der Kälteexposition der „Brief Cooling“-Studie wurde ein gemischtes Modell aufgestellt, wobei Zeitpunkt als Faktor und Proband als Clustervariable eingesetzt wurden. Die Daten wurden dekadisch mit der Basis von 10 logarithmiert und mit Hilfe des 90-bp-Primers gemessen. In der zusammenfassenden Statistik ist die Datenverteilung über die Zeitpunkte dargestellt (s. Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18: Zusammenfassende Statistik „Brief Cooling“-Studie

Aufgeführt sind in der zusammenfassenden Statistik der „Brief Cooling“-Studie die logarithmierten cfDNA-Werte, gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „15 min danach“, 4= „30 min danach“, 5= „1 h danach“, 6= „2 h danach“, 7= „4 h danach“, 8= „6 h danach“, 9= „12 h danach“, 10= „24 h danach“, 11= „48 h danach“.

Descriptives										
	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	9	0	1.17	1.16	0.208	0.932	1.58	0.935	0.526
	2	9	0	1.23	1.26	0.185	0.983	1.54	0.960	0.797
	3	8	0	1.11	1.10	0.132	0.923	1.30	0.969	0.887
	4	9	0	1.08	1.05	0.148	0.847	1.32	0.967	0.869
	5	9	0	1.04	1.06	0.186	0.690	1.25	0.910	0.315
	6	9	0	1.25	1.22	0.236	0.924	1.50	0.851	0.077
	7	9	0	1.34	1.36	0.232	0.897	1.61	0.921	0.400
	8	9	0	1.32	1.36	0.249	0.844	1.62	0.938	0.558
	9	9	0	1.24	1.18	0.249	0.911	1.81	0.856	0.086
	10	9	0	1.24	1.27	0.235	0.915	1.58	0.947	0.652
	11	9	0	1.29	1.32	0.188	0.935	1.58	0.943	0.619

Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt und zeigte mit einem p-Wert von < 0,05, dass es beim Omnibus-Test einen Unterschied bei den cfDNA-Messungen über die Zeitpunkte gab. Im Dunnett's Test stellte sich jedoch kein signifikanter Unterschied heraus. Hierbei wurde der Ausgangszeitpunkt 1 („davor“) mit den Zeitpunkten 2 („danach“), Zeitpunkt 3 („15 min danach“), Zeitpunkt 4 („30 min danach“), Zeitpunkt 5 („1 h danach“), Zeitpunkt 6 („2 h danach“), Zeitpunkt 7 („4 h danach“), Zeitpunkt 8 („6 h danach“), Zeitpunkt 9 („12 h danach“), Zeitpunkt 10 („24 h danach“) und Zeitpunkt 11 („48 h danach“) verglichen (s. Tabelle 5.19).

Tabelle 5.19: Modellergebnisse „Brief Cooling“-Studie

Zu sehen sind die Modellergebnisse der „Brief Cooling“-Studie. Der Omnibus-Test zeigte mit einem p-Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte an. Im direkten Vergleich beim Dunnett's Test ergab sich im Vergleich mit dem Ausgangszeitpunkt kein signifikanter Unterschied (p-Wert von $> 0,05$). Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „15 min danach“, 4= „30 min danach“, 5= „1 h danach“, 6= „2 h danach“, 7= „4 h danach“, 8= „6 h danach“, 9= „12 h danach“, 10= „24 h danach“, 11= „48 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	2.71	10	79.1	0.007

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.2094	0.0404	1.13021	1.2886	8.04	29.930	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0607	0.0837	-0.10331	0.2248	79.04	0.726	0.470
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.0681	0.0865	-0.23756	0.1014	79.23	-0.787	0.433
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.0954	0.0837	-0.25948	0.0686	79.04	-1.140	0.258
Zeitpunkt4	5 - 1	-0.1308	0.0837	-0.29487	0.0332	79.04	-1.563	0.122
Zeitpunkt5	6 - 1	0.0798	0.0837	-0.08425	0.2438	79.04	0.953	0.343
Zeitpunkt6	7 - 1	0.1628	0.0837	-0.00124	0.3268	79.04	1.945	0.055
Zeitpunkt7	8 - 1	0.1500	0.0837	-0.01404	0.3140	79.04	1.792	0.077
Zeitpunkt8	9 - 1	0.0623	0.0837	-0.10173	0.2263	79.04	0.744	0.459
Zeitpunkt9	10 - 1	0.0618	0.0837	-0.10225	0.2258	79.04	0.738	0.463
Zeitpunkt10	11 - 1	0.1135	0.0837	-0.05055	0.2775	79.04	1.356	0.179

Zur Ergänzung wurde für die normalverteilten Daten (Shapiro-Wilk-Test mit p-Wert $> 0,05$) noch ein gepaarter T-Test durchgeführt. Hierbei stellte sich wiederum mit einem p-Wert von $< 0,05$ ein statistisch signifikanter Unterschied über alle Zeitpunkte heraus (s. Tabelle 5.20).

Tabelle 5.20: Gepaarter T-Test „Brief Cooling“-Studie

Der gepaarte T-Test ergab mit einem p-Wert von $< 0,05$ einen statistisch signifikanten Unterschied für die Zeitpunkte.

Paired Samples T-Test

		statistic	df	p	
LOG _{ng/ml} _90bp	Zeitpunkt	Student's t	-15.2	97.0	$< .001$

Der Verlauf und Trend der Probanden über die Zeitpunkte hinweg wurde in Liniendiagrammen nochmals genauer veranschaulicht. Im Teil A sind die Probanden einzeln aufgeteilt, im Teil B ist der Trend der Mittelwerte über alle Probanden verdeutlicht. Direkt nach der Kälteexposition ist als Sofortreaktion ein Anstieg der cfDNA-Werte zu sehen, danach ein Abfall. Mit den Zeitpunkten 6 („2 h danach“) bis 8 („6 h danach“) sind als Spätreaktion nochmals höhere cfDNA-Werte zu erkennen. Darauf folgt ein erneuter Abfall und zum Schluss scheint es bei

Zeitpunkt 11 („48 h danach“) wieder einen leichten Anstieg zu geben (s. Abbildung 5.18 und Abbildung 5.19).

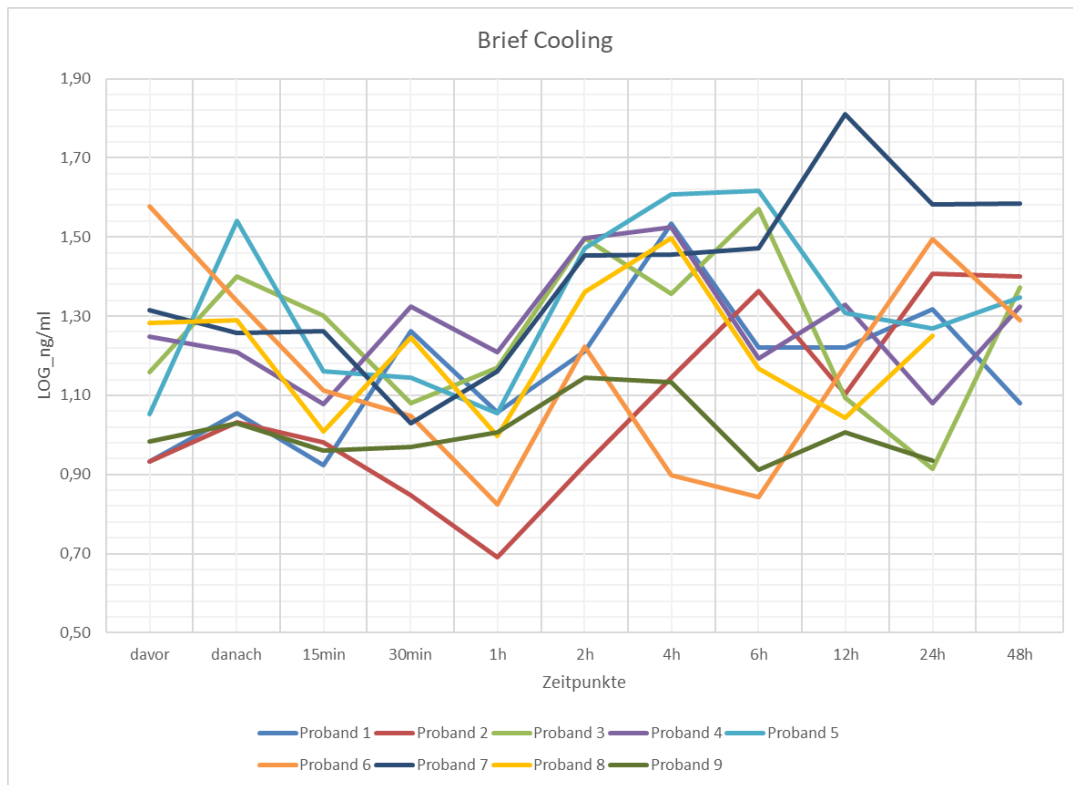


Abbildung 5.18: Liniendiagramme „Brief Cooling“-Studie Teil A

Die Liniendiagramme veranschaulichen den Verlauf der cfDNA-Werte der einzelnen Probanden über die verschiedenen Zeitpunkte der „Brief Cooling“-Studie hinweg. Die Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen.

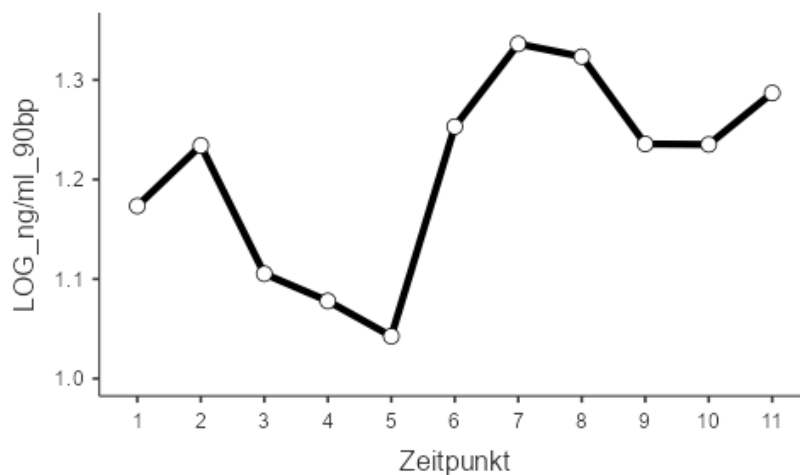


Abbildung 5.19: Liniendiagramm „Brief Cooling“-Studie Teil B

Illustriert ist der Verlauf der Zeitpunkte aller Probanden der „Brief Cooling“-Studie im Liniendiagramm mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „15 min danach“, 4= „30 min danach“, 5= „1 h danach“, 6= „2 h danach“, 7= „4 h danach“, 8= „6 h danach“, 9= „12 h danach“, 10= „24 h danach“, 11= „48 h danach“.

Die Boxplots geben einen Überblick über die Verteilung aller Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten einschließlich der Ausreißer (s. Abbildung 5.20).

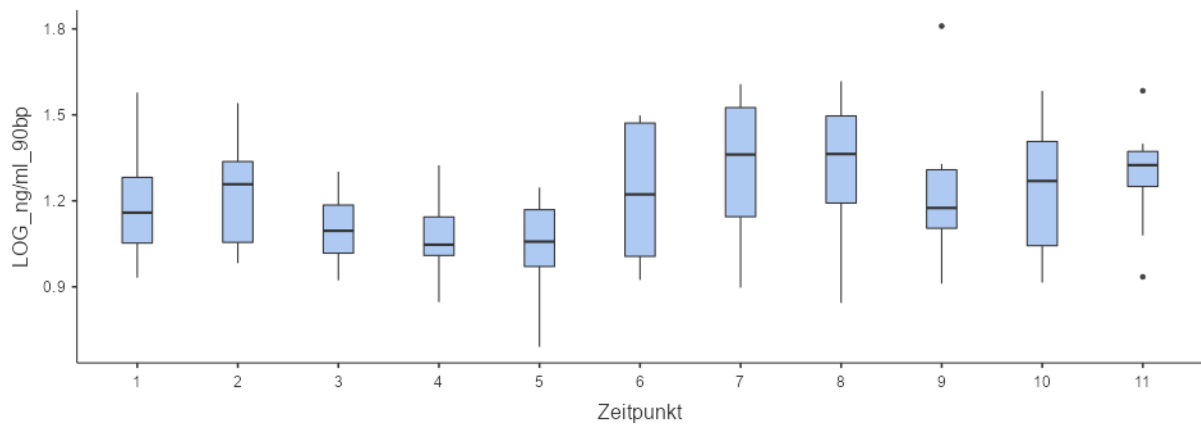


Abbildung 5.20: Boxplots „Brief Cooling“-Studie Zeitpunkte

Abgebildet sind die Boxplots der Zeitpunkte aller Probanden der „Brief Cooling“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „15 min danach“, 4= „30 min danach“, 5= „1 h danach“, 6= „2 h danach“, 7= „4 h danach“, 8= „6 h danach“, 9= „12 h danach“, 10= „24 h danach“, 11= „48 h danach“.

5.6 Studienergebnisse „Sleep Deprivation“

Als Stressfaktoren der „Sleep Deprivation“-Studie dienten der Schlafentzug und die Hitzeexposition in der Sauna. Zum Überblick der Studienergebnisse wurde zunächst die zusammenfassende Statistik der Bedingungen, Zeitpunkte, des Schlafs und der Sauna aufgeführt. Die Daten wurden dekadisch mit der Basis von 10 logarithmiert und mit Hilfe des 90-bp-Primers gemessen. Das Signifikanzniveau wurde unverändert auf 5 % festgelegt (s. Tabelle 5.21).

Tabelle 5.21: Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie

Aufgeführt sind die Tabellen der zusammenfassenden Statistik der „Sleep Deprivation“-Studie mit allen logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Bedingungen: 1= regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf; 2= regulärer Tag, mit Sauna, 8 h Schlaf; 3= mentale Arbeit, keine Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 4= mentale Arbeit, mit Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 5= mentale Arbeit, keine Sauna, 0 h Schlaf; 6= mentale Arbeit, mit Sauna, 0 h Schlaf. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Schlaf: 1= 8 h; 2= 4 h bis 5 h; 3= 0 h. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Descriptives

	Bedingung	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	34	0	1.50	1.42	0.323	1.038	2.53	0.877	0.001
	2	34	0	1.32	1.34	0.181	0.915	1.60	0.964	0.308
	3	45	0	1.21	1.23	0.179	0.910	1.97	0.879	< .001
	4	53	0	1.27	1.30	0.233	0.823	1.68	0.966	0.137
	5	40	0	1.30	1.26	0.308	0.858	2.37	0.881	< .001
	6	35	0	1.34	1.34	0.208	0.914	1.89	0.985	0.909

Descriptives

	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	36	0	1.16	1.17	0.178	0.823	1.50	0.974	0.533
	2	36	0	1.25	1.26	0.175	0.882	1.59	0.981	0.788
	3	34	0	1.31	1.34	0.169	1.004	1.69	0.965	0.333
	4	32	0	1.36	1.29	0.257	0.897	2.13	0.926	0.030
	5	36	0	1.38	1.31	0.349	0.904	2.53	0.890	0.002
	6	34	0	1.45	1.45	0.257	1.079	2.37	0.851	< .001
	7	33	0	1.28	1.25	0.261	0.858	1.96	0.969	0.458

Descriptives

	Schlaf	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	68	0	1.41	1.38	0.276	0.915	2.53	0.889	< .001
	2	98	0	1.24	1.23	0.211	0.823	1.97	0.982	0.216
	3	75	0	1.32	1.31	0.265	0.858	2.37	0.922	< .001

Descriptives

	Sauna	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	122	0	1.30	1.33	0.213	0.823	1.89	0.985	0.209
	2	119	0	1.33	1.28	0.293	0.858	2.53	0.874	< .001

Für die grundsätzliche Illustration der Verteilung der cfDNA-Werte und der Ausreißer aller Probanden dienen die Boxplots, aufgeteilt nach Bedingungen, Zeitpunkten, Schlaf und Sauna (s. Abbildung 5.21).

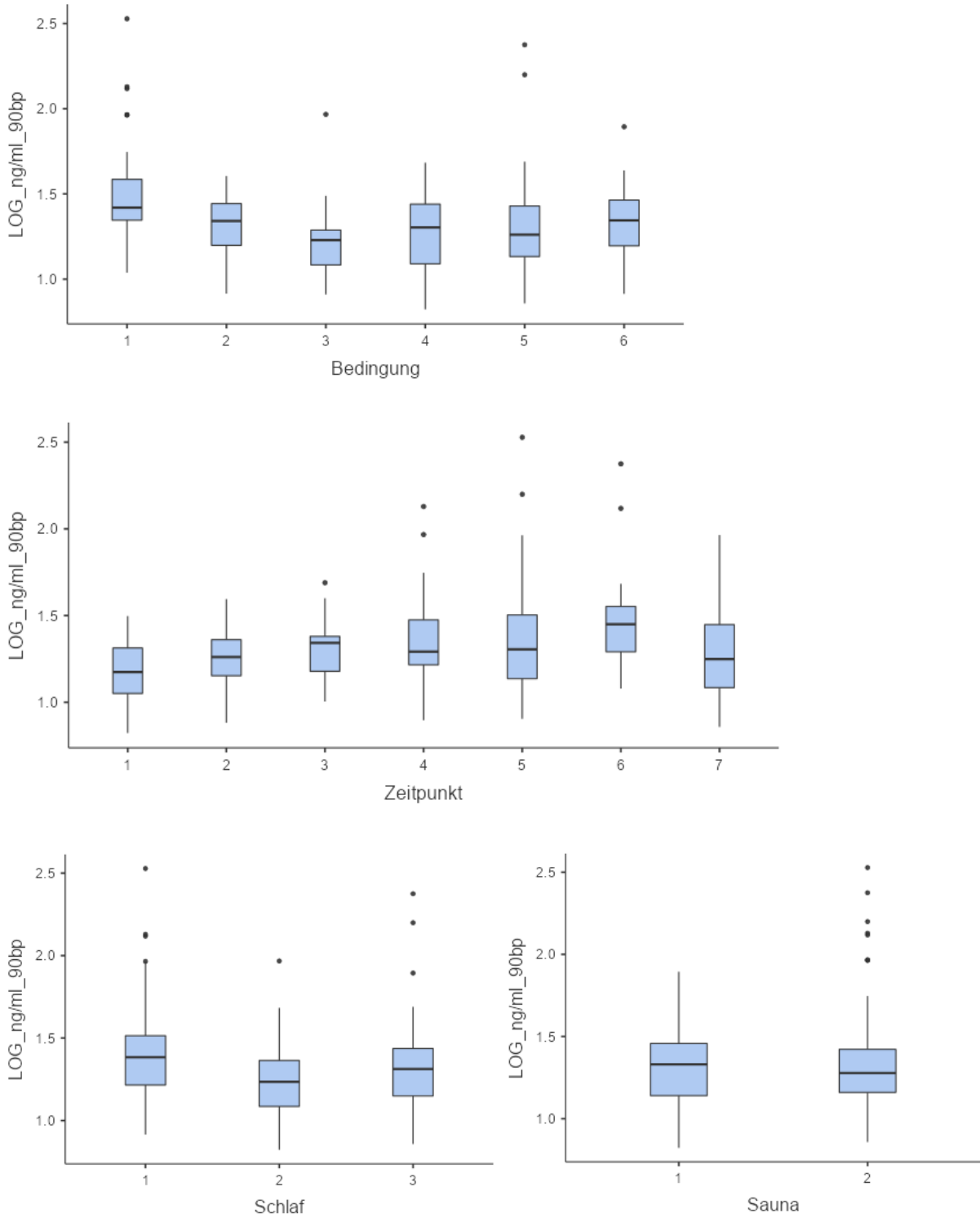


Abbildung 5.21: Boxplots „Sleep Deprivation“-Studie

Abgebildet sind die Boxplots der „Sleep Deprivation“-Studie, aufgeteilt nach Bedingungen, Zeitpunkten, Schlaf und Sauna über alle Probanden hinweg. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml. Bedingungen: 1= regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf; 2= regulärer Tag, mit Sauna, 8 h Schlaf; 3= mentale Arbeit, keine Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 4= mentale Arbeit, mit Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 5= mentale Arbeit, keine Sauna, 0 h Schlaf; 6= mentale Arbeit, mit Sauna, 0 h Schlaf. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Schlaf: 1= 8 h; 2= 4 h bis 5 h; 3= 0 h. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Zur statistischen Analyse wurde das gemischte Modell angewandt. Hierbei dienten einmal Bedingung und Zeitpunkt als Faktoren, sowie ein anderes Mal aufgeteilt Schlaf, Sauna und Zeitpunkt als Faktoren. Die Probanden waren immer die Clustervariable. Mit einem p-Wert von $< 0,05$ zeigte der Omnibus-Test, dass es einen signifikanten Unterschied bei den cfDNA-Messungen über die Bedingungen, Zeitpunkte und Schlaf sowie die Interaktion zwischen Sauna und Schlaf gab. Keine Auswirkungen schien die Sauna allein zu erzielen. Beim Vergleich Zeitpunkt 1 (erster Morgen) mit Zeitpunkt 2 (erster Abend) schien es keinen Unterschied zu machen, ob es ein regulärer Tag war oder mentale Arbeit verrichtet wurde. Erst die weiteren Zeitpunkte ergaben einen signifikanten Unterschied. Im Dunnett's Test bestätigte sich im Vergleich mit der Ausgangsbedingung 1 (regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf) und den anderen Bedingungen der zuvor im Omnibus-Test genannte signifikante Unterschied (p-Wert von $< 0,05$). Für die Hitzeexposition war im Dunnett's Test kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen Sauna „ja“ und „nein“ zu erkennen. Die Interaktion zwischen Schlaf und Sauna zeigte jedoch wieder einen Unterschied. Der Vergleich von Schlaf 1 (8 h) mit Schlaf 2 (4 h bis 5 h) ergab einen signifikanten Unterschied im Dunnett's Test, aber nicht der Vergleich von Schlaf 1 mit Schlaf 3 (0 h). Der fehlende signifikante Unterschied zwischen Schlaf 1 und Schlaf 3 erscheint physiologisch nicht plausibel (s. Tabelle 5.22).

Tabelle 5.22: Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie

Zu sehen sind die Modellergebnisse der „Sleep Deprivation“-Studie. Der Omnibus-Test zeigte mit einem p-Wert < 0,05 einen signifikanten Unterschied der Bedingungen, Zeitpunkte und Schlaf sowie die Interaktion zwischen Sauna und Schlaf an. Im Dunnett's Test war ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von < 0,05 beim Vergleich der Ausgangsbedingung mit den anderen Bedingungen zu erkennen. Bedingungen: 1= regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf; 2= regulärer Tag, mit Sauna, 8 h Schlaf; 3= mentale Arbeit, keine Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 4= mentale Arbeit, mit Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 5= mentale Arbeit, keine Sauna, 0 h Schlaf; 6= mentale Arbeit, mit Sauna, 0 h Schlaf. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Schlaf: 1= 8 h; 2= 4 h bis 5 h; 3= 0 h. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Bedingung	5.47	5	194	< .001
Zeitpunkt	8.35	6	192	< .001
Bedingung * Zeitpunkt	1.31	30	192	0.140

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.27693	0.0531	1.17287	1.38100	6.54	24.0498	< .001
Bedingung1	2 - 1	-0.18412	0.0487	-0.27966	-0.08858	191.51	-3.7771	< .001
Bedingung2	3 - 1	-0.23647	0.0477	-0.33002	-0.14293	195.39	-4.9545	< .001
Bedingung3	4 - 1	-0.14196	0.0465	-0.23308	-0.05084	195.71	-3.0534	0.003
Bedingung4	5 - 1	-0.13934	0.0479	-0.23324	-0.04544	193.63	-2.9084	0.004
Bedingung5	6 - 1	-0.16558	0.0483	-0.26026	-0.07090	191.50	-3.4275	< .001

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	7.86	6	221	< .001
Sauna	2.08	1	222	0.151
Schlaf	4.52	2	227	0.012
Sauna * Schlaf	9.25	2	224	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.2776	0.0523	1.17498	1.38012	6.50	24.41	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0872	0.0482	-0.00734	0.18167	221.44	1.81	0.072
Zeitpunkt2	3 - 1	0.1438	0.0489	0.04784	0.23971	221.46	2.94	0.004
Zeitpunkt3	4 - 1	0.1987	0.0498	0.10117	0.29627	221.49	3.99	< .001
Zeitpunkt4	5 - 1	0.2165	0.0482	0.12197	0.31098	221.44	4.49	< .001
Zeitpunkt5	6 - 1	0.2989	0.0489	0.20300	0.39487	221.45	6.11	< .001
Zeitpunkt6	7 - 1	0.1193	0.0494	0.02253	0.21599	221.49	2.42	0.016
Sauna1	2 - 1	0.0386	0.0268	-0.01386	0.09100	221.56	1.44	0.151
Schlaf1	2 - 1	-0.1052	0.0350	-0.17389	-0.03652	228.17	-3.00	0.003
Schlaf2	3 - 1	-0.0592	0.0347	-0.12716	0.00871	222.77	-1.71	0.089
Sauna1 * Schlaf1	2 - 1 * 2 - 1	-0.2805	0.0652	-0.40824	-0.15266	222.37	-4.30	< .001
Sauna1 * Schlaf2	2 - 1 * 3 - 1	-0.1537	0.0693	-0.28958	-0.01774	222.78	-2.22	0.028

Für den ersten Überblick über die cfDNA-Verteilung der verschiedenen Bedingungen eignet sich das Liniendiagramm. Am zweiten Abend nach Erholung beziehungsweise Sauna (Zeitpunkt 6) wurden generell höhere cfDNA-Werte als am ersten Abend nach Erholung beziehungsweise Sauna (Zeitpunkt 3) gemessen. Zudem scheint der Schlafentzug bei Bedingung 3 und 4 (mit 4 h bis 5 h Schlaf) sowie Bedingung 5 und 6 (mit 0 h Schlaf) im Vergleich zum Ausgangswert eine ansteigende Auswirkung auf die cfDNA zu haben. Beides lässt Reaktionen im Sinne einer Stressantwort mutmaßen. Der Gipfel von Bedingung 1 (regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf) bei Zeitpunkt 5 könnte aufgrund der zuvor im Boxplot gesehenen Ausreißer resultieren (s. Abbildung 5.22).

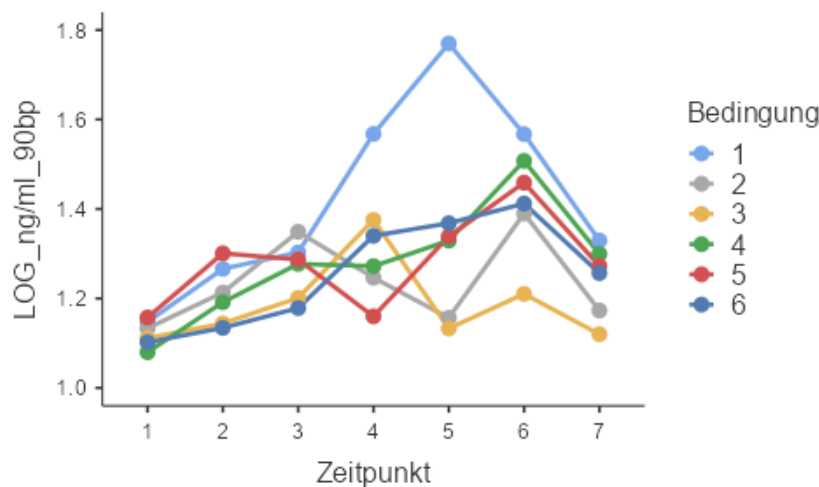


Abbildung 5.22: Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie Bedingungen

Das Liniendiagramm der „Sleep Deprivation“-Studie veranschaulicht die verschiedenen Bedingungen über die Zeitpunkte hinweg. Die cfDNA-Werte sind logarithmiert und gemessen in ng/ml. Bedingungen: 1= regulärer Tag, keine Sauna, 8 h Schlaf; 2= regulärer Tag, mit Sauna, 8 h Schlaf; 3= mentale Arbeit, keine Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 4= mentale Arbeit, mit Sauna, 4 h bis 5 h Schlaf; 5= mentale Arbeit, keine Sauna, 0 h Schlaf; 6= mentale Arbeit, mit Sauna, 0 h Schlaf. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen.

Im weiteren Verlauf wurde zur besseren Übersicht für die statistische Analyse und Ergebnisinterpretation die Studie in drei Hauptblöcke unterteilt. Block 1 befasst sich mit den normalen 8 h Schlaf, Block 2 mit dem partiellen Schlafentzug (4 h bis 5 h Schlaf) und Block 3 mit dem totalen Schlafentzug (0 h Schlaf). Innerhalb dieser Blöcke kann jeweils Sauna mit Erholung (keine Sauna) verglichen werden. In den gemischten Modellen wurden dabei Sauna und Zeitpunkt als Faktoren sowie Proband als Clustervariable verwendet.

Zunächst zeigt im Block 1 die zusammenfassende Statistik die cfDNA-Werte, welche nach dem Shapiro-Wilk-Test mit p-Werten von $> 0,05$ normalverteilt waren (s. Tabelle 5.23).

Tabelle 5.23: Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf

Zu sehen ist die zusammenfassende Statistik der „Sleep Deprivation“-Studie mit 8 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna (1= ja; 2= nein). Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml und waren nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (p -Wert $> 0,05$). Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

LOG_ng/ml_90bp	Sauna	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
										W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	1	5	0	1.21	1.20	0.1437	1.066	1.41	0.938	0.649
		2	5	0	1.29	1.24	0.1569	1.115	1.51	0.956	0.782
		3	5	0	1.43	1.38	0.1322	1.266	1.60	0.949	0.730
		4	4	0	1.31	1.25	0.2082	1.126	1.60	0.878	0.328
		5	5	0	1.24	1.20	0.1715	1.054	1.43	0.876	0.293
		6	5	0	1.47	1.47	0.0662	1.384	1.55	0.977	0.915
		7	5	0	1.25	1.24	0.2636	0.915	1.57	0.975	0.904
	2	1	5	0	1.23	1.21	0.0713	1.155	1.35	0.830	0.140
		2	5	0	1.35	1.35	0.1215	1.194	1.53	0.969	0.867
		3	5	0	1.38	1.35	0.0500	1.346	1.45	0.777	0.052
		4	5	0	1.65	1.51	0.3000	1.388	2.13	0.869	0.263
		5	5	0	1.85	1.68	0.4251	1.418	2.53	0.910	0.466
		6	4	0	1.65	1.54	0.3180	1.421	2.12	0.822	0.149
		7	5	0	1.41	1.38	0.3696	1.038	1.96	0.940	0.667

Die Boxplots veranschaulichen die Datenverteilung über die Zeitpunkte, aufgeteilt nach Erholung beziehungsweise Sauna (s. Abbildung 5.23).

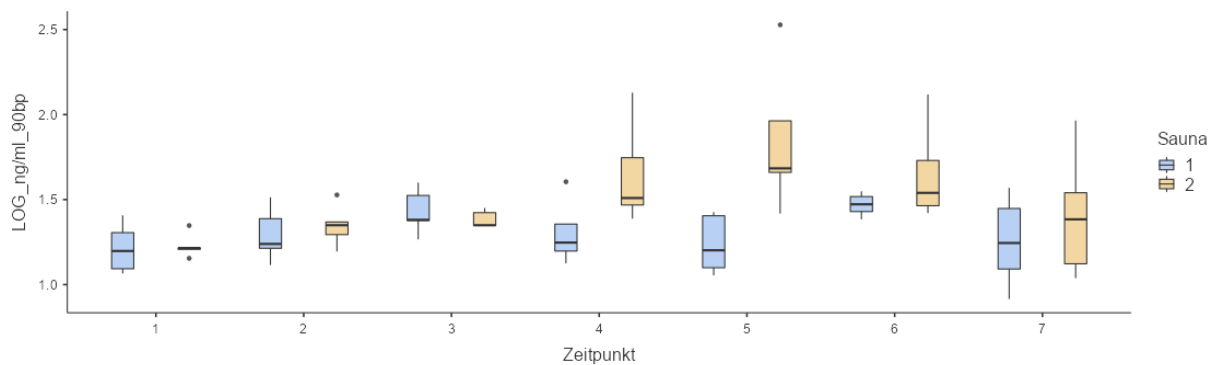


Abbildung 5.23: Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf

Dargestellt sind die Boxplots der „Sleep Deprivation“-Studie mit 8 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Bei den Modellergebnissen ergab der Omnibus-Test mit einem p -Wert von $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied für Sauna und Zeitpunkt sowie die Interaktion zwischen Sauna und Zeitpunkt. Im Vergleich beim Dunnett's Test konnte durch die Hitzeexposition „Sauna“ der signifikante Unterschied zur Erholung mit einem p -Wert von $< 0,05$ bestätigt werden (s. Tabelle 5.24).

Tabelle 5.24: Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf

Aufgeführt sind die Modellergebnisse der „Sleep Deprivation“-Studie mit 8 h Schlaf. Der Omnibus-Test ergab mit einem p -Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied der Sauna, der Zeitpunkte sowie der Interaktion zwischen Sauna und Zeitpunkt. Im Dunnett's Test wurde ein signifikanter Unterschied mit p -Werten von $< 0,05$ angezeigt. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Sauna	11.71	1	50.1	0.001
Zeitpunkt	3.10	6	50.1	0.012
Sauna * Zeitpunkt	2.54	6	50.1	0.032

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4095	0.0348	1.3413	1.478	3.91	40.516	< .001
Sauna1	2 - 1	0.1859	0.0543	0.0795	0.292	50.12	3.423	0.001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0993	0.0998	-0.0963	0.295	49.92	0.995	0.324
Zeitpunkt2	3 - 1	0.1856	0.0998	-0.0101	0.381	49.92	1.859	0.069
Zeitpunkt3	4 - 1	0.2617	0.1030	0.0599	0.463	50.19	2.541	0.014
Zeitpunkt4	5 - 1	0.3230	0.0998	0.1274	0.519	49.92	3.237	0.002
Zeitpunkt5	6 - 1	0.3396	0.1030	0.1378	0.541	50.19	3.298	0.002
Zeitpunkt6	7 - 1	0.1109	0.0998	-0.0848	0.306	49.92	1.111	0.272
Sauna1 * Zeitpunkt1	2 - 1 * 2 - 1	0.0388	0.1996	-0.3524	0.430	49.92	0.194	0.847
Sauna1 * Zeitpunkt2	2 - 1 * 3 - 1	-0.0602	0.1996	-0.4514	0.331	49.92	-0.302	0.764
Sauna1 * Zeitpunkt3	2 - 1 * 4 - 1	0.3171	0.2059	-0.0865	0.721	50.19	1.540	0.130
Sauna1 * Zeitpunkt4	2 - 1 * 5 - 1	0.5990	0.1996	0.2078	0.990	49.92	3.001	0.004
Sauna1 * Zeitpunkt5	2 - 1 * 6 - 1	0.1661	0.2059	-0.2375	0.570	50.19	0.807	0.424
Sauna1 * Zeitpunkt6	2 - 1 * 7 - 1	0.1422	0.1996	-0.2490	0.533	49.92	0.713	0.479

Verdeutlicht wird die Dynamik der cfDNA-Werte nach der Hitzeexposition im Liniendiagramm durch die blaue Linie „Sauna 1“ (ja) mit dem zweigipfligen Verlauf und Anstieg der cfDNA am ersten und zweiten Abend nach der Sauna (Zeitpunkte 3 und 6). Der Verlauf der Linie mit Erholung beziehungsweise ohne Sauna und dem Anstieg bei Zeitpunkt 5 ist gegebenenfalls der zu kleinen Stichprobe und der zu hohen Varianz mit Ausreißern zuzuschreiben (s. Abbildung 5.24).

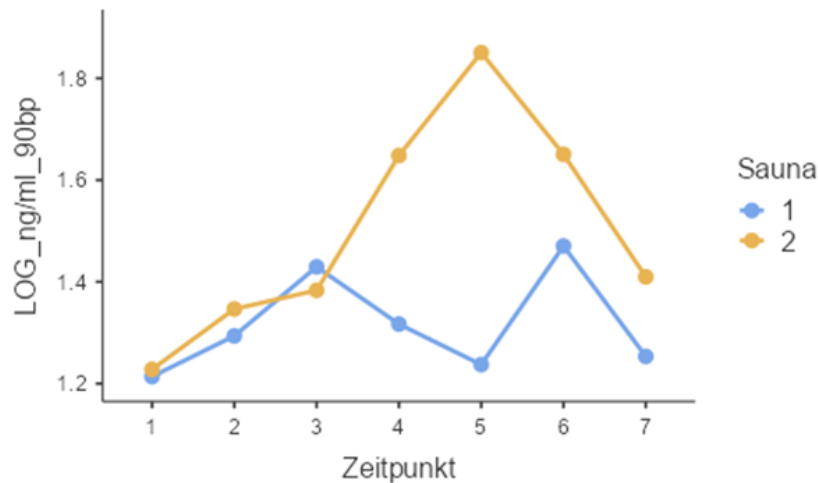


Abbildung 5.24: Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 8 h Schlaf

Den Verlauf der cfDNA-Werte der „Sleep Deprivation“-Studie mit 8 h Schlaf über die Zeitpunkte hinweg illustriert die blaue Linie mit Anstieg jeweils nach der Hitzeexposition (Sauna 1= ja; Sauna 2= nein). Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen.

Im zweiten Block mit partiellem Schlafentzug (4 h bis 5 h Schlaf) wird in der zusammenfassenden Statistik erneut die Verteilung der cfDNA-Daten dargestellt (s. Tabelle 5.25).

Tabelle 5.25: Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf

Zu sehen ist die zusammenfassende Statistik der „Sleep Deprivation“-Studie mit 4 h bis 5 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna (1= ja; 2= nein). Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml. Nach dem Shapiro-Wilk-Test waren p-Werte mit > 0,05 normalverteilt. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen.

Descriptives

	Sauna	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
										W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	1	8	0	1.08	1.05	0.219	0.823	1.44	0.930	0.519
		2	8	0	1.19	1.22	0.214	0.882	1.48	0.941	0.621
		3	8	0	1.28	1.27	0.177	1.004	1.58	0.961	0.820
		4	8	0	1.27	1.26	0.195	1.019	1.52	0.925	0.472
		5	8	0	1.33	1.37	0.260	0.904	1.64	0.949	0.700
		6	7	0	1.48	1.54	0.169	1.171	1.68	0.929	0.544
		7	6	0	1.27	1.27	0.264	0.924	1.66	0.966	0.861
	2	1	7	0	1.15	1.21	0.148	0.919	1.35	0.951	0.742
		2	7	0	1.18	1.22	0.148	0.938	1.34	0.927	0.523
		3	6	0	1.22	1.22	0.175	1.037	1.49	0.923	0.529
		4	5	0	1.39	1.27	0.323	1.199	1.97	0.648	0.003
		5	7	0	1.17	1.20	0.119	1.028	1.32	0.898	0.318
		6	7	0	1.25	1.26	0.130	1.079	1.44	0.924	0.499
		7	6	0	1.16	1.22	0.175	0.910	1.37	0.909	0.433

Die Boxplots veranschaulichen die Datenverteilung über die Zeitpunkte, aufgeteilt nach Erholung beziehungsweise Sauna (s. Abbildung 5.25).

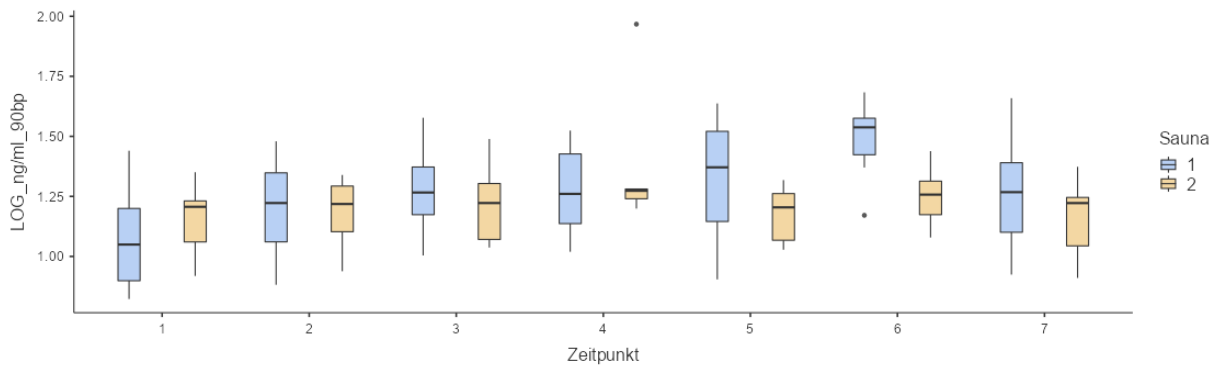


Abbildung 5.25: Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf

Dargestellt sind die Boxplots der „Sleep Deprivation“-Studie mit 4 h bis 5 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Die Modellergebnisse des partiellen Schlafentzuges ergaben im Omnibus-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied für Sauna und Zeitpunkt sowie die Interaktion von Sauna und Zeitpunkt. Im Vergleich beim Dunnett's Test konnte durch die Hitzeexposition „Sauna“ wieder ein signifikanter Unterschied zur Erholung mit einem p-Wert von $< 0,05$ bestätigt werden. Beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 (erster Morgen) mit Zeitpunkt 2 (erster Abend) zeigte sich erwartungsgemäß kein Unterschied, da keine Intervention wie Hitzeexposition oder Schlafentzug erfolgte. Für die weiteren Zeitpunktvergleiche konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was für eine Reaktion der cfDNA-Werte auf die Stressoren „Hitze“ und „Schlafentzug“ spricht. Beim letzten Zeitpunkt 7 (dritter Morgen) gab es kaum noch einen Unterschied. Die Probanden erholten sich hier wieder mit 8 h Schlaf (s. Tabelle 5.26).

Tabelle 5.26: Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf

Aufgeführt sind die Modellergebnisse der „Sleep Deprivation“-Studie mit 4 h bis 5 h Schlaf. Der Omnibus-Test zeigte mit einem p -Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied der Sauna, der Zeitpunkte sowie der Interaktion zwischen Sauna und Zeitpunkt an. Im Dunnett's Test war ein signifikanter Unterschied mit einem p -Wert von $< 0,05$ beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit den Zeitpunkten 3 bis 6 zu erkennen. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Sauna	12.89	1	77.7	$< .001$
Zeitpunkt	5.58	6	76.8	$< .001$
Sauna * Zeitpunkt	3.13	6	76.8	0.008

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.2268	0.0584	1.1125	1.3412	6.75	21.025	$< .001$
Sauna1	2 - 1	-0.1035	0.0288	-0.1600	-0.0470	77.74	-3.591	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0723	0.0500	-0.0257	0.1703	76.74	1.446	0.152
Zeitpunkt2	3 - 1	0.1395	0.0512	0.0392	0.2399	76.78	2.726	0.008
Zeitpunkt3	4 - 1	0.2105	0.0528	0.1070	0.3140	76.82	3.987	$< .001$
Zeitpunkt4	5 - 1	0.1354	0.0500	0.0374	0.2334	76.74	2.709	0.008
Zeitpunkt5	6 - 1	0.2599	0.0509	0.1601	0.3596	76.77	5.106	$< .001$
Zeitpunkt6	7 - 1	0.1034	0.0531	-7.67e-4	0.2075	76.80	1.946	0.055
Sauna1 * Zeitpunkt1	2 - 1 * 2 - 1	-0.0792	0.1000	-0.2752	0.1168	76.74	-0.792	0.431
Sauna1 * Zeitpunkt2	2 - 1 * 3 - 1	-0.1157	0.1024	-0.3164	0.0850	76.78	-1.130	0.262
Sauna1 * Zeitpunkt3	2 - 1 * 4 - 1	0.0364	0.1056	-0.1706	0.2434	76.82	0.345	0.731
Sauna1 * Zeitpunkt4	2 - 1 * 5 - 1	-0.2281	0.1000	-0.4241	-0.0322	76.74	-2.282	0.025
Sauna1 * Zeitpunkt5	2 - 1 * 6 - 1	-0.3225	0.1018	-0.5220	-0.1230	76.77	-3.168	0.002
Sauna1 * Zeitpunkt6	2 - 1 * 7 - 1	-0.2328	0.1065	-0.4416	-0.0241	76.86	-2.186	0.032

Verdeutlicht wird die Dynamik der cfDNA-Werte nach dem partiellen Schlafentzug (nur 4 h bis 5 h Schlaf) durch das Liniendiagramm. Zu erkennen sind cfDNA-Anstiege bei Zeitpunkt 4 (zweiter Morgen) nach dem Schlafentzug. Der zusätzliche Stressor „Hitzeexposition“, gekennzeichnet durch die blaue Linie „Sauna 1“ (ja), schien vor allem nach der Sauna am zweiten Abend zu einem noch höheren Anstieg von cfDNA-Werten zu führen. Insgesamt zeigten die Probanden mit beiden Stressoren (Schlafentzug und Sauna) höhere cfDNA-Werte. Trotz 8 h Schlaf in der zweiten Nacht hatten sie sich am dritten Morgen (Zeitpunkt 7) nicht ganz erholt. Der cfDNA-Wert war noch nicht auf das Ausgangsniveau gefallen (s. Abbildung 5.26).

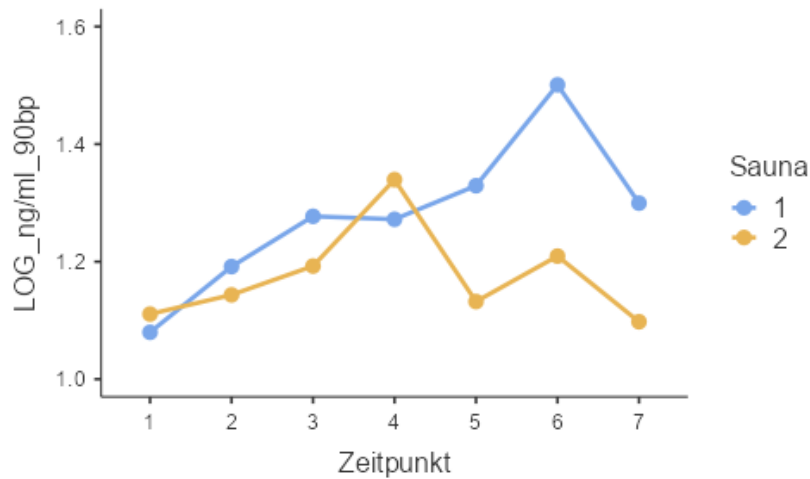


Abbildung 5.26: Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 4 h bis 5 h Schlaf

Den Verlauf der cfDNA-Werte der „Sleep Deprivation“-Studie mit 4 h bis 5 h Schlaf über die Zeitpunkte hinweg illustrieren die Linien mit Sauna 1 (ja) und Sauna 2 (nein). Zu erkennen sind die Anstiege bei Zeitpunkt 4 und vor allem beim Zeitpunkt 6 der blauen Linie. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen.

Schließlich repräsentiert der dritte Block den totalen Schlafentzug (0 h Schlaf). Zunächst zeigt wieder die zusammenfassende Statistik die Verteilung der cfDNA-Daten (s. Tabelle 5.27).

Tabelle 5.27: Zusammenfassende Statistik „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf

Zu sehen ist die zusammenfassende Statistik der „Sleep Deprivation“-Studie mit 0 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna (1= ja; 2= nein). Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden gemessen in ng/ml. Nach dem Shapiro-Wilk-Test sind p-Werte mit $> 0,05$ normalverteilt. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Descriptives										Shapiro-Wilk	
	Sauna	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	1	5	0	1.18	1.14	0.208	0.914	1.42	0.946	0.710
		2	5	0	1.21	1.19	0.159	1.016	1.43	0.986	0.965
		3	5	0	1.26	1.30	0.122	1.072	1.37	0.900	0.410
		4	5	0	1.42	1.38	0.141	1.256	1.63	0.950	0.734
		5	5	0	1.45	1.38	0.288	1.130	1.89	0.953	0.758
		6	5	0	1.49	1.51	0.106	1.329	1.61	0.953	0.756
		7	5	0	1.34	1.33	0.247	0.988	1.64	0.988	0.974
	2	1	6	0	1.18	1.15	0.232	0.868	1.50	0.980	0.951
		2	6	0	1.32	1.33	0.208	0.983	1.59	0.965	0.861
		3	5	0	1.30	1.33	0.255	1.038	1.69	0.926	0.567
		4	5	0	1.18	1.24	0.166	0.897	1.29	0.795	0.073
		5	6	0	1.36	1.23	0.442	0.932	2.20	0.829	0.105
		6	6	0	1.48	1.29	0.461	1.160	2.37	0.745	0.018
		7	6	0	1.29	1.41	0.292	0.858	1.60	0.876	0.253

Die Boxplots veranschaulichen die Datenverteilung über die Zeitpunkte, aufgeteilt nach Erholung beziehungsweise Sauna (s. Abbildung 5.27).

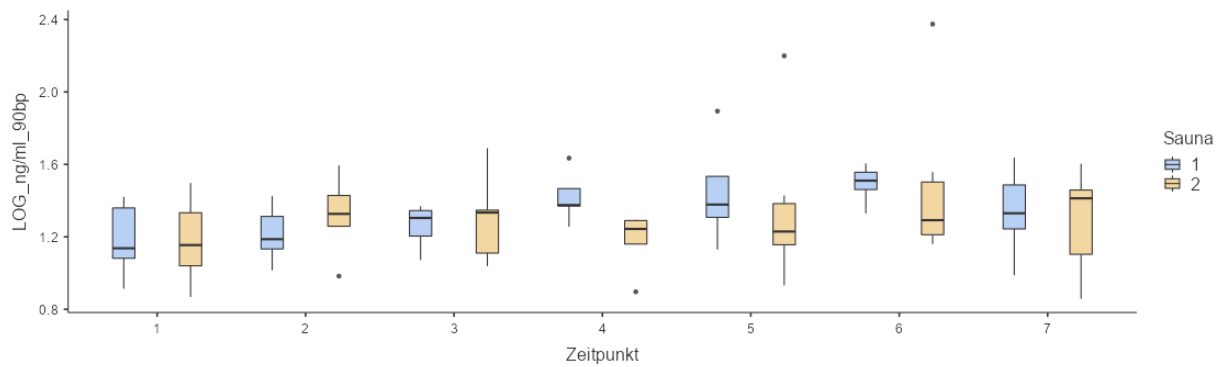


Abbildung 5.27: Boxplot „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf

Dargestellt sind die Boxplots der „Sleep Deprivation“-Studie mit 0 h Schlaf, aufgeteilt nach Zeitpunkten und Sauna. Die cfDNA-Werte wurden logarithmiert und in ng/ml gemessen. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Die Modellergebnisse des totalen Schlafentzuges ergaben im Omnibus-Test mit einem p-Wert von $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied für Sauna, Zeitpunkt oder die Interaktion zwischen Sauna und Zeitpunkt. Auch durch den Dunnett's Test konnte die Hitzeexposition „Sauna“ keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Erholung aufzeigen. Der Stressor „0 h Schlaf“ schien zu überwiegen, sodass die Intervention mit Sauna keinen Unterschied mehr ausmachte (s. Tabelle 5.28).

Tabelle 5.28: Modellergebnisse „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf

Aufgeführt sind die Modellergebnisse der „Sleep Deprivation“-Studie mit 0 h Schlaf. Der Omnibus-Test und Dunnett's Test zeigten mit einem p -Wert $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied an. Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen. Sauna: 1= ja; 2= nein.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Sauna	0.0806	1	57.8	0.778
Zeitpunkt	1.8819	6	54.9	0.100
Sauna * Zeitpunkt	0.5565	6	54.9	0.763

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.29516	0.0658	1.1663	1.424	4.03	19.6926	< .001
Sauna1	2 - 1	0.01621	0.0571	-0.0957	0.128	57.82	0.2839	0.778
Zeitpunkt1	2 - 1	0.08776	0.1016	-0.1114	0.287	54.90	0.8635	0.392
Zeitpunkt2	3 - 1	0.10354	0.1041	-0.1005	0.308	54.99	0.9948	0.324
Zeitpunkt3	4 - 1	0.12081	0.1041	-0.0832	0.325	54.99	1.1607	0.251
Zeitpunkt4	5 - 1	0.22365	0.1016	0.0244	0.423	54.90	2.2005	0.032
Zeitpunkt5	6 - 1	0.30562	0.1016	0.1064	0.505	54.90	3.0069	0.004
Zeitpunkt6	7 - 1	0.13495	0.1016	-0.0643	0.334	54.90	1.3278	0.190
Sauna1 * Zeitpunkt1	2 - 1 * 2 - 1	0.11116	0.2033	-0.2873	0.510	54.90	0.5468	0.587
Sauna1 * Zeitpunkt2	2 - 1 * 3 - 1	0.05432	0.2082	-0.3537	0.462	54.99	0.2609	0.795
Sauna1 * Zeitpunkt3	2 - 1 * 4 - 1	-0.23420	0.2082	-0.6422	0.174	54.99	-1.1251	0.265
Sauna1 * Zeitpunkt4	2 - 1 * 5 - 1	-0.08488	0.2033	-0.4833	0.314	54.90	-0.4175	0.678
Sauna1 * Zeitpunkt5	2 - 1 * 6 - 1	-0.00873	0.2033	-0.4071	0.390	54.90	-0.0429	0.966
Sauna1 * Zeitpunkt6	2 - 1 * 7 - 1	-0.03930	0.2033	-0.4377	0.359	54.90	-0.1933	0.847

Durch das Liniendiagramm wird die Dynamik der cfDNA-Werte nach dem totalen Schlafentzug (0 h Schlaf) veranschaulicht. Zu erkennen ist ein Anstieg von der blauen Linie „Sauna 1“ (ja) nach der Hitzeexposition sowie ein sehr deutlicher Anstieg von cfDNA nach dem totalen Schlafentzug bei Zeitpunkt 4 (zweiter Morgen). Eine weitere Steigerung der cfDNA-Werte wurde durch die wiederholte Hitzeexposition (Sauna) am zweiten Abend erreicht (Zeitpunkt 6), was eine abermalige Stressreaktion anzeigt. Insgesamt scheinen die Probanden sich nach dem Schlafentzug selbst nach der zweiten Nacht mit 8 h Schlaf (Zeitpunkt 7= dritter Morgen) noch nicht vollständig erholt zu haben. Der cfDNA-Wert war noch nicht auf das Ausgangsniveau gefallen. Der Verlauf der gelben Linie mit Erholung (ohne Sauna) sowie den erkennbaren Tief- und Höhepunkten ist möglicherweise auf die kleine Stichprobe und die durch Ausreißer bedingte hohe Varianz zurückzuführen (s. Abbildung 5.28).

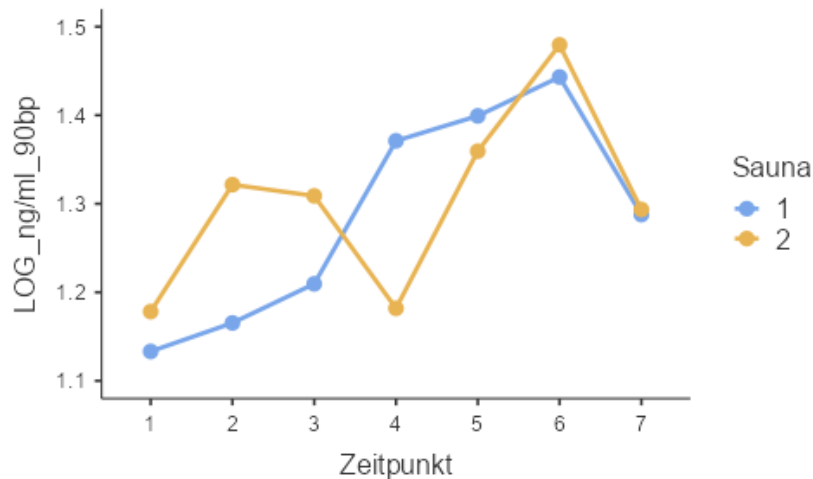


Abbildung 5.28: Liniendiagramm „Sleep Deprivation“-Studie 0 h Schlaf

Den Verlauf der cfDNA-Werte der „Sleep Deprivation“-Studie mit 0 h Schlaf über die Zeitpunkte hinweg illustrieren die Linien mit Sauna 1= ja und Sauna 2= nein. Zu erkennen ist im Verlauf der blauen Linie „Sauna 1“ der deutliche cfDNA-Anstieg bei Zeitpunkt 3 (nach Sauna) und 4 (nach Schlafentzug) sowie Zeitpunkt 6 (nach wiederholter Saunaexposition). Zeitpunkte: 1= erster Morgen, 2= erster Abend, 3= erster Abend nach Erholung/Sauna, 4= zweiter Morgen, 5= zweiter Abend, 6= zweiter Abend nach Erholung/Sauna, 7= dritter Morgen.

5.7 Studienergebnisse „Drop Jump“

Die Studienergebnisse der „Drop Jump“-Studie wurden mit Hilfe des gemischten Modells ermittelt. Als Faktor diente der Zeitpunkt und als Clustervariable die Probanden. Die Daten wurden wieder dekadisch mit der Basis von 10 logarithmiert und mit Hilfe des 90-bp-Primers gemessen. Das Signifikanzniveau war wieder auf 5 % festgelegt. Die zusammenfassende Statistik stellt die Datenverteilung über die Zeitpunkte dar (s. Tabelle 5.29).

Tabelle 5.29: Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie

Die Tabelle stellt die zusammenfassende Statistik der Zeitpunkte der „Drop Jump“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten dar, gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Descriptives

	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	12	0	0.866	0.870	0.212	0.462	1.17	0.972	0.927
	2	14	0	0.942	0.955	0.189	0.689	1.23	0.910	0.156
	3	14	0	1.460	1.453	0.194	1.067	1.81	0.977	0.954
	4	12	0	1.331	1.367	0.238	0.952	1.71	0.950	0.635
	5	14	0	1.055	1.039	0.197	0.768	1.51	0.955	0.641
	6	14	0	1.087	1.049	0.275	0.721	1.61	0.943	0.460
	7	14	0	1.178	1.166	0.247	0.727	1.60	0.983	0.990
	8	14	0	1.261	1.298	0.243	0.768	1.67	0.975	0.940
	9	14	0	1.185	1.154	0.463	0.479	2.00	0.959	0.703
	10	14	0	1.206	1.105	0.431	0.550	2.24	0.947	0.513
	11	14	0	1.449	1.242	0.596	0.719	2.73	0.881	0.059
	12	14	0	1.151	1.055	0.463	0.563	2.54	0.787	0.003

Mit einem p-Wert von $< 0,05$ zeigte beim gemischten Modell der Omnibus-Test, dass es einen Unterschied bei den cfDNA-Messungen über die Zeitpunkte gab. Um den besseren Verlauf der Unterschiede zu beurteilen, wurde wieder der Dunnett's Test mit den Vergleichen des Ausgangswertes 1 („davor 15 min“) mit den nachfolgenden Zeitpunkten angewandt. Wie zu erwarten, bestand kein Unterschied von Zeitpunkt 1 auf Zeitpunkt 2 („davor“). Ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert $< 0,05$ wurde in Zeitpunkt 3 („danach“) und Zeitpunkt 4 („5 min danach“) als Sofortreaktion auf die „Drop Jumps“ gesehen. Die Zeitpunkte 5 („45 min danach“) und Zeitpunkt 6 („90 min danach“) zeigten keinen Unterschied beziehungsweise Anstieg. Erst die Zeitpunkte 7 („6 h danach“), Zeitpunkt 8 („12 h danach“), Zeitpunkt 9 („24 h danach“), Zeitpunkt 10 („48 h danach“), Zeitpunkt 11 („72 h danach“) sowie Zeitpunkt 12 („96 h danach“) wurden als Spätfolge der „Drop Jumps“ mit einem p-Wert von $< 0,05$ wieder signifikant (s. Tabelle 5.30).

Tabelle 5.30: Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie

Aufgeführt sind die Modellergebnisse der „Drop Jump“-Studie. Der Omnibus-Test zeigte mit einem p -Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte an. Im Dunnett's Test zeigte sich beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit den Zeitpunkten 3 und 4 ein signifikanter Unterschied (p -Wert von $< 0,05$) als Ausdruck der Sofortreaktion. Ein signifikanter Unterschied (p -Wert von $< 0,05$) war zudem bei den Zeitpunkten 7–12 nachweisbar, was eine Spätfolge der „Drop Jumps“ widerspiegelt. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	6.06	11	139	$< .001$

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.1872	0.0614	1.0668	1.308	13.0	19.330	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.0392	0.1046	-0.1658	0.244	139.2	0.375	0.708
Zeitpunkt2	3 - 1	0.5569	0.1046	0.3519	0.762	139.2	5.325	$< .001$
Zeitpunkt3	4 - 1	0.4647	0.1082	0.2527	0.677	139.0	4.296	$< .001$
Zeitpunkt4	5 - 1	0.1520	0.1046	-0.0530	0.357	139.2	1.454	0.148
Zeitpunkt5	6 - 1	0.1834	0.1046	-0.0216	0.388	139.2	1.754	0.082
Zeitpunkt6	7 - 1	0.2749	0.1046	0.0699	0.480	139.2	2.628	0.010
Zeitpunkt7	8 - 1	0.3574	0.1046	0.1524	0.562	139.2	3.417	$< .001$
Zeitpunkt8	9 - 1	0.2822	0.1046	0.0772	0.487	139.2	2.698	0.008
Zeitpunkt9	10 - 1	0.3031	0.1046	0.0981	0.508	139.2	2.898	0.004
Zeitpunkt10	11 - 1	0.5453	0.1046	0.3403	0.750	139.2	5.214	$< .001$
Zeitpunkt11	12 - 1	0.2475	0.1046	0.0425	0.453	139.2	2.367	0.019

Zur weiteren Veranschaulichung wurde das Liniendiagramm über die Zeitpunkte aller Probanden hinweg eingefügt. Hierbei sind die zuvor im Dunnett's Test beschriebenen signifikanten Unterschiede der cfDNA als Anstiege und Abfälle zu sehen. Ein großer Anstieg der cfDNA-Werte mit Höchstwert ist beim Zeitpunkt 3 als Sofortreaktion auf die „Drop Jumps“ verzeichnet. Zudem weist Zeitpunkt 4 ein ähnlich hohes Niveau der cfDNA-Werte auf. Die Spätreaktion zeigt sich in einem erneuten signifikanten Unterschied ab Zeitpunkt 7 bis 12 mit einem zweigipfligen Anstieg, dessen Höhepunkte bei Zeitpunkt 8 und 11 liegen. Der Zeitpunkt 11 mit 72 h danach scheint ungefähr genauso hohe cfDNA-Werte wie Zeitpunkt 3 direkt nach den „Drop Jumps“ aufzuweisen (s. Abbildung 5.29).

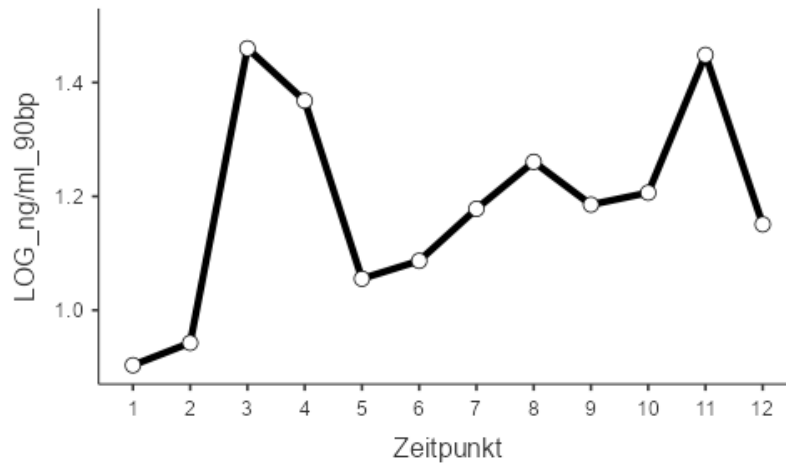


Abbildung 5.29: Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie Zeitpunkte

Dargestellt ist der Verlauf der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie im Liniendiagramm mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Zu erkennen sind die Zeitpunkte 3 und 4 als Sofortreaktion sowie der zweigipflige Anstieg bei den Zeitpunkten 8 und 11 als Spätreaktion. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Für die Übersicht der Ausreißer und generellen Verteilung der cfDNA-Werte aller Probanden dienen die Boxplots zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei den Boxplots sind für Zeitpunkt 11 noch 2 Ausreißer zu erkennen, sodass der hohe Gipfel im Liniendiagramm etwas niedriger zu werten sein dürfte. Nach 96 h mit Zeitpunkt 12 fallen die cfDNA-Werte wieder Richtung Ausgangsniveau (s. Abbildung 5.30).

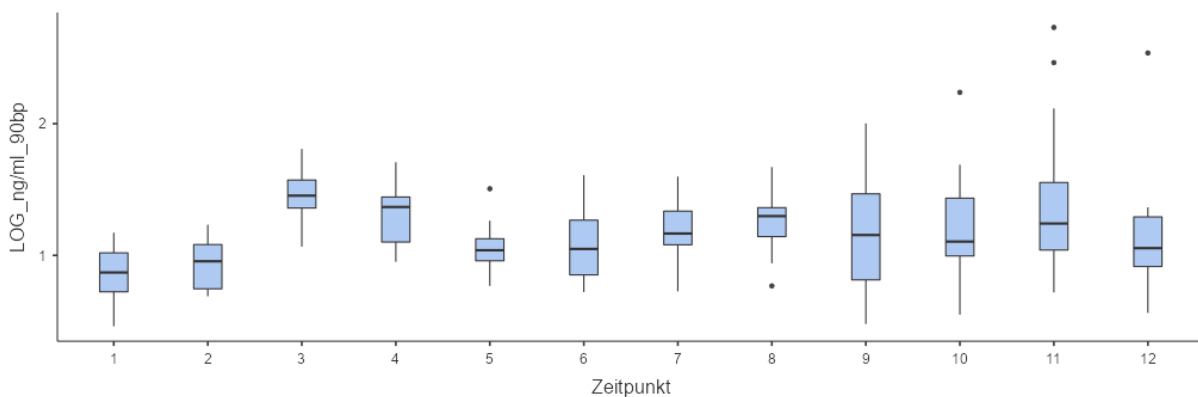


Abbildung 5.30: Boxplots „Drop Jump“-Studie Zeitpunkte

Abgebildet sind die Boxplots der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

5.7.1 Messerergebnisse CK

Während der „Drop Jump“-Studie wurde zu allen Zeitpunkten nicht nur cfDNA, sondern auch die CK als Marker für Muskelzellschädigung bestimmt. Dadurch war ein direkter Vergleich der Dynamik von cfDNA und CK über die verschiedenen Zeitpunkte möglich. Die Auswertung erfolgte wieder mittels eines gemischten Modells mit Zeitpunkt als Faktor und Proband als Clustervariable. Die Daten wurden in Unit/Liter (U/l) gemessen, das Signifikanzniveau unverändert auf 5 % festgelegt. In der zusammenfassenden Statistik ist die Datenverteilung über die Zeitpunkte zu erkennen (s. Tabelle 5.31).

Tabelle 5.31: Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie CK

Zu sehen ist die zusammenfassende Statistik der Zeitpunkte der „Drop Jump“-Studie mit den CK-Werten, gemessen in U/l. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Descriptives

	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
CK_U/L	1	14	0	3.27	2.38	2.19	0.900	7.17	0.849	0.021
	2	14	0	3.43	2.66	2.22	0.830	6.99	0.855	0.026
	3	14	0	3.66	3.08	2.12	1.440	7.56	0.855	0.026
	4	14	0	3.69	3.05	2.15	1.420	7.57	0.847	0.020
	5	14	0	3.64	2.96	2.03	1.280	6.88	0.875	0.050
	6	14	0	3.87	3.38	2.04	1.400	7.46	0.908	0.145
	7	14	0	7.93	8.44	3.85	1.860	15.01	0.979	0.967
	8	14	0	11.53	10.93	6.25	2.120	23.40	0.957	0.668
	9	14	0	10.88	10.31	7.28	1.610	26.40	0.930	0.304
	10	14	0	7.54	5.65	8.11	1.090	33.30	0.677	< .001
	11	14	0	6.69	4.17	8.10	1.250	33.30	0.597	< .001
	12	14	0	5.20	4.67	5.45	1.150	22.78	0.639	< .001

Beim gemischten Modell demonstrierte der Omnibus-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$, dass es einen Unterschied bei den CK-Werten über die Zeitpunkte gab. Zur besseren Beurteilung wurde ergänzend der Dunnett's Test durchgeführt. Der Vergleich des Ausgangswertes 1 („davor 15 min“) mit den nachfolgenden Zeitpunkten ergab einen signifikanten Unterschied (p-Wert $< 0,05$) ab dem Zeitpunkt 7 („6 h danach“) bis zum Zeitpunkt 11 („72 h danach“). Dies scheint analog zu den cfDNA-Werten zu sein, welche auch ab dem Zeitpunkt 7 als Spätfolge auf die „Drop Jumps“ einen signifikanten Unterschied im Dunnett's Test offenbarten (s. Tabelle 5.32).

Tabelle 5.32: Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie CK

Die Tabellen zeigen die Modellergebnisse der CK-Werte der „Drop Jump“-Studie, gemessen in U/l. Für den Omnibus-Test gab es einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte mit einem p-Wert < 0,05. Im Dunnett's Test war ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von < 0,05 zu finden beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit den Zeitpunkten 7 bis 11 als verzögerte Reaktion auf die Drop Jumps. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	8.58	11	143	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	5.944	0.905	4.170	7.72	13.0	6.566	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.164	1.430	-2.639	2.97	143.0	0.114	0.909
Zeitpunkt2	3 - 1	0.395	1.430	-2.407	3.20	143.0	0.276	0.783
Zeitpunkt3	4 - 1	0.423	1.430	-2.380	3.23	143.0	0.296	0.768
Zeitpunkt4	5 - 1	0.374	1.430	-2.428	3.18	143.0	0.262	0.794
Zeitpunkt5	6 - 1	0.601	1.430	-2.201	3.40	143.0	0.421	0.675
Zeitpunkt6	7 - 1	4.664	1.430	1.861	7.47	143.0	3.262	0.001
Zeitpunkt7	8 - 1	8.260	1.430	5.458	11.06	143.0	5.777	< .001
Zeitpunkt8	9 - 1	7.608	1.430	4.805	10.41	143.0	5.321	< .001
Zeitpunkt9	10 - 1	4.275	1.430	1.473	7.08	143.0	2.990	0.003
Zeitpunkt10	11 - 1	3.422	1.430	0.620	6.22	143.0	2.393	0.018
Zeitpunkt11	12 - 1	1.929	1.430	-0.874	4.73	143.0	1.349	0.180

Zur Illustration wurde das Liniendiagramm der CK-Werte aller Probanden über die Zeitpunkte hinweg eingefügt. Wie zuvor im Dunnett's Test beschrieben, sind die signifikanten Unterschiede der CK-Werte hier als Anstiege und Abfälle zu finden. Ein großer Anstieg der CK-Werte ist ab den Zeitpunkten 7 und 8 zu sehen, danach fallen die Werte wieder (s. Abbildung 5.31).

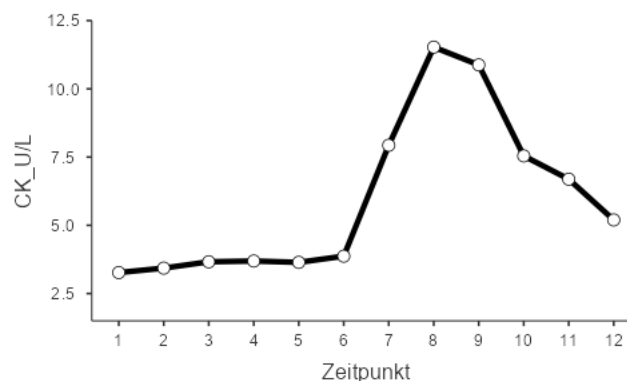


Abbildung 5.31: Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie CK Zeitpunkte

Veranschaulicht ist der Verlauf der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie im Liniendiagramm mit CK-Werten, gemessen in U/l. Zu erkennen ist der Anstieg bei den Zeitpunkten 7 und 8. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

Die Boxplots veranschaulichen die Datenverteilung sowie die Ausreißer (s. Abbildung 5.32).

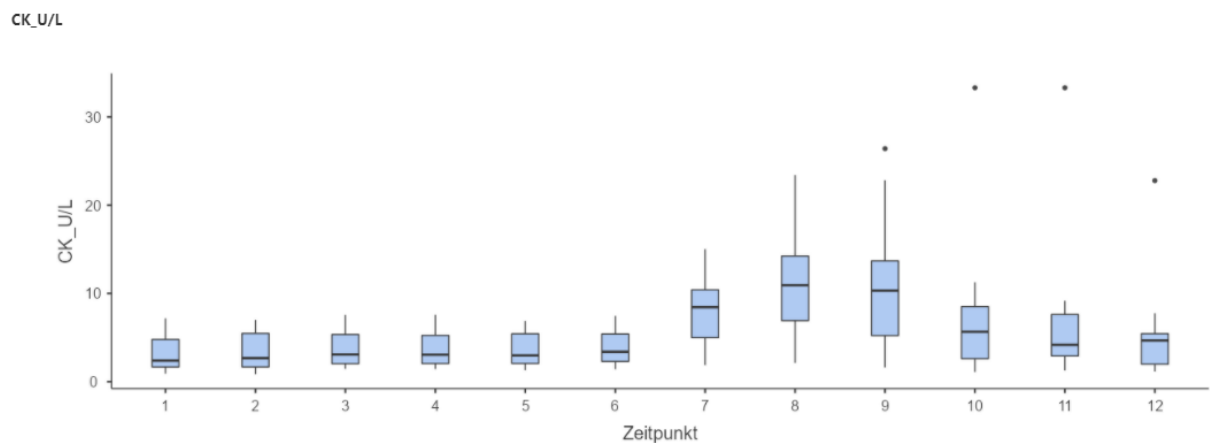


Abbildung 5.32: Boxplots „Drop Jump“-Studie CK Zeitpunkte

Abgebildet sind die Boxplots der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie mit den CK-Werten, gemessen in U/l. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 2= „davor“, 3= „danach“, 4= „5 min danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“, 7= „6 h danach“, 8= „12 h danach“, 9= „24 h danach“, 10= „48 h danach“, 11= „72 h danach“, 12= „96 h danach“.

5.7.2 Messergebnisse Laktat

Überdies wurden bei der „Drop Jump“-Studie die Laktatwerte für die Zeitpunkte 1 („davor 15 min“), Zeitpunkt 3 („danach“), Zeitpunkt 5 („45 min danach“) und Zeitpunkt 6 („90 min danach“) in mmol/l bestimmt. Die Auswertung erfolgte wieder mit Hilfe des gemischten Modells mit Zeitpunkt als Faktor und Proband als Clustervariable. Das Signifikanzniveau wurde unverändert auf 5 % festgelegt. In der zusammenfassenden Statistik ist die Datenverteilung aufgeführt (s. Tabelle 5.33).

Tabelle 5.33: Zusammenfassende Statistik „Drop Jump“-Studie Laktat

Aufgeführt sind in der zusammenfassenden Statistik der „Drop Jump“-Studie die Laktatwerte, gemessen in mmol/l. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 3= „danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“.

Descriptives										
	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
Laktat_mmol/L	1	14	0	1.52	1.55	0.289	1.100	2.10	0.960	0.728
	3	14	0	1.21	1.15	0.350	0.800	2.10	0.851	0.023
	5	14	0	1.20	1.15	0.277	0.900	1.90	0.886	0.071
	6	14	0	1.23	1.25	0.255	0.900	1.80	0.934	0.350

Bei den Modellergebnissen zeigte der Omnibus-Test mit einem p-Wert von < 0,05 einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte an. Außerdem konnte beim Dunnett's Test im

Vergleich des Ausgangszeitpunktes mit den anderen Zeitpunkten ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Tabelle 5.34).

Tabelle 5.34: Modellergebnisse „Drop Jump“-Studie Laktat

Zusammengefasst sind die Modellergebnisse der Laktatwerte der „Drop Jump“-Studie, gemessen in mmol/l. Für den Omnibus-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied der Zeitpunkte mit einem p-Wert < 0,05. Im Dunnett's Test war ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von < 0,05 zu finden beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit den Zeitpunkten 3, 5 und 6. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 3= „danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	10.1	3	39.0	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.289	0.0664	1.159	1.420	13.0	19.41	< .001
Zeitpunkt1	3 - 1	-0.314	0.0692	-0.450	-0.179	39.0	-4.54	< .001
Zeitpunkt2	5 - 1	-0.321	0.0692	-0.457	-0.186	39.0	-4.64	< .001
Zeitpunkt3	6 - 1	-0.293	0.0692	-0.429	-0.157	39.0	-4.23	< .001

Direkt nach der Belastung sanken die Laktatwerte und waren auch 45 min beziehungsweise 90 min danach noch erniedrigt. Diese Reaktion wurde mit der Annahme erklärt, dass eine erhöhte Laktataufnahme durch den Muskel stattfand (159). Zur Veranschaulichung diente das Liniendiagramm über die Zeitpunkte hinweg (s. Abbildung 5.33).

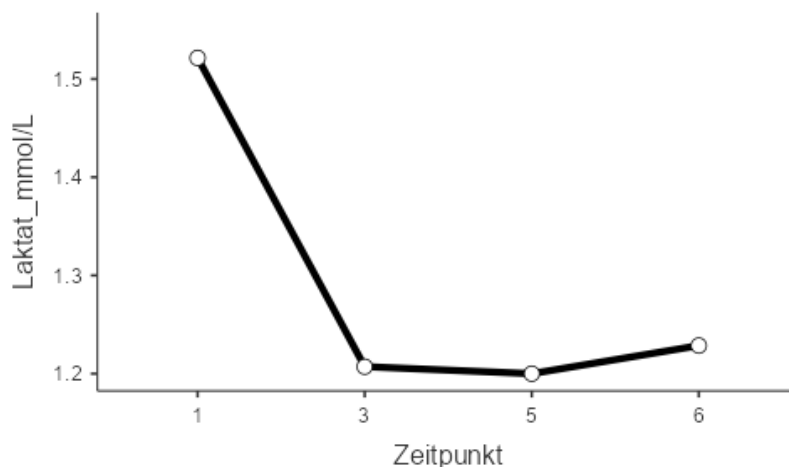


Abbildung 5.33: Liniendiagramm „Drop Jump“-Studie Laktat Zeitpunkte

Zu sehen ist der Verlauf der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie im Liniendiagramm mit Laktatwerten, gemessen in mmol/l. Auffällig ist der Abfall nach der Belastung zum Zeitpunkt 3. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 3= „danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“.

Die Boxplots bilden ergänzend eine Übersicht der Datenverteilung mit Ausreißern ab (s. Abbildung 5.34).

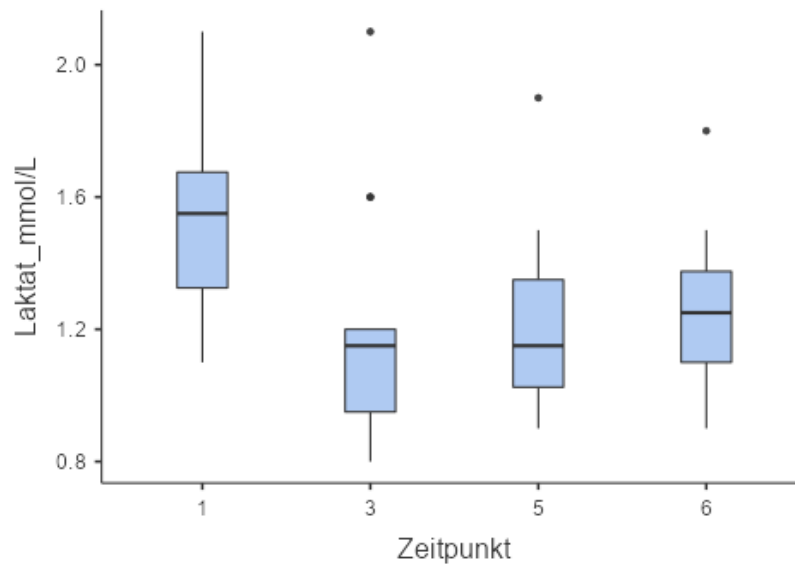


Abbildung 5.34: Boxplots „Drop Jump“-Studie Laktat Zeitpunkte

Die Boxplots der Zeitpunkte aller Probanden der „Drop Jump“-Studie zeigen die Verteilung der Laktatwerte, gemessen in mmol/l. Zeitpunkte: 1= „davor 15 min“, 3= „danach“, 5= „45 min danach“, 6= „90 min danach“.

5.8 Studienergebnisse „Wingate“

Für die „Wingate“-Studie wurde ebenfalls das gemischte Modell angewandt. Alter, Sitzung und Zeitpunkt dienten als Faktoren, Proband als Clustervariable. Es erfolgte eine dekadische Logarithmierung der Daten mit der Basis von 10 und die Messung mit Hilfe des 90-bp-Primers. In der zusammenfassenden Statistik ist die Datenverteilung über die Zeitpunkte, Sitzungen und Alter zu sehen (s. Tabelle 5.35).

Tabelle 5.35: Zusammenfassende Statistik „Wingate“-Studie

Aufgeführt sind in der zusammenfassenden Statistik der „Wingate“-Studie die logarithmierten cfDNA-Werte, gemessen in ng/ml. Die Zeitpunkte der ersten Sitzung (1) sind: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“. Die Zeitpunkte der letzten Sitzung (2) sind: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

Descriptives

	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	20	0	1.36	1.39	0.260	0.758	1.78	0.974	0.838
	2	20	0	1.81	1.86	0.311	1.276	2.34	0.964	0.620
	3	20	0	1.37	1.33	0.303	0.872	1.88	0.961	0.569
	4	20	0	1.30	1.26	0.270	0.937	1.75	0.915	0.078
	5	19	0	1.20	1.23	0.240	0.677	1.60	0.975	0.865
	6	19	0	1.82	1.80	0.244	1.435	2.42	0.952	0.426
	7	19	0	1.28	1.30	0.207	0.916	1.59	0.953	0.450
	8	19	0	1.30	1.30	0.276	0.814	1.81	0.975	0.867

Descriptives

	Sitzung	Alter_ID	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
										W	p
LOG_ng/ml_90bp	1	Alt	36	0	1.45	1.38	0.319	0.959	2.18	0.958	0.182
		Jung	40	0	1.49	1.51	0.377	0.758	2.34	0.986	0.896
	2	Alt	36	0	1.39	1.40	0.292	0.883	2.00	0.972	0.473
		Jung	40	0	1.41	1.37	0.383	0.677	2.42	0.983	0.794

Das auf 5 % festgelegte Signifikanzniveau zeigte im Omnibus-Test des gemischten Modells mit einem p-Wert von < 0,05 einen generellen Unterschied bei den cfDNA-Messungen über die Zeitpunkte. Ob jung oder alt, erste oder letzte Sitzung, genauso wie die Interaktion zwischen Alter und Sitzung beziehungsweise Zeitpunkt schien keinen Unterschied zu machen (s. Tabelle 5.36).

Tabelle 5.36: Modellergebnisse „Wingate“-Studie

Zu sehen sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie. Beim Omnibus-Test gab es einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte mit einem p-Wert < 0,05, jedoch keinen Unterschied im Alter oder den Sitzungen bzw. zwischen den Interaktionen.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Alter	0.0792	1	17.0	0.782
Sitzung	1.1750	1	119.0	0.281
Zeitpunkt	42.7737	6	119.0	< .001
Alter * Sitzung	1.0409	1	119.0	0.310
Alter * Zeitpunkt	2.0744	6	119.0	0.061

Zusätzlich wurden zur besseren Beurteilbarkeit gemischte Modelle aufgetrennt nach der ersten und letzten Sitzung berechnet. Hierbei konnte bei der ersten Sitzung im Omnibus-Test ein Signifikanztrend in der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter mit einem p-Wert von 0,054 gesehen werden. Im Dunnett's Test ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied, die p-

Werte lagen bei über 0,05. Im direkten Vergleich zeigte sich zwischen Ausgangszeitpunkt 1 („davor“) und Zeitpunkt 2 („danach“) ein signifikanter Unterschied, nicht jedoch im Vergleich zu Zeitpunkt 3 („1 h danach“) oder Zeitpunkt 4 („24 h danach“) (s. Tabelle 5.37).

Tabelle 5.37: Modellergebnisse „Wingate“-Studie erste Sitzung

Dargestellt sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie. Der Omnibus-Test ergab für die Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied (p -Werte von $< 0,05$). Im Dunnett's Test zeigte sich zudem beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 1 mit Zeitpunkt 2 ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“. Alter: 1= jüngere Probanden, 2= ältere Probanden.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	40.599	3	51.0	< .001
Alter	0.111	1	17.0	0.743
Zeitpunkt * Alter	2.714	3	51.0	0.054

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4652	0.0604	1.3469	1.5836	17.0	24.265	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.4367	0.0503	0.3381	0.5353	51.0	8.681	< .001
Zeitpunkt2	3 - 1	0.0169	0.0503	-0.0817	0.1155	51.0	0.336	0.739
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.0544	0.0503	-0.1530	0.0442	51.0	-1.082	0.284
Alter1	2 - 1	-0.0403	0.1208	-0.2770	0.1964	17.0	-0.334	0.743
Zeitpunkt1 * Alter1	2 - 1 * 2 - 1	-0.1518	0.1006	-0.3490	0.0454	51.0	-1.509	0.138
Zeitpunkt2 * Alter1	3 - 1 * 2 - 1	-0.0993	0.1006	-0.2965	0.0979	51.0	-0.987	0.329
Zeitpunkt3 * Alter1	4 - 1 * 2 - 1	0.1141	0.1006	-0.0831	0.3113	51.0	1.134	0.262

Zur Veranschaulichung diente das Liniendiagramm über die Zeitpunkte der ersten Sitzung aller Probanden hinweg. Die beiden Linien repräsentieren einmal die jüngeren Probanden (Alter 1) und die älteren Probanden (Alter 2). Zu sehen ist der zuvor im Dunnett's Test beschriebene signifikante Unterschied der cfDNA als Anstieg und direkte Reaktion auf die sportliche Aktivität des Wingate-Protokolls (s. Abbildung 5.35).

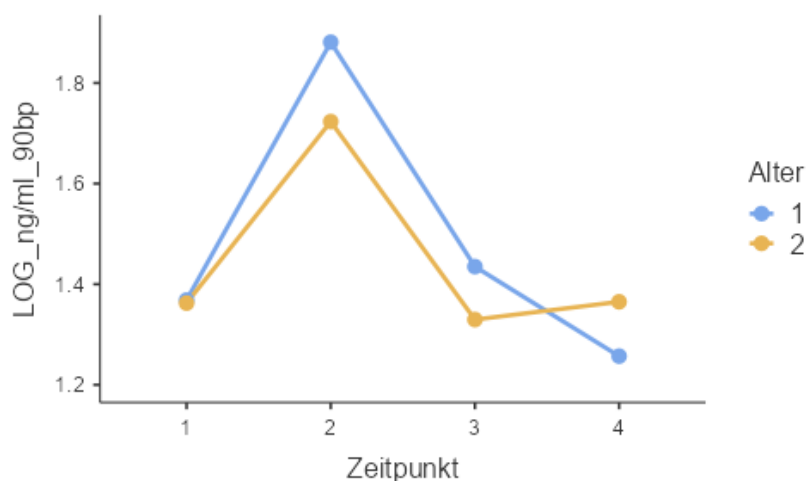


Abbildung 5.35: Liniendiagramm „Wingate“-Studie erste Sitzung

Abgebildet ist das Liniendiagramm der ersten Sitzung über die Zeitpunkte der „Wingate“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Aufgeteilt wurde das Diagramm in die Linien Alter 1 (jüngere Probanden) und Alter 2 (ältere Probanden). Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“.

Das gemischte Modell aufgetrennt nach der letzten Sitzung zeigte im Omnibus-Test keinen Signifikanztrend in der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter. Auch im Dunnett's Test ergab sich kein signifikanter Unterschied, weder im Alter noch in der Interaktion von Zeitpunkt und Alter. Lediglich der Vergleich des Ausgangszeitpunktes 5 („davor“) mit dem Zeitpunkt 6 („danach“) und der letzte Zeitpunkt 8 („24 h danach“) wurden mit einem p-Wert $< 0,05$ signifikant (s. Tabelle 5.38). Eine Erklärung für die Signifikanz im Zeitpunkt 8 könnte der langsamere Abfall der cfDNA-Werte auf das Ausgangsniveau bei der letzten Sitzung sein. Vor allem waren bei den älteren Probanden auch noch 24 h nach der letzten Sitzung die cfDNA-Werte höher als der Ausgangswert.

Tabelle 5.38: Modellergebnisse „Wingate“-Studie letzte Sitzung

Zu sehen sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie. Der Omnibus-Test ergab für die Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied (p -Werte von $< 0,05$). Im Dunnett's Test zeigte sich zudem beim Vergleich von Ausgangszeitpunkt 5 mit Zeitpunkt 6 und 8 ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“. Alter: 1= jüngere Probanden, 2= ältere Probanden.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	64.8793	3	51.0	< .001
Alter	0.0307	1	17.0	0.863
Zeitpunkt * Alter	2.3541	3	51.0	0.083

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4001	0.0477	1.3066	1.4935	17.0	29.366	< .001
Zeitpunkt1	6 - 5	0.6115	0.0488	0.5159	0.7071	51.0	12.535	< .001
Zeitpunkt2	7 - 5	0.0839	0.0488	-0.0118	0.1795	51.0	1.719	0.092
Zeitpunkt3	8 - 5	0.1064	0.0488	0.0108	0.2020	51.0	2.181	0.034
Alter1	2 - 1	-0.0167	0.0954	-0.2036	0.1702	17.0	-0.175	0.863
Zeitpunkt1 * Alter1	6 - 5 * 2 - 1	-0.1489	0.0976	-0.3402	0.0423	51.0	-1.527	0.133
Zeitpunkt2 * Alter1	7 - 5 * 2 - 1	-0.0132	0.0976	-0.2044	0.1780	51.0	-0.135	0.893
Zeitpunkt3 * Alter1	8 - 5 * 2 - 1	0.1093	0.0976	-0.0819	0.3006	51.0	1.121	0.268

Visualisiert ist dies im Liniendiagramm über die Zeitpunkte der letzten Sitzung über alle Probanden hinweg. Die beiden Linien repräsentieren erneut die jüngeren Probanden (Alter 1) und die älteren Probanden (Alter 2) (s. Abbildung 5.36).

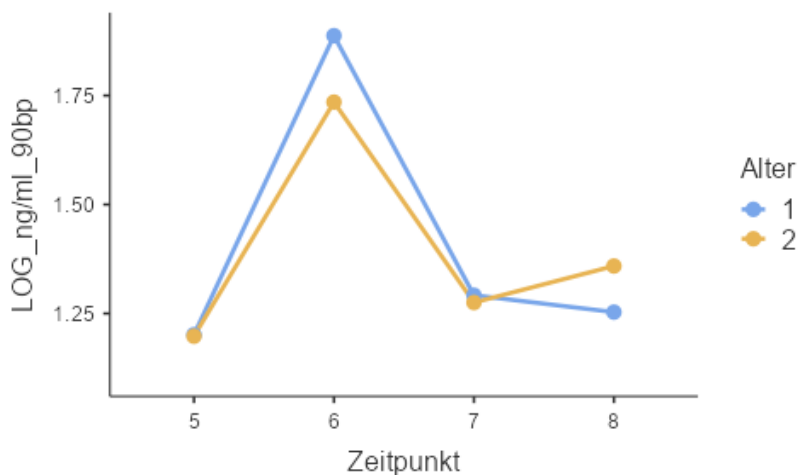


Abbildung 5.36: Liniendiagramm „Wingate“-Studie letzte Sitzung

Erkennbar ist das Liniendiagramm der letzten Sitzung über die Zeitpunkte der „Wingate“-Studie mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml. Aufgeteilt wurde das Diagramm in die Linien Alter 1 (jüngere Probanden) und Alter 2 (ältere Probanden). Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

Insgesamt war trotz erwarteter Altersdifferenz kein Unterschied im Alter oder den beiden Sitzungen beziehungsweise der Interaktion zwischen Alter und Sitzung zu sehen. Damit schien die sportliche Aktivität des Wingate-Protokolls auf dem Fahrradergometer mit den Belastungsintervallen keinen Einfluss darauf zu nehmen. Dies könnte daran gelegen haben, dass in der Kohorte vor allem trainierte, ältere Personen aufgenommen wurden und keine Untrainierten. Zur besseren Differenzierung erfolgte die Analyse zusätzlicher gemischter Modelle aufgetrennt nach jüngeren und älteren Probanden. Zunächst wurden die jüngeren Probanden betrachtet, sowohl zuerst mit beiden Sitzungen gemeinsam als auch aufgetrennt nach der ersten und letzten Sitzung. Für beide Sitzungen ergab der Dunnett's Test im Vergleich zwischen dem Ausgangszeitpunkt der ersten Sitzung (1) und dem der letzten Sitzung (5) einen signifikanten Unterschied (p -Wert $< 0,05$). Dahingegen zeigten die beiden Sitzungen im Vergleich mit einem p -Wert $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied (s. Tabelle 5.39).

Tabelle 5.39: Modellergebnisse „Wingate“- Studie jüngere Probanden

Zusammengefasst sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den jüngeren Probanden. Der Dunnett's Test ergab im Vergleich des Ausgangszeitpunktes der ersten Sitzung (1) mit dem Ausgangszeitpunkt der letzten Sitzung (5) mit einem p -Wert $< 0,005$ einen signifikanten Unterschied. Die beiden Sitzungen im Vergleich zeigten mit einem p -Wert $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“, 5= „davor“. Sitzung: 1= erste Sitzung, 2= letzte Sitzung.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	23.8	7	63.0	$< .001$

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4469	0.0731	1.3036	1.59021	9.00	19.788	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.5126	0.0809	0.3540	0.67122	63.00	6.334	$< .001$
Zeitpunkt2	3 - 1	0.0665	0.0809	-0.0921	0.22514	63.00	0.822	0.414
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.1115	0.0809	-0.2701	0.04716	63.00	-1.377	0.173
Zeitpunkt4	5 - 1	-0.1671	0.0809	-0.3257	-0.00847	63.00	-2.065	0.043

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Sitzung	1.10	1	69.0	0.297

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4469	0.0731	1.304	1.5902	9.00	19.79	$< .001$
Sitzung1	2 - 1	-0.0770	0.0733	-0.221	0.0667	69.00	-1.05	0.297

Für die jüngeren Probanden aufgetrennt nach der ersten und letzten Sitzung ergab sich im Omnibus-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ ein signifikanter Unterschied der Zeitpunkte. Der Dunnett's Test wies nur im Vergleich des Ausgangszeitpunktes mit dem Zeitpunkt „danach“ einen signifikanten Unterschied auf. Ein Signifikanztrend konnte für den Vergleich zwischen dem Ausgangszeitpunkt und dem Zeitpunkt „24 h danach“ (p-Wert von 0,521) in der letzten Sitzung beobachtet werden (s. Tabelle 5.40 und Tabelle 5.41).

Tabelle 5.40: Modellergebnisse „Wingate“-Studie jüngere Probanden erste Sitzung

Aufgezeigt sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den jüngeren Probanden in der ersten Sitzung. Der Dunnett's Test zeigte nur im Vergleich von dem Ausgangswert 1 („davor“) und dem Zeitpunkt 2 („danach“) einen signifikanten Unterschied. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	21.0	3	27.0	$< .001$

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4854	0.0803	1.3280	1.6428	9.00	18.493	$< .001$
Zeitpunkt1	2 - 1	0.5126	0.0844	0.3472	0.6780	27.00	6.073	$< .001$
Zeitpunkt2	3 - 1	0.0665	0.0844	-0.0989	0.2319	27.00	0.788	0.438
Zeitpunkt3	4 - 1	-0.1115	0.0844	-0.2769	0.0540	27.00	-1.321	0.198

Tabelle 5.41: Modellergebnisse „Wingate“-Studie jüngere Probanden letzte Sitzung

Dargestellt sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den jüngeren Probanden in der letzten Sitzung. Der Dunnett's Test ergab nur im Vergleich des Ausgangswertes 5 („davor“) mit dem Zeitpunkt 6 („danach“) einen signifikanten Unterschied. Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	32.7	3	27.0	$< .001$

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4084	0.0702	1.2708	1.546	9.00	20.055	$< .001$
Zeitpunkt1	6 - 5	0.6860	0.0795	0.5302	0.842	27.00	8.630	$< .001$
Zeitpunkt2	7 - 5	0.0905	0.0795	-0.0653	0.246	27.00	1.138	0.265
Zeitpunkt3	8 - 5	0.0517	0.0795	-0.1041	0.208	27.00	0.651	0.521

Bei der Betrachtung der älteren Probanden wurde genauso verfahren. Zunächst die Analyse der beiden Sitzungen gemeinsam und anschließend aufgetrennt nach der ersten und letzten

Sitzung. Hierfür resultierte bei beiden Sitzungen im Vergleich des Ausgangszeitpunktes der ersten Sitzung (1) mit dem Ausgangszeitpunkt der letzten Sitzung (5) ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,05$) im Dunnett's Test. Dahingegen zeigten die beiden Sitzungen im Vergleich mit einem p -Wert $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied, so wie auch schon bei den jüngeren Probanden (s. Tabelle 5.42).

Tabelle 5.42: Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden

Zusammengefasst sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den älteren Probanden. Der Dunnett's Test ergab im Vergleich des Ausgangszeitpunktes der ersten Sitzung (1) mit dem Ausgangszeitpunkt der letzten Sitzung (5) einen signifikanten Unterschied mit einem p -Wert $< 0,05$. Die beiden Sitzungen im Vergleich zeigten mit einem p -Wert $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“, 5= „davor“. Sitzung: 1= erste Sitzung, 2= letzte Sitzung.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	15.2	7	56.0	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.41840	0.0692	1.283	1.5541	8.00	20.4878	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.36080	0.0725	0.219	0.5030	56.00	4.9746	< .001
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.03275	0.0725	-0.175	0.1094	56.00	-0.4515	0.653
Zeitpunkt3	4 - 1	0.00259	0.0725	-0.140	0.1447	56.00	0.0358	0.972
Zeitpunkt4	5 - 1	-0.16456	0.0725	-0.307	-0.0224	56.00	-2.2689	0.027

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Sitzung	0.839	1	62.0	0.363

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.4184	0.0692	1.283	1.5541	8.00	20.488	< .001
Sitzung1	2 - 1	-0.0534	0.0583	-0.168	0.0609	62.00	-0.916	0.363

Aufgetrennt nach der ersten und letzten Sitzung zeigten die älteren Probanden im Omnibus-Test mit einem p -Wert von $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied der Zeitpunkte. Der Dunnett's Test ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich des Ausgangszeitpunktes mit dem Zeitpunkt „danach“ in beiden Sitzungen sowie für den Zeitpunkt „24 h danach“ in der letzten Sitzung (s. Tabelle 5.43 und Tabelle 5.44).

Tabelle 5.43: Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden erste Sitzung

Aufgeführt sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den älteren Probanden in der ersten Sitzung. Der Dunnett's Test konnte nur im Vergleich zwischen dem Ausgangswert 1 („davor“) und dem Zeitpunkt 2 („danach“) einen signifikanten Unterschied feststellen. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	28.7	3	24.0	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.44508	0.0908	1.2671	1.6231	8.00	15.9121	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	0.36080	0.0492	0.2644	0.4571	24.00	7.3394	< .001
Zeitpunkt2	3 - 1	-0.03275	0.0492	-0.1291	0.0636	24.00	-0.6661	0.512
Zeitpunkt3	4 - 1	0.00259	0.0492	-0.0938	0.0989	24.00	0.0528	0.958

Tabelle 5.44: Modellergebnisse „Wingate“-Studie ältere Probanden letzte Sitzung

Zu sehen sind die Modellergebnisse der „Wingate“-Studie mit den älteren Probanden in der letzten Sitzung. Der Dunnett's Test ergab im Vergleich von Ausgangswert 5 („davor“) mit Zeitpunkt 6 („danach“) sowie Zeitpunkt 8 („24 h danach“) einen signifikanten Unterschied. Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	41.2	3	24.0	< .001

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	1.3917	0.0633	1.2677	1.516	8.00	21.99	< .001
Zeitpunkt1	6 - 5	0.5371	0.0524	0.4343	0.640	24.00	10.24	< .001
Zeitpunkt2	7 - 5	0.0773	0.0524	-0.0255	0.180	24.00	1.47	0.154
Zeitpunkt3	8 - 5	0.1611	0.0524	0.0583	0.264	24.00	3.07	0.005

Die Liniendiagramme veranschaulichen diesen Sachverhalt. Darüber hinaus resultierte zwischen den jüngeren und älteren Probanden ein Unterschied nach der Belastung in der letzten Sitzung. Zu erkennen war, dass die jüngeren Probanden bereits 1 h nach der Belastung cfDNA-Werte um den Ausgangswert aufwiesen (s. Abbildung 5.37). Bei den älteren Probanden waren die cfDNA-Werte auch noch 24 h danach im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt erhöht (s. Abbildung 5.38).

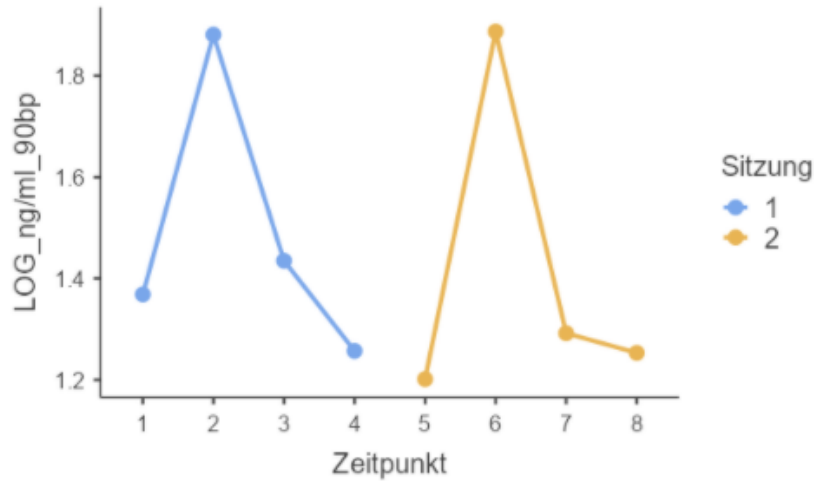


Abbildung 5.37: Liniendiagramm „Wingate“-Studie jüngere Probanden

Zu sehen ist das Liniendiagramm der ersten (1) und letzten Sitzung (2) der jüngeren Probanden in der „Wingate“-Studie. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden in ng/ml gemessen. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“, 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

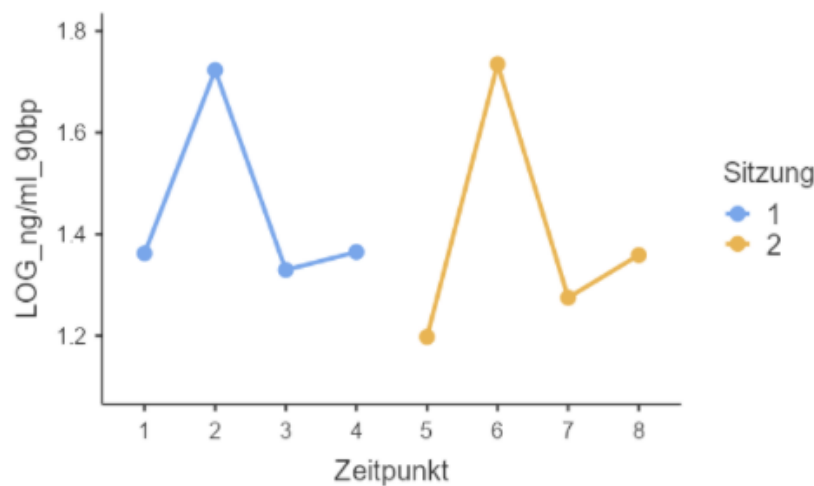


Abbildung 5.38: Liniendiagramm „Wingate“-Studie ältere Probanden

Veranschaulicht ist das Liniendiagramm der ersten (1) und letzten Sitzung (2) der älteren Probanden in der „Wingate“-Studie. Die logarithmierten cfDNA-Werte wurden in ng/ml gemessen. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“, 4= „24 h danach“, 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“, 8= „24 h danach“.

Zur weiteren Illustration dienen die Boxplots im Vergleich zwischen „Jung“ und „Alt“ über die Zeitpunkte der ersten und letzten Sitzung. Hierbei zeigten die jungen Probanden insgesamt leicht höhere cfDNA-Werte direkt nach der Intervention sowie auch beim Vergleich der ersten mit der letzten Sitzung (s. Abbildung 5.39 und Abbildung 5.40 sowie Abbildung 5.41).

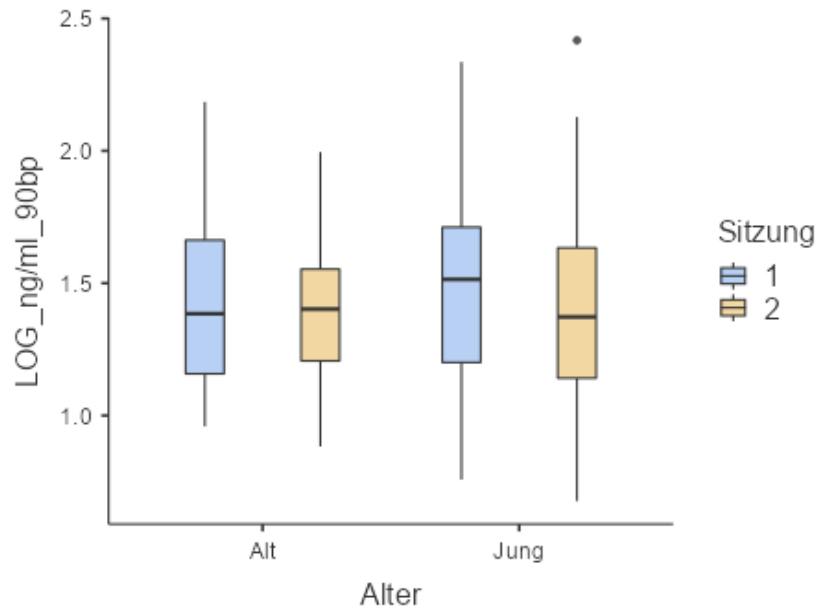


Abbildung 5.39: Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. Jung/Alt

Abgebildet sind die Boxplots der jungen und alten Probanden der „Wingate“-Studie über die erste (1) und letzte (2) Sitzung mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml.

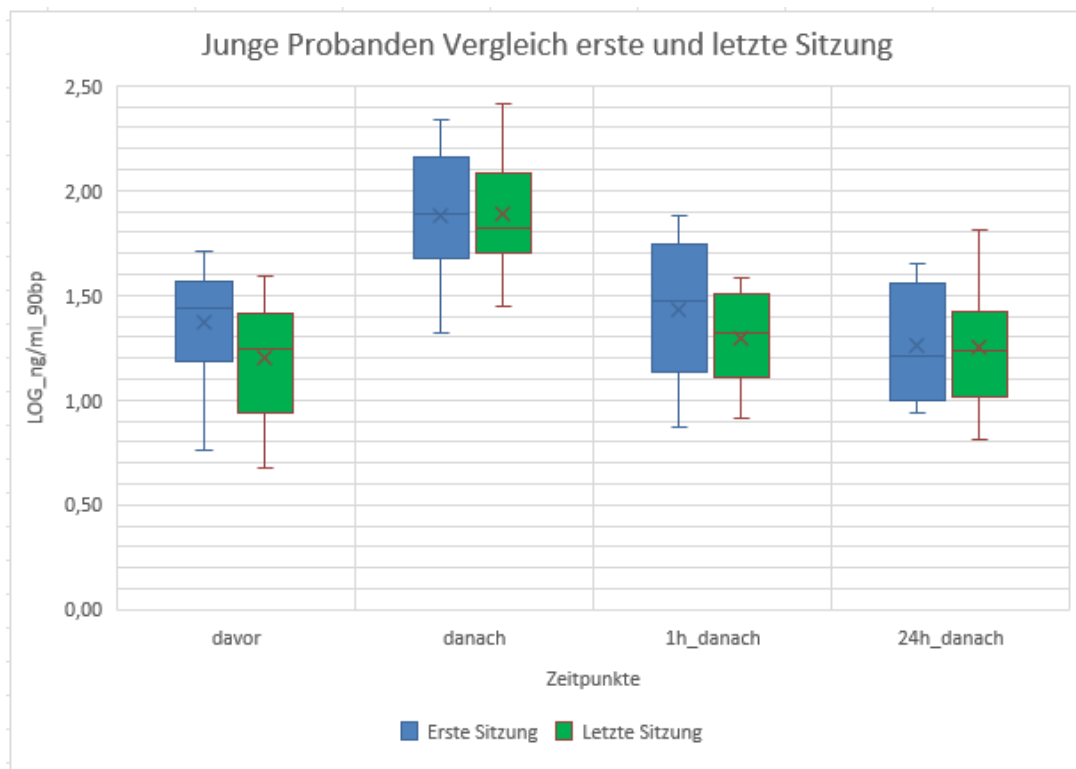


Abbildung 5.40: Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. jüngere Probanden

Dargestellt sind die Boxplots der jungen Probanden der „Wingate“-Studie über die Zeitpunkte hinweg im Vergleich zwischen der ersten und der letzten Sitzung. Die logarithmierten cfDNA-Werten wurden in ng/ml gemessen.

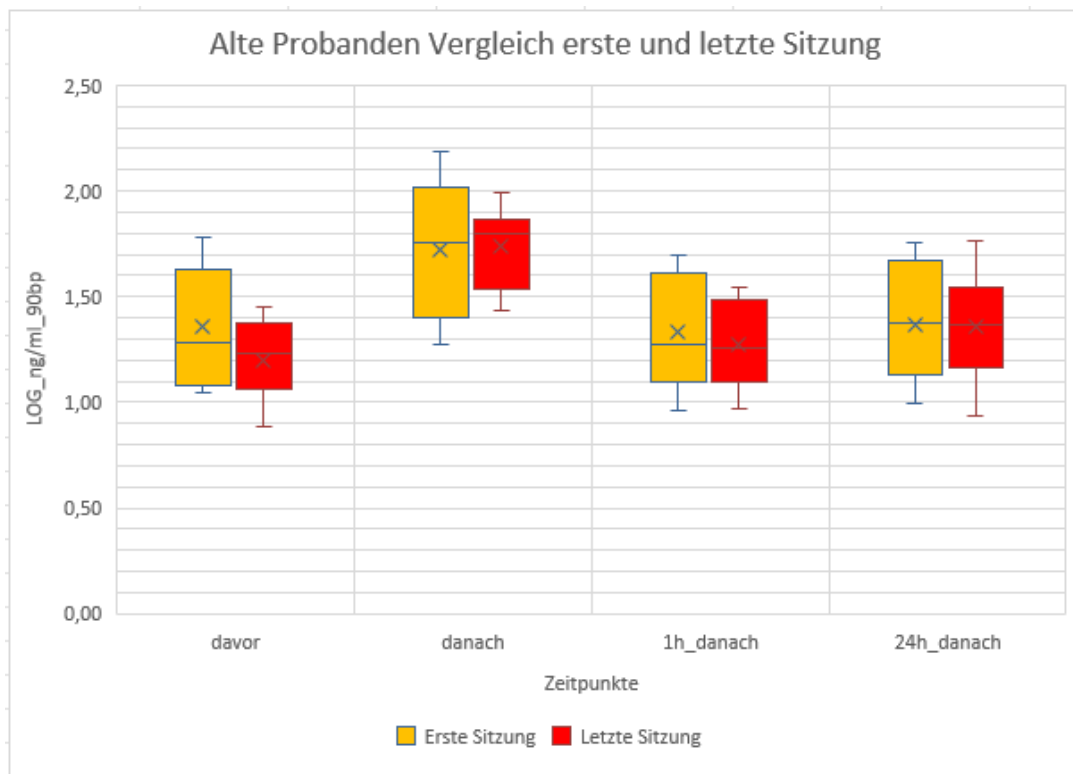


Abbildung 5.41: Boxplots „Wingate“-Studie Vgl. ältere Probanden

Illustriert sind die Boxplots der alten Probanden der „Wingate“-Studie über die Zeitpunkte hinweg im Vergleich zwischen der ersten mit der letzten Sitzung mit logarithmierten cfDNA-Werten, gemessen in ng/ml.

5.8.1 Messergebnisse Laktat

Bei der „Wingate“-Studie wurden bei der ersten und letzten Sitzung zu den Zeitpunkten „davor“, „danach“ sowie „1 h danach“ zusätzlich noch die Laktatwerte bestimmt. Die Auswertung erfolgte wieder mittels gemischten Modells, zunächst aufgetrennt nach Sitzung mit Zeitpunkt und Alter als Faktoren sowie Proband als Clustervariable, später mit Sitzung und Alter als Faktoren. Die Daten wurden in mmol/l gemessen, das Signifikanzniveau unverändert auf 5 % festgelegt. Zu erkennen ist die Datenverteilung in der zusammenfassenden Statistik (s. Tabelle 5.45).

Tabelle 5.45: Zusammenfassende Statistik „Wingate“-Studie Laktat

Aufgeführt sind in der zusammenfassenden Statistik der „Wingate“-Studie die Laktatwerte, gemessen in mmol/l. Die Zeitpunkte der ersten Sitzung (1) repräsentieren 1= „davor“, 2= „danach“ und 3= „1 h danach“. Die Zeitpunkte der letzten Sitzung (2) repräsentieren 5= „davor“, 6= „danach“ und 7= „1 h danach“.

Descriptives

	Zeitpunkt	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
									W	p
Laktat_mmol/l	1	19	0	1.67	1.50	0.545	0.900	2.70	0.938	0.246
	2	19	0	16.86	16.90	4.360	4.700	21.40	0.863	0.011
	3	19	0	4.86	4.80	2.038	1.300	10.80	0.916	0.097
	5	18	0	1.49	1.35	0.515	0.800	2.60	0.872	0.019
	6	18	0	17.48	18.20	3.878	9.000	24.10	0.957	0.553
	7	18	0	4.42	3.80	2.097	1.600	9.50	0.899	0.056

Descriptives

	Sitzung	Alter	N	Missing	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
										W	p
Laktat_mmol/l	1	1	30	0	8.63	4.85	7.83	0.900	21.4	0.800	< .001
		2	27	0	6.88	4.70	6.32	1.000	20.9	0.814	< .001
	2	1	30	0	8.48	4.10	7.97	1.100	24.1	0.803	< .001
		2	24	0	6.94	3.40	6.81	0.800	21.4	0.813	< .001

Mit einem p-Wert von < 0,05 zeigte sich im Omnibus-Test des gemischten Modells, dass es einen Unterschied bei den Zeitpunkten und in der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter gab. Ein Signifikanztrend mit einem p-Wert von 0,058 konnte bei dem Faktor Alter gesehen werden. Als Ergänzung wurde der Dunnett's Test durchgeführt, welcher die Beobachtungen bestätigte. Für die Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Zeitpunkt „davor“ mit „danach“, nicht jedoch im Vergleich von Zeitpunkt „davor“ mit „1 h danach“ (s. Tabelle 5.46).

Tabelle 5.46: Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat erste Sitzung

Zusammengefasst sind die Modellergebnisse der Laktatwerte der ersten Sitzung der „Wingate“-Studie, gemessen in mmol/l. Die p-Werte < 0,05 zeigten einen signifikanten Unterschied im Omnibus- bzw. Dunnett's Test. Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“. Alter: 1= jüngere Probanden, 2= ältere Probanden.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	291.31	2	34.0	< .001
Alter	4.12	1	17.0	0.058
Zeitpunkt * Alter	7.29	2	34.0	0.002

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	7.75	0.431	6.91	8.5965	17.0	17.997	< .001
Zeitpunkt1	2 - 1	15.06	0.658	13.77	16.3518	34.0	22.881	< .001
Zeitpunkt2	3 - 1	3.15	0.658	1.86	4.4401	34.0	4.785	< .001
Alter1	2 - 1	-1.75	0.861	-3.44	-0.0604	17.0	-2.030	0.058
Zeitpunkt1 * Alter1	2 - 1 * 2 - 1	-4.86	1.317	-7.44	-2.2764	34.0	-3.689	< .001
Zeitpunkt2 * Alter1	3 - 1 * 2 - 1	-1.30	1.317	-3.88	1.2803	34.0	-0.987	0.330

Zur Illustration diene das Liniendiagramm der drei gemessenen Zeitpunkte der ersten Sitzung über alle Probanden hinweg. Die beiden Linien repräsentieren einmal die jüngeren Probanden (Alter 1) und die älteren Probanden (Alter 2). Insgesamt schienen die jüngeren Probanden höhere Laktatwerte zu erreichen, was den signifikanten Unterschied in der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter im Vergleich von Zeitpunkt 1 mit 2 sowie den Signifikanztrend für den Altersunterschied erklären könnte. Der Anstieg ist die direkte Reaktion auf die sportliche Aktivität. Nach 1 h sind die Ausgangswerte noch nicht wieder erreicht (s. Abbildung 5.42).

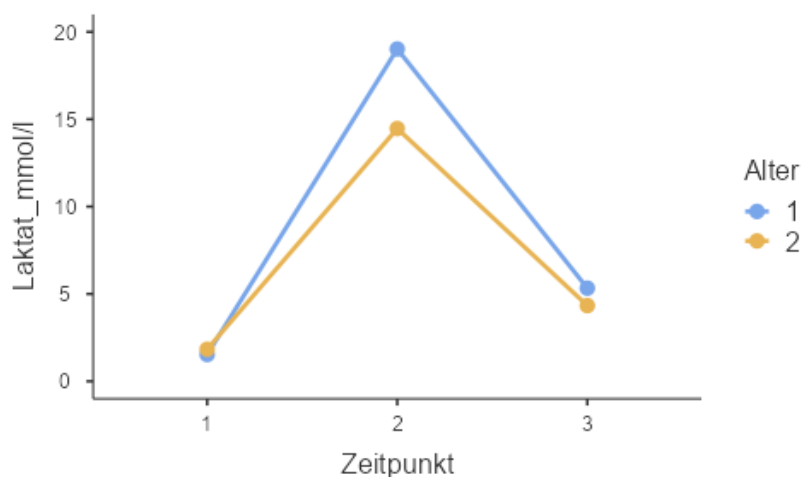


Abbildung 5.42: Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat erste Sitzung

Dargestellt ist das Liniendiagramm der ersten Sitzung der „Wingate“-Studie mit Laktatwerten, gemessen in mmol/l. Aufgeteilt wurde das Diagramm in die Linien Alter 1 (jüngere Probanden) und Alter 2 (ältere Probanden). Zeitpunkte: 1= „davor“, 2= „danach“, 3= „1 h danach“.

Bei den Modellergebnissen der letzten Sitzung der „Wingate“-Studie zeigte sich im Omnibus-Test mit einem p-Wert von $< 0,05$ ein signifikanter Unterschied bei den Zeitpunkten und in der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Alter. Für das Alter ergab sich kein Unterschied. Der Dunnett's Test bestätigte wieder die Beobachtungen, die auch in der ersten Sitzung zu sehen waren (s. Tabelle 5.47).

Tabelle 5.47: Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat letzte Sitzung

In dieser Tabelle sind die Modellergebnisse der Laktatwerte der letzten Sitzung der „Wingate“-Studie zu sehen, gemessen in mmol/l. Die p-Werte $< 0,05$ zeigten einen signifikanten Unterschied im Omnibus- bzw. Dunnett's Test. Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“. Alter: 1= jüngere Probanden, 2= ältere Probanden.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Zeitpunkt	408.84	2	32.0	$< .001$
Alter	2.84	1	16.0	0.112
Zeitpunkt * Alter	4.35	2	32.0	0.021

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	7.71	0.457	6.82	8.606	16.0	16.881	$< .001$
Zeitpunkt1	6 - 5	15.80	0.589	14.64	16.949	32.0	26.836	$< .001$
Zeitpunkt2	7 - 5	2.86	0.589	1.71	4.017	32.0	4.866	$< .001$
Alter1	2 - 1	-1.54	0.914	-3.33	0.252	16.0	-1.684	0.112
Zeitpunkt1 * Alter1	6 - 5 * 2 - 1	-3.39	1.177	-5.70	-1.083	32.0	-2.880	0.007
Zeitpunkt2 * Alter1	7 - 5 * 2 - 1	-1.05	1.177	-3.36	1.255	32.0	-0.894	0.378

Für die Veranschaulichung diente das Liniendiagramm der drei gemessenen Zeitpunkte der letzten Sitzung über alle Probanden hinweg. Die beiden Linien repräsentieren erneut die jüngeren Probanden (Alter 1) und die älteren Probanden (Alter 2). Insgesamt schienen die jüngeren Probanden wieder höhere Laktatwerte zu erreichen. Die Linienvläufe von der letzten Sitzung (s. Abbildung 5.43) unterschieden sich nur geringfügig im Vergleich zur ersten Sitzung (s. Abbildung 5.42).

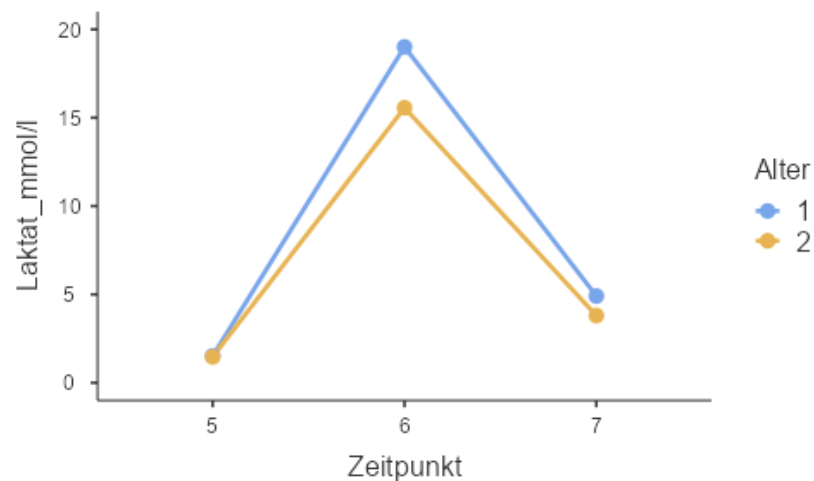


Abbildung 5.43: Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat letzte Sitzung

Zu sehen ist das Liniendiagramm der letzten Sitzung der „Wingate“-Studie mit Laktatwerten, gemessen in mmol/l. Aufgeteilt wurde das Diagramm in die Linien Alter 1 (jüngere Probanden) und Alter 2 (ältere Probanden). Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“.

Im Vergleich der ersten mit der letzten Sitzung zeigten die Modellergebnisse im Omnibus-Test und Dunnett's Test mit einem p-Wert von $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied, auch nicht in der Interaktion des Alters mit den Sitzungen (s. Tabelle 5.48).

Tabelle 5.48: Modellergebnisse „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter

Dargestellt sind die Modellergebnisse der Laktatwerte der ersten (1) und letzten (2) Sitzung der „Wingate“-Studie, gemessen in mmol/l. Die p-Werte zeigten mit $> 0,05$ keinen signifikanten Unterschied im Omnibus- und Dunnett's Test für die Sitzungen sowie die Interaktion zwischen Sitzung und Alter. Zeitpunkte: 5= „davor“, 6= „danach“, 7= „1 h danach“. Alter: 1= jüngere Probanden, 2= ältere Probanden.

Fixed Effect Omnibus tests

	F	Num df	Den df	p
Alter	1.38857	1	107	0.241
Sitzung	8.81e-4	1	107	0.976
Alter * Sitzung	0.00570	1	107	0.940

Note. Satterthwaite method for degrees of freedom

Fixed Effects Parameter Estimates

Names	Effect	Estimate	SE	95% Confidence Interval		df	t	p
				Lower	Upper			
(Intercept)	(Intercept)	7.7315	0.697	6.36	9.10	107	11.0861	< .001
Alter1	2 - 1	-1.6436	1.395	-4.38	1.09	107	-1.1784	0.241
Sitzung1	2 - 1	-0.0414	1.395	-2.78	2.69	107	-0.0297	0.976
Alter1 * Sitzung1	2 - 1 * 2 - 1	0.2106	2.790	-5.26	5.68	107	0.0755	0.940

Die Abbildung 5.44 verdeutlicht, dass es keinen Unterschied zwischen den jüngeren und älteren Probanden in Bezug auf die erste und letzte Sitzung gab.

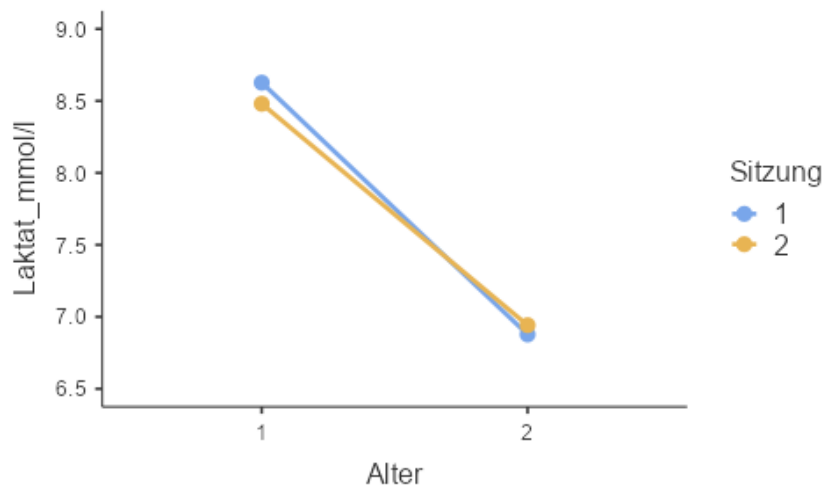


Abbildung 5.44: Liniendiagramm „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter

Das Liniendiagramm zeigt die in mmol/l gemessenen Laktatwerte der ersten (1) und letzten Sitzung (2), aufgetrennt nach jüngeren (Alter 1) und älteren Probanden (Alter 2).

Zur Illustration der Datenverteilung dienen die Boxplots im Vergleich zwischen jüngeren und älteren Probanden über die erste und letzte Sitzung. Die Laktatwerte wurden in mmol/l gemessen. Hierbei zeigten die jüngeren Probanden sowie die letzte Sitzung insgesamt einen

größeren Interquartilsabstand im Vergleich zu den älteren Probanden und der ersten Sitzung (s. Abbildung 5.45).

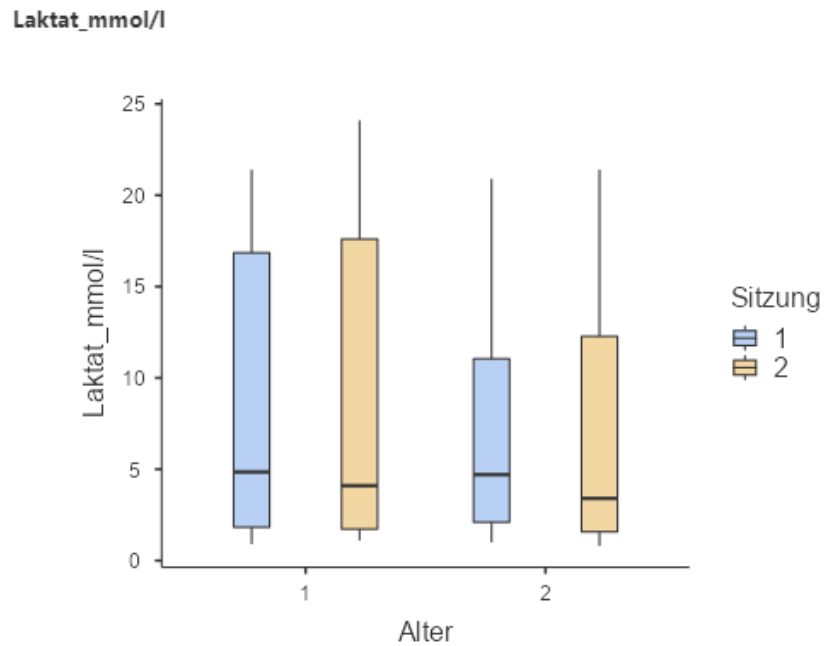


Abbildung 5.45: Boxplots „Wingate“-Studie Laktat Vgl. Sitzungen/Alter

Dargestellt sind die Boxplots der Laktatwerte (mmol/l) der jüngeren (1) und älteren (2) Probanden der „Wingate“-Studie in der ersten und letzten Sitzung.

6 Diskussion

6.1 Einflussfaktoren der Probenverarbeitung

Verschiedenste Faktoren können die Probenverarbeitung und damit die Messergebnisse von cfDNA beeinflussen. Zunächst ist die Wahl des Ausgangsmaterials entscheidend. Hier gibt es widersprüchliche Meinungen in der Literatur.

Einige Autoren empfehlen die Verwendung von Serum, da dort sechsmal so hohe cfDNA-Konzentrationen nachgewiesen wurden. Dies wurde mit der Vermutung einer ungleichen Verteilung aufgrund elektrostatischer Kräfte bei der Serumgewinnung begründet (162). Zudem ergaben sich in einer weiteren Studie sogar bis zu 20-fach höhere cfDNA-Werte im Serum. Dem gegenüber steht jedoch die Annahme, dass diese erhöhten Werte vor allem durch die *in-vitro*-Lyse von Leukozyten während des Gerinnungsprozesses bedingt sind. Daher soll Plasma bevorzugt verwendet werden (163). Außerdem seien Serumproben anfälliger für zelluläre Kontamination (160). In dieser Dissertation, wie auch in anderen Studien (160, 164), wurde eine größere Varianz an cfDNA-Werten bei den Serumproben festgestellt (s. Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8). Angesichts der Studienlage und dieser Ergebnisse konzentrierte sich die Dissertation auf Plasmaproben.

Ein weiterer Einflussfaktor ist, dass es bei der Probengewinnung zu Verunreinigungen durch die Punktion kommen kann. Deshalb ist eine strikte Einhaltung der Hygienemaßnahmen erforderlich. Darüber hinaus wird eine Entnahme in EDTA-Röhrchen empfohlen. Hierbei wurde ein protektiver Faktor auf die cfDNA gefunden, da EDTA vor dem Abbau durch DNase schützte und somit eine größere Stabilität der cfDNA *ex vivo* aufwies (165). Zudem haben beispielsweise Heparin-Röhrchen einen hemmenden Einfluss auf die Messung mittels PCR (166). Um Einflüsse auf die cfDNA in Abnahmeröhrchen zu minimieren, wurden aus diesem Grund EDTA-Röhrchen in dieser Dissertation verwendet.

Bezüglich der Weiterverarbeitung der Blutproben ergab sich keine Veränderung der cfDNA-Konzentration im Plasma, wenn die Blutproben bei Raumtemperatur innerhalb von 8 h oder bei 4 °C innerhalb von 24 h bearbeitet wurden (161). Dahingegen wurde in einer anderen Quelle ein engerer Korridor von 2 h bei Lagerung in Raumtemperaturen von 18 °C bis 22 °C empfohlen, da eine Verzögerung die Menge an cfDNA aufgrund von Lyse der Leukozyten erhöhen könnte (167). Bei den Studien dieser Dissertation wurde auf eine schnelle Kühlung der Blutproben nach der Abnahme geachtet.

Geeichte und kalibrierte Gerätschaften sowie regelmäßige Wartungen der Geräte minimieren Messungenauigkeiten und Fehler, sodass bei der Weiterverarbeitung der Proben

Abweichungen verhindert werden können. Zudem sollte der separate Arbeitsplatz zuvor mit UV-Licht zur Dekontamination von DNA gereinigt werden. Das Arbeiten unter einem Abzug sowie das Tragen von Schutzkleidung können das Risiko von Kreuzkontaminationen verringern.

In der Literatur beschrieb eine Studie als die wahrscheinlichste Quelle von Kontamination eher eine Verunreinigung durch Komponenten des Mastermixes als durch die Umwelt / Luft (168). Deshalb gehören auf jeden Fall gewisse Standards zum Arbeiten im Labor dazu. In der Dissertation wurden diese Standards beim Arbeiten im Labor der Sportmedizin eingehalten. Deswegen kann eine Einflussnahme dieser Faktoren ausgeschlossen werden.

Ein Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf cfDNA konnte nicht festgestellt werden (141, 169). Zur Gewinnung von Blutplasma wurden die Proben in der Dissertation 10 min bei 4 °C und 1 600 x g zentrifugiert. Folgend kam eine Zentrifugation von 16 000 x g bei 4 °C für 5 min hinzu, um restliche Zelltrümmer zu entfernen (145). Zelltrümmer könnten auch noch nach einem Auftauen von gefrorenen Proben durch Zentrifugation beseitigt werden (170).

Damit die Blutproben nicht mehrmals aufgetaut werden müssen und für weitere Untersuchungen verwendet werden können, wurde im Rahmen dieser Dissertation ein effizientes Verfahren zum Abkratzen tiefgefrorener Proben entwickelt. Bei dieser „Abkratzmethode“ ergab sich kein Unterschied zwischen einer oberflächlich abgekratzten Probe und einer aufgetauten Probe, welche anfänglich auf Eis gekühlt und dann bei Raumtemperatur aufgetaut wurde. Ferner resultierte durch die Pipettierhöhe innerhalb eines Röhrchens kein Unterschied, was eine gleichmäßige Verteilung der cfDNA-Konzentration zeigte (s. Abbildung 5.2 bis Abbildung 5.6). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen in der Literatur überein, wobei bis zu drei Einfrier-/Auftauzyklen keine signifikante Diskrepanz in der Menge gemessener cfDNA verursachten (171, 172). Weitere Zyklen könnten zur Fragmentierung der cfDNA führen (167). In einer anderen Studie wurde die cfDNA 1 Monat tiefgefroren bei -80 °C gelagert und mit den Ausgangsmesswerten verglichen, auch hier ohne signifikanten Unterschied nach dem Auftauen (173). Die „Abkratzmethode“ dieser Dissertation stellt somit eine etablierte Alternative zu mehrfachen Einfrier- und Auftauzyklen dar.

Für die Lagerung von cfDNA in Plasmaproben konnte bei -80 °C bis zu 9 Monaten und bei -20 °C bis zu 3 Monaten kein Unterschied im Vergleich zur Ausgangskonzentration festgestellt werden (172). Zu beachten ist, dass trotz Aufbewahrung bei -80 °C die cfDNA-Konzentration einen durchschnittlichen Rückgang von 30 % pro Jahr verzeichnete (174). Andere Quellen wiederum beschrieben, dass eine Lagerung von bis zu 10 Jahren ohne Probleme möglich

sei (143). Für die Blutproben aus Litauen konnte während des Messzeitraumes von 2 Jahren für diese Dissertation kein Rückgang der cfDNA festgestellt werden.

Eine Standardisierung ist notwendig, um die Einflussfaktoren der Probenverarbeitung sowie die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Studienergebnisse zu gewährleisten. Als externe Qualitätsbewertung verdeutlicht auf europäischer Ebene das Projekt „SPIDIA-DNAplas“ (engl. Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics = Standardisierung und Verbesserung allgemeiner präanalytischer Werkzeuge und Verfahren für die In-vitro-Diagnostik), dass eine Angleichung der präanalytischen Prozesse notwendig sei. Für die Analyse des Projektes wurde dieselbe Plasmaprobe an 65 Labore aus 21 verschiedenen europäischen Ländern geschickt. Die cfDNA sollte mit den jeweils eigenen Verfahren extrahiert und zurückgesendet werden. Am Ende konnten die vollständigen Daten aus 56 Laboren ausgewertet werden. Interessanterweise ergab sich hierbei, dass 45 % mindestens ein Qualitätsmerkmal mit geringer Integrität aufwiesen (175). Dieses Beispiel zeigt, dass aus anderen Laboren Vergleichbarkeiten hergestellt werden können, die jedoch nicht immer eindeutig übereinstimmen und daher nicht ohne Weiteres übernommen werden sollten. Deshalb entwickelten verschiedenste Autoren präanalytische Empfehlungen, Protokolle und Richtlinien zur Orientierung (143, 160, 172, 176). Jedoch wird auch angemerkt, dass dies ein fortwährender Prozess sei und weiterentwickelt werden müsse, da das Wissen über die cfDNA lückenhaft ist (177). Während dieser Dissertation wurden bestehende Richtlinien herangezogen und Standardvorgehensweisen des Labors der Sportmedizin berücksichtigt (s. Kapitel 3.9).

6.2 Interaktion von cfDNA im Körper

Mit einer Interaktion von cfDNA im Körper muss gerechnet werden, jedoch sind die genauen Mechanismen und Zusammenhänge noch lange nicht vollumfänglich erforscht und verstanden, wie beispielsweise die Kinetik von cfDNA (178). Unabhängig von Erkrankungen und Multimorbidität sollte eine Berücksichtigung verschiedenster Faktoren eine unverfälschte Interpretation von cfDNA-Ergebnissen ermöglichen. Beispielhaft seien hier einige dieser Faktoren aufgeführt. Die Einflüsse Kälte- und Hitzeexposition, zirkadiane Rhythmik sowie sportliche Intervention werden in Kapitel 6.5 näher betrachtet.

Die ethnische Herkunft schien einen Unterschied in der Messung von cfDNA zu machen (179), wohingegen das Geschlecht eine untergeordnete Rolle spielte und meistens keine Abweichung gefunden wurde (56, 119, 180). Für die Studien dieser Dissertation liegen keine Daten vor, dass die Probanden einer spezifischen Ethnie angehörten, und somit kann keine

Aussage dazu getroffen werden. Eine Differenz der cfDNA-Werte konnte zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht während der Kälteexposition der „Cooling H3“-Studie nicht festgestellt werden. Wurde in der Literatur doch ein Unterschied ausgewiesen, waren bei Männern höhere cfDNA-Werte gemessen worden als bei Frauen. Auch in dieser Dissertation ergaben sich bei den männlichen Probanden insgesamt höhere cfDNA-Werte als bei den weiblichen Probanden, was in den Grafiken veranschaulicht wurde (s. Abbildung 5.13). Außerdem zeigten sich im Dunnett's Test bei einigen Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Geschlechter (s. Tabelle 5.17). Möglicherweise könnten auch andere Merkmale wie Körpergröße, Gewicht oder Körperfettanteil einen Einfluss gehabt haben. Hierzu lagen nicht alle Eigenschaften eines Probanden vor. Eine Bestätigung dieser Vermutung lieferte die Literatur, wobei Männer durch die andere Körperzusammensetzung mit einer größeren Muskelmasse und einem schnelleren Stoffwechselumsatz eine erhöhte Freisetzung von cfDNA aufzeigten (181). Zudem wurde auf die Einflüsse der verschiedenen Lebensstile von Mann und Frau aufmerksam gemacht (34). Sonstige Gründe könnten die hormonellen Unterschiede sein, sowie beim Sport die insgesamt längere Belastungsdauer bis zur Erschöpfung mit höheren Laktatwerten (182). Erstaunlicherweise wurde in der Literatur keine erhöhte cfDNA-Menge im Zusammenhang mit der Menstruation beobachtet. Dies könnte mit der Ausschüttung der Zellen in die Gebärmutterhöhle zu erklären sein (183).

Eine Vergleichbarkeit von Studien in der Literatur ist aufgrund von unterschiedlichen Altersgrenzen nur eingeschränkt möglich. Die Einflussnahme des Alters auf die cfDNA wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits waren Studien mit erhöhten cfDNA-Werten im Alter zu finden. Dabei ergaben sich beispielsweise doppelt so hohe cfDNA-Werte bei älteren Probanden (> 75 Jahre) als bei jüngeren Probanden (19 bis 30 Jahre). Als Erklärungsansatz wurde anstatt eines vermehrten Zelltodes eher auf eine mögliche Abnahme des Abbaus von cfDNA im Alter hingewiesen (40). Zudem scheint es eine Verbindung zwischen der Telomerverkürzung und dem Alterungsprozess zu geben. Telomere sind die nicht kodierenden Enden der Chromosomen (DNA-Doppelstrang). Eine mögliche Erklärung für erhöhte cfDNA-Werte bei älteren Personen könnte die durch Telomer-induzierte Seneszenz (Einstellung des Zellwachstums) und/oder Apoptose sein (47). Andererseits fanden viele Autoren keine Assoziation von cfDNA mit dem Alter (56, 119, 180). In der „Wingate“-Studie ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede von cfDNA bei jüngeren im Vergleich zu älteren Probanden (s. Tabelle 5.36). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass in der Kohorte vor allem trainierte ältere Personen und keine Untrainierten aufgenommen wurden. Jedoch schien bei einer Studie in der Literatur der individuelle Fitnesszustand bei der körperlichen Belastung auf einem Laufbandergometer keinen Einfluss auf die Kinetik der cfDNA zu haben (5). Ebenfalls konnte bei einer weiteren Studie auf dem Laufbandergometer kein Unterschied in der Höhe der

cfDNA-Werte von Trainierten im Vergleich zu untrainierten, gesunden Probanden gefunden werden (65). Bei einer weiteren Studie wurden gesunde Hundertjährige mit jungen Probanden verglichen, wobei keine Gewebeveränderung gefunden werden konnte. Einzig bei nicht gesunden Hundertjährigen wurden erhöhte Werte entdeckt. Daraus leiteten die Autoren ab, dass cfDNA auch als Biomarker für den Gesundheitsstatus verwendet werden könnte (184).

Während der letzten Sitzung der „Wingate“-Studie zeigten sich 24 h nach der Belastung noch erhöhte cfDNA-Werte bei den älteren Probanden. Dahingegen wiesen die jüngeren Probanden bereits 1 h nach der Belastung cfDNA-Werte um den Ausgangswert auf. Dies könnte auf eine schnellere Erholung und Stoffwechsellanpassung nach Anstrengung bei den jüngeren Probanden hindeuten. In der Literatur wurden diese Beobachtungen ebenfalls gemacht und cfDNA als möglicher sensitiver Biomarker für Stoffwechsellanpassungen aufgeführt (185). So führte auch eine Studie von hochintensivem Intervalltraining auf dem Fahrradergometer bei jüngeren Frauen bereits bei sechsmal 5 s zum gewünschten Trainingseffekt, wohingegen für ältere Frauen eher längere Intervalle von dreimal 60 s besser waren. Dies wurde durch die unterschiedlichen metabolischen Stressreaktionen erklärt, was sich auch darin zeigte, dass die älteren Frauen während der 5 s nicht auf ihre Höchstleistung kamen (186).

Für die Interaktion von cfDNA bei Adipositas konnte eine positive Korrelation von cfDNA mit viszeralem Fettgewebe gefunden werden, die durch Adipozytendegeneration entstand (187). Der BMI unterscheidet nicht, ob das Gewicht durch Fett- oder Muskelmasse erreicht wurde. Trotzdem wird oft der BMI in der Literatur herangezogen. Andere Autoren fanden keine Korrelation zwischen cfDNA und BMI (56, 119). Im Hinblick auf Ernährung wurde durch die Ergebnisse in dieser Dissertation vermutet, dass die längeren 222-bp-cfDNA-Fragmente aufgrund von Mittag- und Abendessen frei wurden (s. Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9). Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie, die nachweisen konnte, dass DNA-Fragmente durch einen noch ungeklärten Mechanismus über die Nahrung in den Blutkreislauf gelangten (188). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine verringerte cfDNA-Menge nach dem Frühstück und Mittagessen gemessen. Die Autoren spekulierten, dass ein erhöhter Blutfettanteil nach Nahrungsaufnahme die Messungen von cfDNA beeinträchtigen könnte (189). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass erhöhter Gemüsekonsum mit einer geringeren cfDNA-Menge einherging (181). Um den Faktor Ernährung so weit wie möglich auszuschließen, sollte die cfDNA-Blutentnahme am Morgen stattfinden und zuvor sollte keine Mahlzeit eingenommen worden sein (190, 191).

6.3 Messung von cfDNA mittels qPCR

Aufgrund der kurzen HWZ von cfDNA sowie der hohen Sensitivität und Spezifität gilt die Messung von cfDNA mittels Echtzeitquantifizierung durch die qPCR als präferierte Methode für die „Liquid Biopsy“ und wurde auch in dieser Dissertation angewandt (143, 145, 149). Darüber hinaus muss bei diesem Vorgehen die cfDNA aus den Proben nicht isoliert werden, was wiederum ein Vorteil zur Reduzierung von Fehlern ist. Zusätzlich ist auch keine vorherige Reinigung der cfDNA vor der Messung des L1PA2-Fragments notwendig (126).

Diese Dissertation konzentrierte sich auf die Messung der kürzeren cfDNA-Fragmente mit Hilfe des 90-bp-Primers (s. Abbildung 5.9 und Abbildung 5.10). Auch in der Literatur werden kürzere Fragmente bevorzugt, da sie eine Detektion von mehr cfDNA bereits bei geringerer Menge ermöglichen (192-194). Damit konnten sogar fast alle cfDNA-Fragmente gemessen werden, auch die an Nukleosomen gebundenen (64). Zudem schienen die kürzeren Fragmente auch nicht so schnell zu verschwinden wie die längeren Fragmente (5).

Der Integritätsindex lag im Referenzbereich von gesunden Probanden (s. Kapitel 5.3). Ein erhöhter Integritätsindex würde für mehr lange Fragmente und eine frühere Freisetzung sprechen. Der cfDNA-Integritätsindex wurde bisher vor allem im Zusammenhang mit Neoplasien beschrieben, wobei ein größerer Anteil an langen Fragmenten bei verschiedenen Tumorerkrankungen gefunden wurde (195-197). Eine Problematik der klinischen Anwendung von cfDNA ist das Fehlen von genauen Referenzwerten. Zwar gibt es Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Probanden, jedoch ist die Spannweite der cfDNA-Messwerte in verschiedenen Laboren aufgrund von fehlender Standardisierung noch groß (198).

Die gleichzeitige Verwendung von Positivkontrollen auf den zu messenden qPCR-Platten soll das Risiko von falsch positiven Ergebnissen vermindern, beispielsweise aufgrund von DNA-Kontaminationen. Darüber hinaus fungieren die Positivkontrollen zur Kalibrierung zwischen den einzelnen qPCR-Platten (Interassay-Variabilität) (157). Der exponentielle Zusammenhang der C_q-Werte und cfDNA-Menge konnte durch die Logarithmierung linearisiert werden, sodass auf die gemessene cfDNA-Anzahl geschlossen werden konnte. Eine von mehr als der doppelten Standardabweichung definierte Diskrepanz der C_q-Werte galt als Fehlmessung. Durch das Einsetzen von Negativkontrollen auf den qPCR-Platten erfolgte eine weitergehende Überprüfung, damit die Qualität und Richtigkeit sichergestellt wurden. In der Literatur wurde darauf hingewiesen, dass es bei der qPCR-Methode im Vergleich zu anderen Messmethoden gegebenenfalls zu einer höheren Anzahl an DNA-Kopien kommen könnte. Dies wurde mit der Vermutung von möglichen Artefakten bei den Standardkurven begründet (199). Somit sollte

bei der qPCR-Messmethode zukünftig weiter beobachtet werden, ob es tatsächlich zu einer höheren Anzahl an DNA-Kopien kommt.

6.4 Methodenkritik Statistische Auswertung

Das Studiendesign mit den Personengruppen in den unterschiedlichen Studien war nicht so gewählt, dass eine spezifische Berufsgruppe angesprochen wird. Jedoch können die analysierten Abläufe spezifischen Berufsgruppen entsprechen, weshalb sehr wohl Rückschlüsse auch auf die Arbeitsmedizin getroffen werden können.

Ein limitierender Faktor der Studien sind die geringen Fallzahlen. Durch die Planung und Durchführung der Interventionsstudien in Litauen war die Datenmenge zuvor schon festgelegt. Die relativ kleinen Stichproben lassen keine Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit zu, weshalb die Ergebnisse differenziert betrachtet und hinterfragt werden müssen. Es können Vermutungen und mögliche Trends der cfDNA-Werte abgeleitet sowie daraus resultierende physiologische Änderungen diskutiert werden. Zudem sind je nach Ein- und Ausschlusskriterien der verschiedenen Studien beispielsweise nur Männer oder jüngere Probanden eingeschlossen worden (s. Kapitel 4.2), was wiederum zu einem Selektionsbias führen kann.

Hohe Varianz und Ausreißer bei zu kleinen Stichproben können die Ergebnisinterpretation erschweren, was in Abbildung 5.27 beim totalen Schlafentzug im Hinblick auf die cfDNA-Werte ohne Hitzeexposition (Sauna) verdeutlicht wird. Im Gegensatz zur Hitzeexposition (mit Sauna) konnten hierbei die Tief- beziehungsweise Höhepunkte zu Beginn nicht plausibel erklärt werden. Darüber hinaus ergab der Vergleich von 8 h Schlaf mit 0 h Schlaf keinen signifikanten Unterschied, was physiologisch widersprüchlich zu sein scheint.

Darüber hinaus ist anzumerken, dass die explorative Analyse mit verschiedenen Tests (Omnibus-Test und Dunnett's Test) bei der „Brief Cooling“-Studie unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Signifikanz der Zeitpunkte gebracht hat (s. Tabelle 5.19). Dies könnte auf einen niedrigen Effekt zurückzuführen sein.

Hinsichtlich der Darstellung der cfDNA-Werte in logarithmierter Form wurde in der Literatur darauf hingewiesen, dass die Variabilität mancher Messungen dadurch homogener war (200). Die Logarithmierung mit der Basis von 10 kam in dieser Dissertation zur Anwendung.

6.5 CfDNA als Biomarker für Stresseinflüsse in der Berufswelt

Die Analyse von cfDNA im Rahmen der „Liquid Biopsy“ bietet mittels minimalinvasiver Methode eine Vielzahl von Möglichkeiten, wie bereits in Kapitel 2.3 dargelegt. Einige Autoren sehen in der Kombination von Biomarkern eine vielversprechende Zukunft, gerade auch für die personalisierte Medizin (201). Nicht nur in der personalisierten Medizin, sondern auch in der Arbeitsmedizin kann cfDNA als potenzieller Belastungsmarker eingesetzt werden. Wie in Kapitel 2.1 aufgeführt, prägen unterschiedlichste Stresseinflüsse das Bild unserer auf Leistung fokussierten Gesellschaft. In dieser Dissertation wurde cfDNA im Zusammenhang mit Belastungen quantifiziert, die typischerweise auch im Arbeitsalltag auftreten können. Zu diesen gehören Kälte- und Hitzeexposition, Schlafentzug sowie kurzfristige, eher kraftbetonte Belastungen, die außer Anforderungen an die Ausdauer auch mit Arbeitsbelastungen verknüpft sind.

Generell sollte cfDNA als Biomarker nicht nur isoliert betrachtet werden, sondern im Kontext der Person, da es intra- und interindividuelle Unterschiede gibt und diese berücksichtigt werden sollten (16, 202). Die Thematik ist auch in Kapitel 6.2 näher erläutert. Jedoch ist es fast unmöglich, alle Einflussfaktoren zu beachten, weshalb sich der Konflikt „ideal“ versus „real“ eröffnet (203). Zumindest sollte der Versuch unternommen werden, die Faktoren bestmöglich zu berücksichtigen.

Beim Sport erwies sich cfDNA als möglicher Leistungsdiagnostikmarker, der im Gegensatz zu den bisherigen Markern wie CK, C-reaktivem Protein oder Herzfrequenz beziehungsweise Blutdruck sensitiver reagierte und keine verzögerte Kinetik zeigte (13, 14, 41, 153, 204). Auch in dieser Dissertation wiesen die CK-Werte einen verspäteten Anstieg nach 6 h und 12 h auf. Wie es in der Literatur beschrieben wurde, waren die Werte auch noch 96 h danach erhöht (s. Abbildung 5.31) (57, 182). Außerdem sei der genaue Freisetzungsmechanismus von CK noch unbekannt, was aber für die Interpretation der Ergebnisse wichtig wäre. Eine weitere Problematik war die Messung von CK in Unit/Liter (U/l), wobei nur die aktiven und nicht die inaktiven Enzyme berücksichtigt wurden (202). Zudem gab es viele weitere Faktoren wie das Trainingsniveau oder die betroffenen Muskelgruppen, welche die CK-Messergebnisse beeinflussen könnten (205).

Des Weiteren spiegelt cfDNA als Vorteil gegenüber dem bekannten Leistungsmarker Laktat die aerobe und anaerobe Leistung wider (80, 124, 125). CfDNA wies bereits unter der Laktat-Steady-State erhöhte Werte auf (185). Als Definition der maximalen Laktat-Steady-State gilt die höchste Blutlaktatkonzentration unter Belastung, welche ohne konstante Laktatanhäufung über einen längeren Zeitraum beibehalten werden kann (206). Somit reagiert cfDNA auch sensitiver auf Intensitätsunterschiede, wie es bei aeroben Aktivitäten mit kurzen

Unterbrechungen der Fall war (80). Darüber hinaus war cfDNA im Gegensatz zu Laktat, unabhängig vom einzelnen Trainingslevel (5). Bei den Studien dieser Dissertation ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse der Laktatmessungen im Anschluss an die Belastung. Für die plyometrische Aktivität der „Drop Jump“-Studie wurden erniedrigte Laktatwerte durch die wahrscheinlich erhöhte Laktataufnahme des Muskels gemessen (s. Abbildung 5.33) (207). Wohingegen die Laktatwerte in der „Wingate“-Studie nach der Belastung als direkte Reaktion erhöht waren und auch 1 h danach das Ausgangsniveau noch nicht ganz erreicht hatten (s. Abbildung 5.42 und Abbildung 5.43). Im Vergleich mit der Literatur war bei einer Laufbandergometrie-Studie das Laktat bereits nach 30 min wieder auf das Ausgangslevel zurückgekehrt (80).

6.5.1 Physikalische Stresseinflüsse

Verschiedenste physikalische Stresseinflüsse sind allgegenwärtig. Im weiteren Verlauf soll auf die Einflüsse von sportlicher Aktivität, Kälte- und Hitzeexposition sowie zirkadianer Rhythmik eingegangen werden.

Die Einflussnahme von leichter sportlicher Aktivität wie einem Aufwärmprogramm oder Treppensteigen sollte nicht unterschätzt werden. Bereits sogar solche Betätigungen verursachten cfDNA-Anstiege, weshalb diese etwa 30 min bis 75 min vor einer cfDNA-Analyse vermieden werden sollten (153). So ruhten beispielsweise die Probanden der „Cooling H3“-Studie, der „Brief Cooling“-Studie sowie die Kontrollgruppe 20 min vor dem Start der Intervention (s. Kapitel 4.3, Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5).

Bedeutend für die Beurteilung der cfDNA sind die Verläufe mit Anstiegen und Abstiegen im Verhältnis zu den cfDNA-Ausgangswerten. Die Ergebnisse der „Drop Jump“-Studie dieser Dissertation führten zur Veröffentlichung mit dem Titel „Cell-free DNA kinetics in response to muscle-damaging exercise: A drop jump study“ (dt. zellfreie DNA-Kinetik als Reaktion auf muskelschädigendes Training: eine „Drop Jump“-Studie), da es bisher noch keine Untersuchungen zu cfDNA in diesem Zusammenhang gab (159). Generell stellte sich bei einer Studie beim Vergleich von 50 mit 100 „Drop Jumps“ heraus, dass bereits vor Ende der 50 „Drop Jumps“ ein Kräfte nachlass zustande kam. Der prädiktive Wert des Kraftverlustes nahm mit steigender Anzahl der Sprünge ab (208). Somit waren die 50 „Drop Jumps“ aus der „Drop Jump“-Studie in dieser Dissertation für Aussagen über den cfDNA-Verlauf eine ausreichende Anzahl. Bei der „Drop Jump“-Studie resultierte ein signifikanter Unterschied über die Zeitpunkte. Als Sofortreaktion auf die sportliche Aktivität wurde ein Höchstwert direkt nach der Intervention beobachtet. Auch 5 min danach wiesen die Messungen cfDNA-Werte auf einem ähnlich hohen Niveau auf (s. Tabelle 5.30 und Abbildung 5.29). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Literatur, wobei die cfDNA-Höchstwerte nach der Intervention

zwischen direkt danach und bis zu 20 min danach schwankten (5). Als plyometrische Übung eignen sich „Drop Jumps“, die vor allem exzentrische Kontraktionen hervorrufen, sehr gut für die Messung von Muskelschäden. Durch die relativ „langen“ Intervalle von 20 s zwischen den einzelnen Sprüngen wurde kein Stress auf die Stoffwechsellistung ausgeübt (159). Der erste cfDNA-Anstieg könnte als Sofortreaktion durch den akuten Verlust der Muskelfunktion hauptsächlich von der hämatopoetischen Zellreihe mit aktiver Freisetzung resultieren und folglich mit einer aseptischen Inflammation zusammenhängen (s. Kapitel 2.2.2). Auch in der Literatur wurde die Genese des schnellen, ersten cfDNA-Anstieges am ehesten aktiven Freisetzungsmechanismen zugeschrieben, vor allem durch die vitale NETose von neutrophilen Granulozyten (153). Eine schnelle aseptische Inflammation wurde aufgrund von Krafttraining vermutet, wozu ebenfalls „Drop Jumps“ zählen (14). In den Ergebnissen der „Drop Jump“-Studie konnte ein cfDNA-Anstieg als Spätreaktion mit 6 h bis 96 h danach beobachtet werden (s. Abbildung 5.29). Diese Zeitpunkte sind die beste Gelegenheit, um beispielsweise nach den Langzeiteffekten einer Trainingseinheit zu schauen. Die Spätreaktion könnte aufgrund der Entzündung durch die sportinduzierten Mikroverletzungen der Z-Scheiben und die Entstehung von ROS mit oxidativem Stress hervorgehen, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Eine spontane cfDNA-Freisetzung mittels „oxidativem Burst“, der Ausschüttung von ROS durch Leukozyten (neutrophile Granulozyten und Makrophagen), wurde beim Sport bereits vermutet (41). Sowohl aerobe als auch anaerobe Belastungen konnten ROS mit oxidativem Stress entwickeln (209). In der Literatur wurden in einer Kraft-Studie zunächst Übungen mit der Beinpresse und anschließend Hock- und Gegenbewegungssprünge durchgeführt. Hierbei konnten bis zu 48 h nach Belastung (Ende der Messungen) noch erhöhte cfDNA-Werte gemessen werden, welche auch sensibel für die unterschiedlichen Trainingsintensitäten waren (210). In einem anderen Studiendesign mit dreimal pro Woche Krafttraining konnte gezeigt werden, dass eine cfDNA-Erhöhung als Spätreaktion ebenfalls noch 48 h nach der letzten Trainingseinheit auftrat (14). Noch länger erhöhte cfDNA-Werte wies ein Krafttrainingsprogramm mit insgesamt 12 Wochen auf. Hierbei wurden viermal 3 Wochen mit 5 Tagen Pause zwischen den Blöcken absolviert. Der erste Block bestand aus einem Training mit geringem Umfang (zweimal pro Woche), der zweite Block mit hohem Umfang (viermal pro Woche), der dritte Block mit sehr hohem Umfang (sechsmal pro Woche) und der letzte Block wiederum mit geringem Umfang (zweimal pro Woche). Die cfDNA-Werte waren sogar 96 h nach der letzten Einheit des ersten, zweiten und dritten Blockes erhöht, jedoch nicht mehr nach dem letzten Block. Die Probanden konnten sich wieder erholen (13). Diese lang erhöhten cfDNA-Werte bis zu 96 h nach der Intervention spiegelten sich ebenfalls in dieser Dissertation wider (s. Abbildung 5.29). Lediglich der Ironman benötigte sogar 5 Tage, um wieder auf den Ausgangswert zurückzukehren (123). CfDNA

wurde in der Literatur aufgrund der langen Erhöhung bereits als möglicher Belastungsmarker für Übertraining vorgeschlagen (13, 211).

Als eine andere Form der sportlichen Aktivität repräsentiert die „Wingate“-Studie das HIIT, welches aufgrund der Zeiteffektivität und des Trainingseffektes immer beliebter wurde (212). Darüber hinaus wurde in der Literatur HIIT auf dem Laufbandergometer in einem verkürzten Zeitraum von 7 bis 14 Tagen mit und ohne anschließendes Training von geringer Intensität verglichen. Hierbei ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse. Es wurde darauf hingewiesen, dass der zusätzliche Trainingsumfang gegebenenfalls sogar negative Auswirkungen haben könnte (213). In dieser Dissertation resultierte ein signifikanter Unterschied über die gemessenen Zeitpunkte mit einem cfDNA-Höchstwert direkt danach als Sofortreaktion auf die sportliche Aktivität. Dahingegen wurde keine signifikante Auswirkung im Vergleich zwischen der ersten und letzten Sitzung beobachtet (s. Tabelle 5.36). Jedoch ergab sich ein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der Ausgangszeitpunkte zwischen der ersten und letzten Sitzung (s. Tabelle 5.39 und Tabelle 5.42). Zudem wurde ein Absinken der cfDNA-Werte bei den Ausgangszeitpunkten in der letzten Sitzung im Vergleich zur ersten Sitzung gesehen, sodass insgesamt auf einen Trainingseffekt geschlossen werden kann (s. Abbildung 5.37 und Abbildung 5.38). In der Literatur wurde beim hochintensiven Sprintintervalltraining auf dem Fahrradergometer ein solches Absinken der cfDNA-Ausgangswerte im Vergleich zu Beginn und am Ende der 3 Wochen nur bei älteren Probanden gesehen. Es wurde darauf hingewiesen, dass dieses Absinken eine Bedeutung bei der Stoffwechsel- und Trainingsadaptation spielen könnte (185). Eine weitere Studie mit HIIT auf dem Fahrradergometer über 3 Wochen mit neun Trainingseinheiten (4-6 Mal 30 s mit 4 min Pause) konnte zeigen, dass die Leistungssteigerung unabhängig vom Belastungsniveau war (214). Interessanterweise konnte eine Studie bis zur Erschöpfung auf dem Laufbandergometer an 3 unterschiedlichen Tagen mit 3 Tagen Pause dazwischen aufzeigen, dass dies jedes Mal zu einem fortschreitenden cfDNA-Anstieg führte und keine Toleranzentwicklung ergab (215).

Im Hinblick auf eine erweiterte Betrachtung der Stresseinflüsse gehört neben der sportlichen Aktivität auch die Forschung von cfDNA zu Kälte- und Hitzeexposition sowie Schlafentzug. Die Kälteexposition in 14 °C kaltem Wasser für 10 min rief eine Stressreaktion des Körpers mit Hyperventilation, Schüttelfrost, erhöhter Herzfrequenz sowie Ausschüttung von Stresshormonen hervor (216). Im Einklang mit diesen Beobachtungen der Stressreaktion wurde bei der „Brief Cooling“-Studie ein cfDNA-Anstieg direkt nach der Intervention als Sofortreaktion verzeichnet (s. Abbildung 5.19). Interessanterweise konnten mit den Ergebnissen dieser Dissertation gewisse Parallelen zur Literatur und dem Verlauf für Stresshormonmessungen von Adrenalin und Noradrenalin gefunden werden. In beiden Fällen kam es nach einem Anstieg als Sofortreaktion zu einem Abfall, wobei Adrenalin nach 1 h und

Noradrenalin nach 4 h das Ausgangsniveau wieder erreicht hatten. In der „Brief-Cooling“-Studie fielen die cfDNA-Werte sogar unter das Ausgangsniveau und sanken nach 1 h auf ihren Tiefpunkt. Darüber hinaus ergab sich nach dem kurzfristigen Abfall ein weiterer Anstieg mit noch höherem cfDNA-Peak als Spätreaktion mit bis zu 4 h bis 6 h beziehungsweise 48 h danach (s. Abbildung 5.19). Diesen Verlauf spiegelten auch die Stresshormone wider und zeigten einen Peak nach 24 h für Adrenalin und nach 48 h für Noradrenalin. Als mögliche Erklärung wurde am ehesten eine Zellumverteilung und nicht eine Zellzerstörung gesehen. Denn insgesamt konnte bei der kurzen Kälteexposition von 10 min ein verzögerter Abfall des Lymphozytenprozentsatzes bei gleichzeitigem Anstieg des Neutrophilenprozentsatzes beobachtet werden (216).

In ähnlicher Weise verhielt es sich bei der längeren Kälteexposition von insgesamt bis zu 2 h. Ein cfDNA-Anstieg wurde direkt nach der Intervention als Sofortreaktion verzeichnet sowie nach 4 h bis 6 h als Spätreaktion und ein Signifikanztrend nach 24 h (s. Abbildung 5.12 und Tabelle 5.17). Der zuvor erwähnte Lymphozytenabfall und Neutrophilenanstieg wurde auch hier in einer Studie mit längerer Kälteexposition von bis zu 2 h beobachtet, wobei die Zellen innerhalb von 6 h bis 12 h das Ausgangsniveau wieder erreicht hatten (217). In der Dissertation erwies sich kein Unterschied zwischen der ersten und der wiederholten Sitzung (s. Tabelle 5.16). Das heißt, dass die Probanden sich nicht so schnell und einfach an ihre physiologische Reaktion gewöhnt haben, was eine wichtige Neuigkeit in Bezug auf Trainingseffekte ist. Kälteanwendungen zur Regeneration nach dem Sport sind beliebt. Dabei wurde beobachtet, dass vor allem in der frühen Phase (innerhalb der ersten Stunde) die Erschöpfungswiderstandsfähigkeit und Erholungsfähigkeit verbessert werden konnten (218). Zudem sei in der Kälte nicht nur die Ausdauer verbessert, sondern auch die Ermüdbarkeit geringer (219).

Hinsichtlich einer Anpassung bei Kälteexposition im Berufsalltag konnte eine Studie feststellen, dass eine Akklimatisation innerhalb von knapp 3 Wochen stattfand. Hierbei ergab sich beispielsweise ein Wechsel von der Thermogenese mit Zittern hin zu einer Thermogenese ohne Muskelzittern (220).

Bei Betrachtung des Geschlechts während der längeren Kälteexposition schien dieses auf die cfDNA-Messungen keinen Einfluss zu haben, es ergab sich kein Unterschied im Omnibus-Test (s. Tabelle 5.16). Demgegenüber wurden im Dunnett's Test signifikante Unterschiede gefunden (s. Tabelle 5.17). Wegen der geringen Anzahl an Probanden kann nur vermutet werden, ob das Geschlecht bei Kälteexposition beispielsweise aufgrund von Körpergröße, Gewicht, Muskelmasse oder Körperfettanteil doch einen größeren Einfluss haben könnte. Dies konnte nicht abschließend untersucht werden. Mehrere Bestätigungen fand diese Vermutung

jedoch in der Literatur während der Beobachtung der allgemeinen Stressreaktion bei Kälteexposition. Beispielsweise zeigten Männer vermehrte Thermogenese durchs Zittern, was durch ihre größere Muskelmasse ermöglicht wurde. Zudem wiesen Männer eine Adrenalinerhöhung auf, bei Frauen konnte dahingegen während der Kälteexposition keine Erhöhung festgestellt werden. Für das Stresshormon Noradrenalin ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern (221). Interessanterweise fand eine Studie nach der Kälteexposition nur bei männlichen, nicht jedoch bei weiblichen Probanden eine eingeschränkte kognitive Leistung in der Gedächtnistestbatterie (222). Vermutet wurde unter anderem, dass die Adrenalinausschüttung bei Männern den präfrontalen Kortex beeinträchtigen könnte (223).

Für die längere Kälteexposition von bis zu 2 h, wie sie auch bei der „Cooling H3“-Studie zur Anwendung kam, kristallisierten sich zwei verschiedene Kältereaktionen im Wasser heraus: Einerseits diejenigen, welche schnell abkühlten und bereits vor Ablauf der 2 h Kälteexposition eine rektale Temperatur von 35,5 °C erreicht hatten. Andererseits diejenigen, welche langsamer abkühlten und nach 2 h Kälteexposition die rektale Temperatur immer noch nicht erreicht hatten (224). Dahingegen konnten bei einer darauffolgenden Hitzeexposition im 43–44 °C heißen Wasser bis zu einer rektalen Temperatur von 39,5 °C keine unterschiedlichen Reaktionen der oben genannten Probandengruppen beobachtet werden. Dies bezog sich auf die Muskelfunktion und die kognitive Leistung sowie auf die Stresshormonausschüttung. Somit entgehen auch junge Männer nicht dem Risiko von Überhitzung, Hitzeerschöpfung beziehungsweise Hitzeschock bei extremen Klimaverhältnissen in der Berufswelt (225).

Eine Studie konnte zeigen, dass eine Hitzeexposition durch Saunieren zahlreiche Werte in Hinblick auf kardiometabolische Erkrankungen verbesserte, unter anderem Stresshormone und die arterielle Gefäßsteifigkeit. Saunieren wurde sogar mit einem Training von mäßiger bis hoher Intensität verglichen und könnte damit eine alternative Präventionsstrategie für Berufe mit hoher Stressbelastung darstellen (226).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für Stresshormone in der Literatur ergaben sich in dieser Dissertation insgesamt keine Veränderungen der cfDNA-Werte aufgrund der Hitzeexposition in der Sauna (s. Tabelle 5.22). Als die unterschiedlichen Schlafentzugszeiten einzeln betrachtet wurden, kristallisierte sich Folgendes für den Stressor „Hitze“ heraus: Bei 8 h Schlaf, sprich keinem Schlafentzug, wurde doch ein signifikanter Unterschied bei mit oder ohne Sauna beobachtet (s. Tabelle 5.24). Dabei konnten cfDNA-Anstiege nach den Saunagängen verzeichnet werden (s. Abbildung 5.24). Bei 4 h bis 5 h Schlaf konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wobei vor allem der Saunagang am zweiten Abend zu einem höheren Anstieg von cfDNA-Werten führte. Auch die Werte insgesamt wiesen im Vergleich

zwischen „mit“ und „ohne“ Sauna höhere cfDNA-Werte als Stressreaktion auf (s. Tabelle 5.26 und Abbildung 5.26). Bei 0 h Schlaf, dem totalen Schlafentzug, konnte kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden (s. Tabelle 5.28). Wie bereits in den Ergebnissen erwähnt, schien hierbei der Stressor „0 h Schlaf“ zu überwiegen, sodass die Intervention mit Sauna keinen Unterschied mehr ausmachte.

Des Weiteren soll das Saunieren einen schützenden Effekt auf Gedächtniserkrankungen und die mentale Gesundheit gehabt haben. In einer Studie ergab sich nach dem Saunagang mit vier Durchgängen und anschließender Ruhezeit von 1 h keine Auswirkung auf die Leistung von Aufgabenausführungen im Vergleich zu vor der Intervention (227). Auch in der „Sleep Deprivation“-Studie hatte mentale Arbeit keine Auswirkungen auf die cfDNA-Messungen (s. Tabelle 5.22).

Ferner befasste sich eine Studie mit der Reaktion des Körpers während eines finnischen Saunagangs (Temperatur von 80 °C bis 90 °C, Luftfeuchtigkeit von 30 %) mit 4 h und 36 h Schlafentzug. Hierbei wurde der Saunagang am Abend vor der Intervention und am Abend nach dem Schlafentzug verglichen. Durch 36 h Schlafentzug ergaben sich eine geringere rektale Temperatur, Schweißproduktion und Herzfrequenz, jedoch ein erhöhter Blutdruck. Als Grund wurden eine verminderte Gefäßreaktivität sowie eine autonome Reaktion vermutet (228).

In Bezug auf cfDNA-Messungen zum Schlafentzug gab es in der Literatur bisher wenige Veröffentlichungen. Ein Beispiel war das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom, welches eine nächtliche Atemstörung bezeichnet. Der Sauerstoffmangel führte zu Aufwachphasen und generell zu einem nicht erholsamen Schlaf (229). Erhöhte cfDNA-Werte konnten in Erkrankten am Morgen nach der Schlafanalysennacht festgestellt werden (230). Schlafentzug hatte auch negative Auswirkungen auf die sportliche Leistungsfähigkeit am nächsten Tag, vor allem auf die Zeit nach dem Mittag. Zudem waren Aktivitäten betroffen, die auch kognitive Fähigkeiten wie Gedächtnis, Lernen, Reaktionszeit und Aufmerksamkeit erforderten. Ein Abfall von etwa 0,4 % pro Stunde Schlafentzug wurde gefunden (231). Dahingegen fand eine andere Studie heraus, dass eine Nacht totaler Schlafentzug das psychische Wohlbefinden und die exekutive Funktion beeinträchtigte. Die motorische Kontrolle während einer Geschwindigkeits-Genauigkeitsaufgabe, die Reaktionszeit und die maximale Kontraktion blieben jedoch unbeeinflusst (232).

Weiterführende cfDNA-Forschungen erschlossen sich aus dieser Dissertation zum Stressor „Schlafentzug“ in der „Sleep Deprivation“-Studie. Im Vergleich von 8 h Schlaf mit einem Schlafentzug von 4 h bis 5 h zeigte sich ein signifikanter Unterschied, jedoch nicht im Vergleich mit einem totalen Schlafentzug (0 h Schlaf) (s. Tabelle 5.22). Es erscheint physiologisch

widersprüchlich, dass 4 h bis 5 h eine größere Auswirkung als 0 h Schlaf haben sollen. Dies sollte mit einer größeren Stichprobe nochmals überprüft und weiter erforscht werden. Aufgeteilt nach den unterschiedlichen Schlafentzugszeiten kristallisierte sich Folgendes für den Stressor „Schlafentzug“ heraus: Bei 4 h bis 5 h Schlaf wurden über die Zeitpunkte signifikante Auswirkungen festgestellt, wobei es am dritten Morgen keinen Unterschied mehr gab (s. Tabelle 5.26). Dies ist plausibel, da die Probanden in der Nacht ja wieder 8 h schlafen und sich erholen konnten. Nach 0 h Schlaf zeigte sich ein sehr deutlicher cfDNA-Anstieg. Auch nach der zweiten Nacht, in der sie 8 h schlafen konnten, schienen sich die Probanden insgesamt vom Schlafentzug noch nicht ganz erholt zu haben (s. Abbildung 5.28).

Wird neben dem Schlafentzug der gesamte zirkadiane Rhythmus betrachtet, so wird der zirkadiane Einfluss auf cfDNA in der Literatur kontrovers diskutiert und ist nicht einheitlich geklärt. Eine Studie mit 20 männlichen Probanden über einen 24-h-Zyklus erwies keinen Effekt auf die cfDNA-Freisetzung durch den zirkadianen Rhythmus (233). In dieser Dissertation ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede für die Zeitpunkte der Kontrollmessungen zu den Kältestudien im Plasma (s. Tabelle 5.6 und Tabelle 5.7). In Übereinstimmung damit wurden in der Literatur bei vier gesunden Probanden auch keine signifikanten Abweichungen beobachtet. Weder bei fünf Messungen im Abstand von knapp 3 h ab 8:30 Uhr noch bei der Wiederholung nach 1 Woche (234). Bei Kontrollmessungen von gesunden Probanden in einer Studie zum Myokardinfarkt ergaben sich über 5 Tage täglich sowie über 5 Monate monatlich dieselben cfDNA-Grundwerte (235). Dahingegen verzeichnete eine andere Forschungsarbeit erhöhte cfDNA-Werte morgens um 9 Uhr (190). Beim Heranziehen einer Studie über den gesamten Tagesablauf konnte gezeigt werden, dass die cfDNA-Werte innerhalb eines Tages variierten und über den Tag verteilt bis zum Abend abnahmen. Auch hier wurde der Maximalwert zum Messbeginn um 9 Uhr erfasst, was sich an den anderen 3 Messtagen reproduzieren ließ (236). Ein Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Literaturergebnisse bezog sich auf die hämatopoetische Zellreihe, welche einen 24-h-Rhythmus habe und somit auch die cfDNA. Andererseits sei eine Freisetzung durch Apoptose wiederum nicht an eine zirkadiane Rhythmik gebunden (34). Insgesamt sollte eine standardisierte Blutentnahme in den Morgenstunden erfolgen, um adäquate Messergebnisse zu erzielen (203).

6.5.2 Psychische Stresseinflüsse

Psychische Stresseinflüsse wurden in dieser Dissertation als sekundärer Endpunkt während der „Sleep Deprivation“-Studie untersucht. Hierbei schien es keinen Unterschied im Vergleich zwischen dem Zeitpunkt 1 (erster Morgen) und Zeitpunkt 2 (erster Abend) zu geben, ob ein regulärer Tag ohne kognitive Aufgaben oder mit mentaler Arbeit verrichtet wurde (s. Tabelle

5.22). Somit konnte hier kein Zusammenhang von cfDNA und psychischen Stresseinflüssen bei der Arbeit hergestellt werden.

Im Gegensatz dazu konnte in der Literatur gezeigt werden, dass sich die cfDNA-Werte direkt nach der Intervention mit psychischem Stress im Vergleich zum Ruhewert verdoppelten und innerhalb von 15 min wieder normalisierten (237). Der hierbei verwendete Trier Social Stress Test ist ein validierter und standardisierter Test, um mentalen Stress zu erzeugen. Inhalt des Testes war, eine freie Rede vor Publikum und Kamera zu präsentieren sowie eine mathematische Aufgabe zu lösen (238, 239). Eine weitere Studie bestätigte diese Beobachtungen mit der doppelten Erhöhung der cfDNA-Werte nach Intervention (Trier Social Stress Test), wobei es hier 30 min dauerte, bis die Ausgangsrühewerte wieder erreicht wurden (240).

Aufgrund der geringen Fallzahl in der „Sleep Deprivation“-Studie könnte der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen akutem Stress und cfDNA-Erhöhung in dieser Dissertation noch keine Signifikanz ergeben haben. Somit könnte trotzdem, wie auch die Literatur beschreibt, cfDNA durchaus auch als ein Biomarker für psychischen Stress postuliert werden (237, 240). Dies dürfte damit an immer größerer Relevanz für die Arbeitsmedizin gewinnen, da Stresseinflüsse in der Berufswelt überall vorhanden sind.

7 Zusammenfassung

CfDNA bietet einen großen Anwendungsbereich, welcher sich immer weiter ausdehnt. Jedoch ist das Wissen über cfDNA noch unvollständig. Mit dieser Dissertation konnte eine Forschungslücke geschlossen werden. In einer Publikation wurden die neuen Aspekte von cfDNA in Bezug auf die „Drop Jump“-Studie veröffentlicht. Zudem konnte eine Abkratzmethode tiefgefrorener Proben etabliert werden, um mehrfache Ein- und Auftauzyklen mit cfDNA-Fragmentierung zu vermeiden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Probe oberflächlich abgekratzt oder aufgetaut wurde. Ebenso hatten die verschiedenen Pipettierhöhen innerhalb eines Röhrchens keinen Einfluss, da die cfDNA gleichmäßig verteilt war. Ein verpflichtend einheitlicher Standard wäre für die cfDNA-Probenverarbeitung und die qPCR-Messmethode hinsichtlich einer Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Studienergebnisse zwingend notwendig. Zwar gibt es präanalytische Empfehlungen, Protokolle und Richtlinien, jedoch dienten diese lediglich zur Orientierung. Des Weiteren sollten für die klinische Anwendung von cfDNA präzisere Referenzwerte festgelegt werden.

Unter Berücksichtigung der Literatur zeigten die diskutierten Ergebnisse, dass cfDNA sich als Alternative zu herkömmlichen Belastungsmarkern eignet. Im Gegensatz zu CK und Laktat erwies sich cfDNA sensitiver auf Intensitätsunterschiede, zeigte keine verzögerte Kinetik und spiegelte die aerobe und anaerobe Leistung wider. Sportliche Belastung, wie es bei der „Drop Jump“-Studie und der „Wingate“-Studie der Fall war, führte zu einer Sofortreaktion direkt nach der Belastung. Dieser cfDNA-Anstieg könnte mit einer aseptischen Inflammation zusammenhängen. Für die „Drop Jump“-Studie konnte eine Spätreaktion mit erhöhten cfDNA-Werten zwischen 6 h und bis zu 96 h nach der Intervention beobachtet werden. Damit kann nach Langzeiteffekten einer Trainingseinheit geschaut werden. Es wird angenommen, dass Mikroverletzungen und oxidativer Stress diese Spätreaktion hervorrufen. Für die „Wingate“-Studie konnte kein Unterschied zwischen der ersten und der letzten Sitzung gesehen werden. Jedoch ergab sich ein Absinken der cfDNA-Ausgangswerte in der letzten Sitzung im Vergleich zur ersten Sitzung, was auf einen Trainingseffekt hindeutet. Des Weiteren resultierte bei der „Wingate“-Studie kein Unterschied der cfDNA-Ergebnisse für den Faktor Alter, jedoch zeigten die älteren Probanden eine verzögerte Erholung und damit eine langsamere Stoffwechselanpassung.

Als weiterer Stresseinfluss ist neben der sportlichen Belastung auch die Kälteexposition zu nennen. Bei der „Brief Cooling“-Studie sowie bei der „Cooling H3“-Studie zeigte eine Sofortreaktion mit cfDNA-Anstieg direkt nach Intervention. Spätreaktionen mit erhöhten cfDNA-Werten wurden hierbei nach 2 h bis 6 h sowie 48 h für die „Brief Cooling“-Studie und

nach 4 h bis 6 h sowie ein Trend nach 24 h für die „Cooling H3“-Studie gefunden. Zudem ergab sich kein Unterschied zwischen der ersten und der wiederholten Sitzung, sodass keine schnelle Anpassung erfolgte („Cooling H3“-Studie). Dies ist eine weitere neue Erkenntnis hinsichtlich des Trainingseffektes. In Bezug auf den Faktor Geschlecht ergaben sich während der „Cooling H3“-Studie konträre Ergebnisse. Der Dunnett's Test zeigte teils signifikante Unterschiede, wobei die cfDNA-Konzentration durch das Geschlecht beeinflusst wurde. Möglicherweise waren die höheren Werte bei männlichen Probanden auf die Unterschiede der Muskelmasse und des Stoffwechsels zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu zeigte die cfDNA bei Hitzeexposition in der Sauna keine Veränderung. Erst als die unterschiedlichen Schlafentzugszeiten (4 h bis 5 h und nach 8 h Schlaf) einzeln betrachtet wurden, verdeutlichte sich für den Stressor „Hitze“ ein signifikanter Unterschied mit einem cfDNA-Anstieg. Kein Effekt wurde dahingegen beim totalen Schlafentzug (0 h Schlaf) gesehen. Hierbei schien der Stressor „Schlafentzug“ die Stressquelle „Hitze“ zu überlagern.

Zusätzliche cfDNA-Forschungen zum Schlafentzug erfolgten im Zusammenhang mit der „Sleep Deprivation“-Studie. Die Analyse von 4 h bis 5 h Schlaf ergab im Vergleich zu einer regulären Nacht (8 h Schlaf) einen signifikanten Unterschied. Aufgeteilt nach den unterschiedlichen Schlafentzugszeiten resultierte zudem beim totalen Schlafentzug mit 0 h Schlaf ebenfalls ein cfDNA-Anstieg. Trotz einer zweiten Nacht mit 8 h Schlaf waren die Auswirkungen des totalen Schlafentzuges anhand weiterhin erhöhter cfDNA-Werte erkennbar. In Betrachtung des gesamten zirkadianen Rhythmus ließ sich für die Plasmaproben kein Unterschied für die Zeitpunkte der „Control“-Studie feststellen.

Im Hinblick auf die psychischen Stresseinflüsse konnte in Verbindung von cfDNA mit mentaler Arbeit in der „Sleep Deprivation“-Studie kein Zusammenhang beobachtet werden. Womöglich könnte sich aufgrund der geringen Fallzahl noch keine Signifikanz ergeben haben. Deshalb sind für diese sowie für alle anderen Studien in dieser Dissertation weiterführende Forschungsarbeiten mit größeren Fallzahlen und weiter gefassten Einschlusskriterien notwendig. Damit können genauere Aussagen zur Validierung der Vermutungen und Trends sowie Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit getroffen werden. Trotzdem können die Ergebnisse sehr wohl spezifischen Berufsgruppen zugeordnet und auf die Arbeitsmedizin übertragen werden. Somit leistet diese Dissertation einen wichtigen Beitrag für weitere Erkenntnisse in diesem Gebiet. Die These, dass sich cfDNA als Biomarker der aseptischen Inflammation arbeitsmedizinisch relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse etabliert und an immer größerer Relevanz für die Arbeitsmedizin gewinnt, wurde bestätigt.

8 Literaturverzeichnis

1. Prof. Meyer B, Dr. Zill A, Dilba D. Entspann Dich, Deutschland! - TK-Stressstudie 2021. Techniker Krankenkasse; 2021.
2. Fink G. Stress: Concepts, Definition and History. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. 2017:1-9.
3. Ernst G, Franke, A. & Franzkowiak, P. Stress und Stressbewältigung: Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung; 2022 [updated 07.01.2022; cited 29.11.2023. Available from: <https://leitbegriffe.bzga.de/alphabetisches-verzeichnis/stress-und-stressbewaeltigung/>.
4. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6.
5. Breitbach S, Sterzing B, Magallanes C, Tug S, Simon P. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2014;117(2):119-30.
6. Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. Duale Reihe - Biochemie: Georg Thieme Verlag KG; 2012.
7. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):241-3.
8. Roth S, Wernsdorf SR, Liesz A. The role of circulating cell-free DNA as an inflammatory mediator after stroke. *Semin Immunopathol*. 2023;45(3):411-25.
9. Rahat B, Ali T, Sapehia D, Mahajan A, Kaur J. Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine. *Front Genet*. 2020;11:844.
10. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(6):426-37.
11. Liu S, Wang J. Current and Future Perspectives of Cell-Free DNA in Liquid Biopsy. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022;44(6):2695-709.
12. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100087.
13. Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Kouretas D, et al. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry*. 2006;52(9):1820-4.
14. Tug S, Tross A-K, Hegen P, Neuberger EWI, Helmig S, Schöllhorn W, et al. Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma. *PLoS one*. 2017;12(9):e0184668.
15. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:99-126.

16. Haller N, Reichel T, Zimmer P, Behringer M, Wahl P, Stöggel T, et al. Blood-Based Biomarkers for Managing Workload in Athletes: Perspectives for Research on Emerging Biomarkers. *Sports Med.* 2023;53(11):2039-53.
17. Neubauer O, König D, Wagner KH. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *European journal of applied physiology.* 2008;104(3):417-26.
18. Brenscheidt S, Siefer A, Dr. Hünefeld L, Dr. Backhaus N, Halke T, Lück M, et al. *Arbeitswelt im Wandel: Zahlen - Daten - Fakten.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2024.
19. Garthus-Niegel S, Hegewald J, Seidler A, Nübling M, Espinola-Klein C, Liebers F, et al. The Gutenberg health study: associations between occupational and private stress factors and work-privacy conflict. *BMC Public Health.* 2016;16:192.
20. Rudow B. *Die gesunde Arbeit: psychische Belastungen, Arbeitsgestaltung und Arbeitsorganisation.* 3., aktualisierte und erweiterte Auflage ed. München: De Gruyter, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH; 2014.
21. BAuA. *Gesundes Klima und Wohlbefinden am Arbeitsplatz.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2011.
22. Leistner W, Lohmann-Haislah A. *Lieferrn, lagern und befördern - Arbeitsbedingungen in Verkehrs- und Logistikberufen.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Fakten;* 2018.
23. BAuA. *Arbeitsbedingungen am Bau - Immer noch schwere körperliche Arbeit trotz technischen Fortschritts.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Factsheet 11;* 2014.
24. Brenscheidt S, Siefer A, Dr. Hünefeld L, Dr. Backhaus N, Halke T, Lück M, et al. *Arbeitswelt im Wandel: Zahlen - Daten - Fakten.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2023.
25. Brenscheidt S, Siefer A, Hinnenkamp H, Dr. Hünefeld L. *Arbeitswelt im Wandel: Zahlen - Daten - Fakten.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2018.
26. Raeth M, Hünefeld L, Kaboth A. *Arbeitsbedingungen und Arbeitszufriedenheit in der Zeitarbeit.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Fakten;* 2023.
27. Siefer A. *Körperlich harte Arbeit in Deutschland - immer noch weit verbreitet.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Fakten;* 2019.
28. Lück M, Dr. Hünefeld L. *Systemrelevant und belastet Arbeitsbedingungen im Lebensmitteleinzelhandel.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Fakten;* 2020.
29. BAuA. *Brennpunkt Nachtarbeit - Häufige Arbeitsbelastungen immer noch aktuell.* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. *baua: Factsheet 15;* 2015.

30. BAuA. Stressreport Deutschland 2019: Psychische Anforderungen, Ressourcen und Befinden. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2020.
31. Backhaus N, Wöhrmann AM, Tisch A. BAuA-Arbeitszeitbefragung: Vergleich 2015-2017-2019. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2020.
32. Wohlers K, Hombrecher M. Schlaf gut, Deutschland TK-Schlafstudie 2017. Techniker Krankenkasse; 2017.
33. Scholle K. Umfrage zur Schlafdauer der Deutschen in 2021: Statista; 2023 [updated 18.10.2023; cited 12.12.2023. Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1277683/umfrage/schlafdauer-der-deutschen/>.
34. Yuwono NL, Warton K, Ford CE. The influence of biological and lifestyle factors on circulating cell-free DNA in blood plasma. *Elife*. 2021;10.
35. Jankowiak S, Rossnagel K, Bauer J, Schulz A, Liebers F, Latza U, et al. Night shift work and cardiovascular diseases among employees in Germany: five-year follow-up of the Gutenberg Health Study. *Scand J Work Environ Health*. 2024.
36. Hinz A, Glaesmer H, Brahler E, Löffler M, Engel C, Enzenbach C, et al. Sleep quality in the general population: psychometric properties of the Pittsburgh Sleep Quality Index, derived from a German community sample of 9284 people. *Sleep medicine*. 2017;30:57-63.
37. BAuA. Arbeitsbedingungen in der deutschen Automobilindustrie. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. baua: Factsheet 13; 2015.
38. Lück M. Arbeiten an der Leistungsgrenze - Höhere Anforderungen, mehr gesundheitliche Beschwerden. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. baua: Fakten; 2018.
39. Marsland AL, Walsh C, Lockwood K, John-Henderson NA. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2017;64:208-19.
40. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun*. 2018;9(1):5068.
41. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med*. 2012;42(7):565-86.
42. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(8):1057-67.
43. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998;17(1):89-97.

44. Mondelo-Macía P, Castro-Santos P, Castillo-García A, Muínelo-Romay L, Díaz-Peña R. Circulating Free DNA and Its Emerging Role in Autoimmune Diseases. *J Pers Med*. 2021;11(2).
45. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta*. 2008;387(1-2):55-8.
46. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, et al. Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(18):6827.
47. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018;93(3):1649-83.
48. Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European journal of applied physiology*. 2008;104(4):711-7.
49. Mooren FC, Lechtermann A, Völker K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(9):1476-83.
50. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:502.
51. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*. 1975;35(9):2375-82.
52. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*. 2001;313(1-2):139-42.
53. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PloS one*. 2017;12(8):e0183915.
54. Helmig S, Frühbeis C, Krämer-Albers EM, Simon P, Tug S. Release of bulk cell free DNA during physical exercise occurs independent of extracellular vesicles. *European journal of applied physiology*. 2015;115(11):2271-80.
55. Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, Rosales Rodriguez I, Schliep KP, Schwendenwein D, et al. Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
56. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical chemistry*. 2011;57(4):633-6.
57. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(6):757-67.

58. Fleckenstein J, Neuberger EWI, Bormuth P, Comes F, Schneider A, Banzer W, et al. Investigation of the Sympathetic Regulation in Delayed Onset Muscle Soreness: Results of an RCT. *Front Physiol.* 2021;12:697335.
59. Tug S, Helmig S, Deichmann ER, Schmeier-Jürchott A, Wagner E, Zimmermann T, et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:164-73.
60. Neuberger EW, Sontag S, Brahmer A, Philippi KF, Radsak MP, Wagner W, et al. Physical activity specifically evokes release of cell-free DNA from granulocytes thereby affecting liquid biopsy. *Clinical epigenetics.* 2022;14(1):1-7.
61. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1055-81.
62. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6-63.
63. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol.* 2017;8:81.
64. Pisareva E, Mihalovičová L, Pastor B, Kudriavtsev A, Mirandola A, Mazard T, et al. Neutrophil extracellular traps have auto-catabolic activity and produce mononucleosome-associated circulating DNA. *Genome Med.* 2022;14(1):135.
65. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2014;117(3):325-33.
66. Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 2020;9(5):415-25.
67. Azzouz D, Palaniyar N. ROS and DNA repair in spontaneous versus agonist-induced NETosis: Context matters. *Front Immunol.* 2022;13:1033815.
68. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000;906:161-8.
69. Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2129-37.
70. Sánchez-Herrero E, Serna-Blasco R, Robado de Lope L, González-Rumayor V, Romero A, Provencio M. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. *Front Oncol.* 2022;12:943253.
71. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood.* 2000;95(2):724-5.

72. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histol Histopathol.* 1999;14(4):1159-64.
73. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* 1999;93(11):3956-63.
74. Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development.* 2013;140(1):3-12.
75. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 2009;23(21):2461-77.
76. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta.* 2004;25 Suppl A:S93-s101.
77. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update.* 2005;11(1):59-67.
78. Caicedo A, Benavides-Almeida A, Haro-Vinueza A, Peña-Cisneros J, Pérez-Meza Á A, Michelson J, et al. Decoding the nature and complexity of extracellular mtDNA: Types and implications for health and disease. *Mitochondrion.* 2024;75:101848.
79. Velders M, Treff G, Machus K, Bosnyák E, Steinacker J, Schumann U. Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clin Biochem.* 2014;47(6):471-4.
80. Haller N, Tug S, Breitbach S, Jörgensen A, Simon P. Increases in Circulating Cell-Free DNA During Aerobic Running Depend on Intensity and Duration. *International journal of sports physiology and performance.* 2017;12(4):455-62.
81. Robert Koch Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebsarten: Robert Koch Institut; 2020 [updated 07.12.2023; cited 05.01.2024. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html.
82. García-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, García-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol.* 2004;19(2):575-83.
83. Gao Q, Zeng Q, Wang Z, Li C, Xu Y, Cui P, et al. Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *Innovation (Camb).* 2022;3(4):100259.
84. Pourali G, Khalili-Tanha G, Nazari E, Maftooh M, Nassiri M, Hassanian SM, et al. Circulating Tumor Cells and Cell-free Nucleic Acids as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Curr Pharm Des.* 2023;29(10):748-65.
85. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86(3):136-42.

86. Papatheodoridi A, Karakousis N, Lembessis P, Chatzigeorgiou A, Papatheodoridis GV. The Significance of Circulating Cell-Free DNA Markers in Chronic Hepatitis B Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Pathogens*. 2021;10(11).
87. Marin AM, Sanchuki HBS, Namur GN, Uno M, Zanette DL, Aoki MN. Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Biomedicines*. 2023;11(4).
88. García-Ortiz MV, Cano-Ramírez P, Toledano-Fonseca M, Aranda E, Rodríguez-Ariza A. Diagnosing and monitoring pancreatic cancer through cell-free DNA methylation: progress and prospects. *Biomark Res*. 2023;11(1):88.
89. Soliman SE, Alhanafy AM, Habib MSE, Hagag M, Ibrahim RAL. Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Rep*. 2018;15:45-51.
90. Xue R, Yang L, Yang M, Xue F, Li L, Liu M, et al. Circulating cell-free DNA sequencing for early detection of lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023;23(7):589-606.
91. Erichsen L, Beermann A, Arauzo-Bravo MJ, Hassan M, Dkhil MA, Al-Quraishy S, et al. Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(6):1220-6.
92. Zavarykina TM, Lomskova PK, Pronina IV, Khokhlova SV, Stenina MB, Sukhikh GT. Circulating Tumor DNA Is a Variant of Liquid Biopsy with Predictive and Prognostic Clinical Value in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23).
93. Cheng X, Zhang L, Chen Y, Qing C. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the "liquid biopsies" in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):75.
94. Parida P, Baburaj G, Rao M, Lewis S, Damerla RR. Circulating cell-free DNA as a diagnostic and prognostic marker for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2023.
95. Chen C, Chen C, Sadeghi M. Evaluation of cell-free DNA accuracy as diagnostic biomarker for prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(2):749-66.
96. He W, Xiao Y, Yan S, Zhu Y, Ren S. Cell-free DNA in the management of prostate cancer: Current status and future prospective. *Asian J Urol*. 2023;10(3):298-316.
97. Lim JK, Kuss B, Talaulikar D. Role of cell-free DNA in haematological malignancies. *Pathology*. 2021;53(3):416-26.
98. Bingham N, Spencer A. The role of cell free DNA and liquid biopsies in haematological conditions. *Cancer Drug Resist*. 2020;3(3):521-31.
99. Schroers-Martin JG, Alig S, Garofalo A, Tessoulin B, Sugio T, Alizadeh AA. Molecular Monitoring of Lymphomas. *Annu Rev Pathol*. 2023;18:149-80.
100. Shao J, Shah S, Ganguly S, Zu Y, He C, Li Z. Classification of Acute Myeloid Leukemia by Cell-Free DNA 5-Hydroxymethylcytosine. *Genes (Basel)*. 2023;14(6).

101. Mali SB. Molecular screening of head neck cancer. *Oral Oncol.* 2023;144:106481.
102. Eroglu Z, Krinshpun S, Kalashnikova E, Sudhaman S, Ozturk Topcu T, Nichols M, et al. Circulating tumor DNA-based molecular residual disease detection for treatment monitoring in advanced melanoma patients. *Cancer.* 2023;129(11):1723-34.
103. Di Vincenzo F, Yadid Y, Petito V, Emoli V, Masi L, Gerovska D, et al. Circular and Circulating DNA in Inflammatory Bowel Disease: From Pathogenesis to Potential Molecular Therapies. *Cells.* 2023;12(15).
104. Tug S, Helmig S, Menke J, Zahn D, Kubiak T, Schwarting A, et al. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Immunol.* 2014;292(1-2):32-9.
105. Sakamoto R, Sawamura S, Kajihara I, Miyauchi H, Urata K, Otsuka-Maeda S, et al. Circulating tumor necrosis factor- α DNA are elevated in psoriasis. *J Dermatol.* 2020;47(9):1037-40.
106. Speake C, Ylescupidez A, Neiman D, Shemer R, Glaser B, Tersey SA, et al. Circulating Unmethylated Insulin DNA As a Biomarker of Human Beta Cell Death: A Multi-laboratory Assay Comparison. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):781-91.
107. Malhotra S, Miras MCM, Pappolla A, Montalban X, Comabella M. Liquid Biopsy in Neurological Diseases. *Cells.* 2023;12(14).
108. Chen L, Shen Q, Xu S, Yu H, Pei S, Zhang Y, et al. 5-Hydroxymethylcytosine Signatures in Circulating Cell-Free DNA as Diagnostic Biomarkers for Late-Onset Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2022;85(2):573-85.
109. Meng J, Wang F, Ji L, Liang Y, Nian W, Song L, et al. Comprehensive methylation profile of CSF cfDNA revealed pathogenesis and diagnostic markers for early-onset Parkinson's disease. *Epigenomics.* 2021;13(20):1637-51.
110. Nidadavolu LS, Feger D, Wu Y, Grodstein F, Gross AL, Bennett DA, et al. Circulating Cell-Free Genomic DNA Is Associated with an Increased Risk of Dementia and with Change in Cognitive and Physical Function. *J Alzheimers Dis.* 2022;89(4):1233-40.
111. Robichaud PP, Arseneault M, O'Connell C, Ouellette RJ, Morin PJ. Circulating cell-free DNA as potential diagnostic tools for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2021;750:135813.
112. Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, et al. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010;290(1-2):16-21.
113. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301.

114. Gaitsch H, Franklin RJM, Reich DS. Cell-free DNA-based liquid biopsies in neurology. *Brain*. 2023;146(5):1758-74.
115. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical chemistry*. 2003;49(4):562-9.
116. Martins-Ferreira R, Leal B, Chaves J, Li T, Ciudad L, Rangel R, et al. Epilepsy progression is associated with cumulative DNA methylation changes in inflammatory genes. *Prog Neurobiol*. 2022;209:102207.
117. Qian B, Li K, Lou X, Guo Y, Wang Y, Wu L, et al. Plasma Cell-Free DNA as a Novel Biomarker for the Diagnosis and Monitoring of Atherosclerosis. *Cells*. 2022;11(20).
118. Tan E, Liu D, Perry L, Zhu J, Cid-Serra X, Deane A, et al. Cell-free DNA as a potential biomarker for acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2023;47:101246.
119. Ma W, Zhang W, Liu H, Qian B, Lai R, Yao Z, et al. Plasma Cell-free DNA is a potential biomarker for diagnosis of calcific aortic valve disease. *Cardiology*. 2023.
120. De Vlaminck I, Valantine HA, Snyder TM, Strehl C, Cohen G, Luikart H, et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med*. 2014;6(241):241ra77.
121. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Müller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical chemistry*. 2004;50(9):1668-70.
122. Sugawara T, Fujita SI, Kuji T, Ishibashi N, Tamai K, Kawakami Y, et al. Dynamics of Specific cfDNA Fragments in the Plasma of Full Marathon Participants. *Genes (Basel)*. 2021;12(5).
123. Reichhold S, Neubauer O, Hoelzl C, Stadlmayr B, Valentini J, Ferk F, et al. DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free Radic Res*. 2009;43(8):753-60.
124. Haller N, Helmig S, Taenny P, Petry J, Schmidt S, Simon P. Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports. *PloS one*. 2018;13(1):e0191915.
125. Humińska-Lisowska K, Mieszkowski J, Kochanowicz A, Stankiewicz B, Niespodziński B, Brzezińska P, et al. cfDNA Changes in Maximal Exercises as a Sport Adaptation Predictor. *Genes (Basel)*. 2021;12(8).
126. Tug S, Mehdorn M, Helmig S, Breitbach S, Ehlert T, Simon P. Exploring the Potential of Cell-Free-DNA Measurements After an Exhaustive Cycle-Ergometer Test as a Marker for Performance-Related Parameters. *International journal of sports physiology and performance*. 2017;12(5):597-604.

127. Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, Tschan H. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *European journal of applied physiology*. 2010;110(4):695-701.
128. Gögenur M, Burcharth J, Gögenur I. The role of total cell-free DNA in predicting outcomes among trauma patients in the intensive care unit: a systematic review. *Crit Care*. 2017;21(1):14.
129. Chiu TW, Young R, Chan LY, Burd A, Lo DY. Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(1):13-7.
130. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, et al. Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. *Biomed Res Int*. 2014;2014:306580.
131. Hayun Y, Shoham Y, Krieger Y, Silberstein E, Douvdevani A, Ad-El D. Circulating cell-free DNA as a potential marker in smoke inhalation injury. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(12):e14863.
132. Charoensappakit A, Sae-Khow K, Rattanaliam P, Vutthikraivit N, Pecheenbuvan M, Udomkarnjananun S, et al. Cell-free DNA as diagnostic and prognostic biomarkers for adult sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2023;13(1):19624.
133. Wijeratne S, Butt A, Burns S, Sherwood K, Boyd O, Swaminathan R. Cell-free plasma DNA as a prognostic marker in intensive treatment unit patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1022:232-8.
134. Liehr T, Harutyunyan T, Williams H, Weise A. Non-Invasive Prenatal Testing in Germany. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(11).
135. Phuong NTN, Manh DH, Dumre SP, Mizukami S, Weiss LN, Van Thuong N, et al. Plasma cell-free DNA: a potential biomarker for early prediction of severe dengue. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019;18(1):10.
136. Hovhannisyan G, Harutyunyan T, Aroutiounian R, Liehr T. The Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential of Cell-Free DNA with a Special Focus on COVID-19 and Other Viral Infections. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18).
137. Stawski R, Nowak D, Perdas E. Cell-Free DNA: Potential Application in COVID-19 Diagnostics and Management. *Viruses*. 2022;14(2).
138. Hoeter K, Neuberger E, Fischer S, Herbst M, Juškevičiūtė E, Enders K, et al. Evidence for the utility of cfDNA plasma concentrations to predict disease severity in COVID-19: a retrospective pilot study. *PeerJ*. 2023;11:e16072.
139. Verebi C, Nectoux J, Gorwood P, Le Strat Y, Duriez P, Ramoz N, et al. A systematic literature review and meta-analysis of circulating nucleic acids as biomarkers in psychiatry. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2023;125:110770.

140. Melamud MM, Buneva VN, Ermakov EA. Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4).
141. Neuberger EWI, Brahmer A, Ehlert T, Kluge K, Philippi KFA, Boedecker SC, et al. Validating quantitative PCR assays for cfDNA detection without DNA extraction in exercising SLE patients. *Scientific reports.* 2021;11(1):13581.
142. The jamovi project (2021) [Computer Software]. [updated 30.04.2021; cited 18.09.2022. Version 1.8.1 Module: jmv 1.6.14, scatr 1.2.0, gamlj 2.4.8, jjstatsplot 0.0.2 [Available from: <https://www.jamovi.org>.
143. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clinical chemistry.* 2019;65(5):623-33.
144. Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L, Haller N, Jorgensen MM, Baek R, et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1615820.
145. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS one.* 2014;9(3):e87838.
146. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet.* 2009;10(10):691-703.
147. Ovchinnikov I, Rubin A, Swergold GD. Tracing the LINEs of human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10522-7.
148. Jiang P, Lo YD. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends in Genetics.* 2016;32(6):360-71.
149. Bohers E, Viailly PJ, Jardin F. cfDNA Sequencing: Technological Approaches and Bioinformatic Issues. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(6).
150. Mühlhardt C. *Der Experimentator - Molekularbiologie Genomics: Springer Spektrum;* 2013.
151. Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(7):2065-9.
152. Ableitner O. *Essentials - Einführung in die Molekularbiologie - Basiswissen für das Arbeiten mit DNA und RNA im Labor: Springer Spektrum;* 2018.
153. Neuberger EW, Simon P. Cell-free DNA in sports medicine: implications for clinical laboratory medicine. *LaboratoriumsMedizin.* 2022.
154. Andersson D, Akrap N, Svec D, Godfrey TE, Kubista M, Landberg G, et al. Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(8):1085-100.

155. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.
156. Neuberger E. Standard Operating Procedures der L1PA2-qPCR. 2021.
157. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8(2):R19.
158. Brazaitis M. Lithuanian Sports University, Institute of Sports Science and Innovation, Department of Applied Biology and Rehabilitation.
159. Juškevičiūtė E, Neuberger E, Eimantas N, Heinkel K, Simon P, Brazaitis M. Cell-free DNA kinetics in response to muscle-damaging exercise: A drop jump study. *Exp Physiol*. 2024.
160. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta*. 2015;450:243-53.
161. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clinical chemistry*. 2003;49(6):1028-9.
162. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1075:299-307.
163. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41(2):276-82.
164. Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*. 1975;56(2):512-5.
165. Barra GB, Santa Rita TH, de Almeida Vasques J, Chianca CF, Nery LF, Santana Soares Costa S. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem*. 2015;48(15):976-81.
166. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clinical chemistry*. 2004;50(1):256-7.
167. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*. 2009;404(2):100-4.
168. Witt N, Rodger G, Vandesompele J, Benes V, Zumla A, Rook GA, et al. An assessment of air as a source of DNA contamination encountered when performing PCR. *J Biomol Tech*. 2009;20(5):236-40.
169. Lui YY, Chik KW, Lo YM. Does centrifugation cause the ex vivo release of DNA from blood cells? *Clinical chemistry*. 2002;48(11):2074-6.

170. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EA, de Kok JB. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clinical chemistry*. 2003;49(3):525-6.
171. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clinical chemistry*. 2005;51(4):781-4.
172. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30.
173. Kim JJ, Park K, Han YR, Kim SH, Oh SB, Oh SY, et al. Verification of performance of a direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification, stability according to pre-analytical storage conditions, and the effect of freeze-thawing. *Biomed Rep*. 2021;15(2):68.
174. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1848-50.
175. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(12):1935-42.
176. Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, Murtaza M, Bronkhorst AJ, Pertile MD, et al. Harmonizing cell-free DNA collection and processing practices through evidence-based guidance. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(13):3104-9.
177. Fleischhacker M, Schmidt B. Pre-analytical issues in liquid biopsy—where do we stand? *Journal of Laboratory Medicine*. 2020;44(3):117-42.
178. Khier S, Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future science OA*. 2018;4(4):FSO295.
179. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, et al. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics*. 2011;6(5):623-9.
180. Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann Hematol*. 2007;86(2):139-43.
181. Kananen L, Hurme M, Bürkle A, Moreno-Villanueva M, Bernhardt J, Debacq-Chainiaux F, et al. Circulating cell-free DNA in health and disease - the relationship to health behaviours, ageing phenotypes and metabolomics. *Geroscience*. 2023;45(1):85-103.
182. Blumkaitis JC, Nunes N, Strepp T, Tomaskovic A, Wenger M, Widauer H, et al. Exploring sex differences in blood-based biomarkers following exhaustive exercise using bioinformatics analysis. *Biol Sport*. 2024;41(3):105-18.
183. Pölcher M, Ellinger J, Willems S, El-Maarri O, Höller T, Amann C, et al. Impact of the menstrual cycle on circulating cell-free DNA. *Anticancer Res*. 2010;30(6):2235-40.

184. Teo YV, Capri M, Morsiani C, Pizza G, Faria AMC, Franceschi C, et al. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12890.
185. Juškevičiūtė E, Neuberger E, Eimantas N, Venckunas T, Kamandulis S, Simon P, et al. Three-week sprint interval training (SIT) reduces cell-free DNA and low-frequency fatigue but does not induce VO₂max improvement in older men. *European journal of applied physiology*. 2023.
186. Krusnauskas R, Venckunas T, Snieckus A, Eimantas N, Baranauskiene N, Skurvydas A, et al. Very Low Volume High-Intensity Interval Exercise Is More Effective in Young Than Old Women. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8913187.
187. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv*. 2016;2(3):e1501332.
188. Spisák S, Solymosi N, Itzész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, et al. Complete genes may pass from food to human blood. *PloS one*. 2013;8(7):e69805.
189. Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(7):484-507.
190. Meddeb R, Dache ZAA, Thezenas S, Otandault A, Tanos R, Pastor B, et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific reports*. 2019;9(1):5220.
191. Pedlar CR, Newell J, Lewis NA. Blood Biomarker Profiling and Monitoring for High-Performance Physiology and Nutrition: Current Perspectives, Limitations and Recommendations. *Sports Med*. 2019;49(Suppl 2):185-98.
192. Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, Birri D, Kolla V, Lapaire O, et al. Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. *Clinical chemistry*. 2010;56(1):136-8.
193. Horlitz M, Lucas A, Sprenger-Haussels M. Optimized quantification of fragmented, free circulating DNA in human blood plasma using a calibrated duplex real-time PCR. *PloS one*. 2009;4(9):e7207.
194. Grunt M, Hillebrand T, Schwarzenbach H. Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Translational Cancer Research*. 2017:S171-S84.
195. Jiang P, Lo YMD. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet*. 2016;32(6):360-71.
196. Salem R, Ahmed R, Shaheen K, Abdalmegeed M, Hassan H. DNA integrity index as a potential molecular biomarker in colorectal cancer. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2020;21(1):38.
197. Chudasama DY, Aladag Z, Felicien MI, Hall M, Beeson J, Asadi N, et al. Prognostic value of the DNA integrity index in patients with malignant lung tumors. *Oncotarget*. 2018;9(30):21281-8.

198. De Miranda FS, Barauna VG, Dos Santos L, Costa G, Vassallo PF, Campos LCG. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
199. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(26):6499-512.
200. Curran-Everett D. Explorations in statistics: the log transformation. *Adv Physiol Educ.* 2018;42(2):343-7.
201. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
202. Haller N, Behringer M, Reichel T, Wahl P, Simon P, Krüger K, et al. Blood-Based Biomarkers for Managing Workload in Athletes: Considerations and Recommendations for Evidence-Based Use of Established Biomarkers. *Sports Med.* 2023;53(7):1315-33.
203. Haller N, Blumkaitis JC, Strepp T, Schmuttermair A, Aglas L, Simon P, et al. Comprehensive training load monitoring with biomarkers, performance testing, local positioning data, and questionnaires - first results from elite youth soccer. *Front Physiol.* 2022;13:1000898.
204. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Destouni A, Michailidis Y, Vrettou C, et al. Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clin Biochem.* 2010;43(16-17):1368-70.
205. Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2014;14(1):68-77.
206. Billat VL, Sirvent P, Py G, Koralsztein JP, Mercier J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med.* 2003;33(6):407-26.
207. Spengler CM, Roos M, Laube SM, Boutellier U. Decreased exercise blood lactate concentrations after respiratory endurance training in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999;79(4):299-305.
208. Skurvydas A, Brazaitis M, Venckūnas T, Kamandulis S. Predictive value of strength loss as an indicator of muscle damage across multiple drop jumps. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.* 2011;36(3):353-60.
209. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med.* 2009;8:1.
210. Andreatta MV, Curty VM, Coutinho JVS, Santos MÂ A, Vassallo PF, de Sousa NF, et al. Cell-Free DNA as an Earlier Predictor of Exercise-Induced Performance Decrement Related to Muscle Damage. *International journal of sports physiology and performance.* 2018;13(7):953-6.

211. Yin L, Guo Z, Wang T, Wang X. Increase of circulating cfDNA by chronic training or overtraining in human and rat and its possible mechanisms. *Science & Sports*. 2022;37(1):58-67.
212. Stöggl TL, Strepp T, Wiesinger HP, Haller N. A training goal-oriented categorization model of high-intensity interval training. *Front Physiol*. 2024;15:1414307.
213. Stöggl TL, Blumkaitis JC, Strepp T, Sareban M, Simon P, Neuberger EW, et al. The Salzburg 10/7 HIIT shock cycle study: the effects of a 7-day high-intensity interval training shock microcycle with or without additional low-intensity training on endurance performance, well-being, stress and recovery in endurance trained athletes—study protocol of a randomized controlled trial. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*. 2022;14(1):1-16.
214. Krusnauskas R, Eimantas N, Baranauskiene N, Venckunas T, Snieckus A, Brazaitis M, et al. Response to Three Weeks of Sprint Interval Training Cannot Be Explained by the Exertional Level. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(8).
215. Stawski R, Walczak K, Kosielski P, Meissner P, Budlewski T, Padula G, et al. Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PloS one*. 2017;12(5):e0178216.
216. Eimonte M, Paulauskas H, Daniuseviciute L, Eimantas N, Vitkauskiene A, Dauksaite G, et al. Residual effects of short-term whole-body cold-water immersion on the cytokine profile, white blood cell count, and blood markers of stress. *Int J Hyperthermia*. 2021;38(1):696-707.
217. Eimonte M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Paulauskas H, Vitkauskiene A, Dauksaite G, et al. Recovering body temperature from acute cold stress is associated with delayed proinflammatory cytokine production in vivo. *Cytokine*. 2021;143:155510.
218. Chaillou T, Treigyte V, Mosely S, Brazaitis M, Venckunas T, Cheng AJ. Functional Impact of Post-exercise Cooling and Heating on Recovery and Training Adaptations: Application to Resistance, Endurance, and Sprint Exercise. *Sports Med Open*. 2022;8(1):37.
219. Solianik R, Skurvydas A, Pukėnas K, Brazaitis M. Comparison of the effects of whole-body cooling during fatiguing exercise in males and females. *Cryobiology*. 2015;71(1):112-8.
220. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Baranauskiene N, Skrodeniene E, Skurvydas A. Time course of physiological and psychological responses in humans during a 20-day severe-cold-acclimation programme. *PloS one*. 2014;9(4):e94698.
221. Solianik R, Skurvydas A, Vitkauskienė A, Brazaitis M. Gender-specific cold responses induce a similar body-cooling rate but different neuroendocrine and immune responses. *Cryobiology*. 2014;69(1):26-33.
222. Solianik R, Skurvydas A, Mickevičienė D, Brazaitis M. Intermittent whole-body cold immersion induces similar thermal stress but different motor and cognitive responses between males and females. *Cryobiology*. 2014;69(2):323-32.

223. Solianik R, Skurvydas A, Urboniene D, Eimantas N, Daniuseviciute L, Brazaitis M. Similar cold stress induces sex-specific neuroendocrine and working memory responses. *Cryo Letters*. 2015;36(2):120-7.
224. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Mickeviciene D, Steponaviciute R, Skurvydas A. Two strategies for response to 14 °C cold-water immersion: is there a difference in the response of motor, cognitive, immune and stress markers? *PLoS one*. 2014;9(9):e109020.
225. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Vitkauskiene A, Paulauskas H, Skurvydas A. Two strategies for the acute response to cold exposure but one strategy for the response to heat stress. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(4):325-35.
226. Henderson KN, Killen LG, O'Neal EK, Waldman HS. The Cardiometabolic Health Benefits of Sauna Exposure in Individuals with High-Stress Occupations. A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(3).
227. Cernych M, Satas A, Brazaitis M. Post-sauna recovery enhances brain neural network relaxation and improves cognitive economy in oddball tasks. *Int J Hyperthermia*. 2018;35(1):375-82.
228. Cernych M, Satas A, Rapalis A, Marozas V, Malciene L, Lukosevicius A, et al. Exposure to total 36-hr sleep deprivation reduces physiological and psychological thermal strain to whole-body uncompensable passive heat stress in young adult men. *J Sleep Res*. 2021;30(2):e13055.
229. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet*. 2014;383(9918):736-47.
230. Bauça JM, Yañez A, Fueyo L, de la Peña M, Pierola J, Sánchez-de-la-Torre A, et al. Cell Death Biomarkers and Obstructive Sleep Apnea: Implications in the Acute Coronary Syndrome. *Sleep*. 2017;40(5).
231. Craven J, McCartney D, Desbrow B, Sabapathy S, Bellinger P, Roberts L, et al. Effects of Acute Sleep Loss on Physical Performance: A Systematic and Meta-Analytical Review. *Sports Med*. 2022;52(11):2669-90.
232. Skurvydas A, Zlibinaite L, Solianik R, Brazaitis M, Valanciene D, Baranauskiene N, et al. One night of sleep deprivation impairs executive function but does not affect psychomotor or motor performance. *Biol Sport*. 2020;37(1):7-14.
233. Poulet G, Hulot JS, Blanchard A, Bergerot D, Xiao W, Ginot F, et al. Circadian rhythm and circulating cell-free DNA release on healthy subjects. *Scientific reports*. 2023;13(1):21675.
234. Wagner JT, Kim HJ, Johnson-Camacho KC, Kelley T, Newell LF, Spellmann PT, et al. Diurnal stability of cell-free DNA and cell-free RNA in human plasma samples. *Scientific reports*. 2020;10, 16456.

235. Xie J, Yang J, Hu P. Correlations of Circulating Cell-Free DNA With Clinical Manifestations in Acute Myocardial Infarction. *Am J Med Sci*. 2018;356(2):121-9.
236. Madsen AT, Hojbjerg JA, Sorensen BS, Winther-Larsen A. Day-to-day and within-day biological variation of cell-free DNA. *EBioMedicine*. 2019;49:284-90.
237. Hummel EM, Hesses E, Muller S, Beiter T, Fisch M, Eibl A, et al. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational psychiatry*. 2018;8(1):236.
238. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*. 1993;28(1-2):76-81.
239. Allen AP, Kennedy PJ, Dockray S, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. The Trier Social Stress Test: Principles and practice. *Neurobiol Stress*. 2017;6:113-26.
240. Herhaus B, Neuberger E, Juškevičiūtė E, Simon P, Petrowski K. Kinetics of Plasma Cell-Free DNA under a Highly Standardized and Controlled Stress Induction. *Cells*. 2023;12(4).

9 Anhang

9.1 Ethikantrag Deutschland von Kirsten Heinkel

Antrag an die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz

I Allgemeine Angaben

1. Abkürzungsverzeichnis

cfDNA = zellfreie DNA

2. Datum der Antragsstellung

24.04.2019

3. Titel des Forschungsvorhabens

Zellfreie DNA als Biomarker der aseptischen Inflammation arbeitsmedizinisch relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse

4. Verantwortliche Studienleiter

Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Stephan Letzel
Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Universitätsmedizin Mainz
Obere Zahlbacher Str. 67
55131 Mainz
letzel@uni-mainz.de

Wissenschaftliche Kooperationspartner

Prof. Dr. Dr. Perikles Simon
Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Albert-Schweitzer-Str. 22
55128 Mainz
simonpe@uni-mainz.de

Dr. Elmo Neuberger
Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Albert-Schweitzer-Str. 22
55128 Mainz
neuberger@uni-mainz.de

5. Verantwortlicher Sponsor

Keiner

6. Handelt es sich um eine multizentrische Studie?

Nein.

7. Sonstige Teilnehmer mit Orts- und Berufsangabe (lokale Prüfarzte mit Angabe der Berufsbezeichnung und beruflicher Stellung; Chefarzt bzw. Leiter der klinischen Einrichtung, Oberarzt, Assistenzarzt, niedergelassener Arzt)

Kirsten Mögel
Humanmedizinstudentin
Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation am Institut für Sportwissenschaften
Albert-Schweitzer-Str. 22
55128 Mainz
kmoeegel@students.uni-mainz.de

8. Ort der Durchführung des Forschungsvorhabens

Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Albert-Schweitzer-Str. 22
55128 Mainz

9. Finanzierung

Keine.

10. Wurde das Forschungsvorhaben bereits einer anderen Ethikkommission vorgelegt und, wenn ja, mit welchem Ergebnis?

Ja, der Ethikkommission in Litauen mit positivem Ethikvotum (s. Anhänge).

II Begründung des Forschungsvorhabens

1. Ziele des Forschungsvorhabens

Wissenschaftlicher Hintergrund:

Die frei zirkulierende DNA (cfDNA) wurde bereits 1948 in gesunden Probanden entdeckt (1). Seitdem etabliert sich die cfDNA im Blutplasma immer mehr als möglicher Biomarker der aseptischen Inflammation (2) (3). CfDNA wurde im Rahmen von Erkrankungen wie Krebs (4) oder Apoplex (5), sowie bei sportlichen Aktivitäten wie Ultramarathon (6) oder Fahrradfahren (7) schon genauer untersucht. Auch kurze, intensive Ausbelastungen reichen aus, um die Menge an cfDNA sogar um das 7- bis 10-fache ansteigen zu lassen (8). Des Weiteren wurde der Einfluss von psychischem Stress auf die Menge an cfDNA beurteilt. Beim Trier Social Stress Test konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich die cfDNA-Werte im Plasma direkt nach der Intervention im Vergleich zum Ruhewert verdoppelt haben (2). Derzeit fehlen noch Untersuchungen zur Quantifizierung von cfDNA im Zusammenhang mit Belastungen, die typischerweise auch im Arbeitsalltag auftreten können, wie z.B. Schlafentzug, Hitze- und Kälteexposition. Zu diesen gehören weiterhin kurzfristige, einseitige, eher kraftbetonte Belastungen, die außer Anforderungen an die Ausdauer, auch mit Arbeitsbelastungen verknüpft sind. Hierzu wollen wir eine Forschungslücke schließen, die gleichzeitig arbeitsmedizinisch relevant ist. Die cfDNA könnte sich für die Objektivierung von psychischen und physischen Arbeitslasten eignen.

2. Gründe für die Durchführung, Problemdarstellung

Stresseinflüsse sind heutzutage allgegenwärtig. Laut einer Forsa-Umfrage (2017) im Auftrag der Techniker Krankenkasse schlafen 52% der Deutschen 6 Stunden oder weniger (9). Eine Studie mit 9284 Teilnehmern aus Deutschland ergab, dass 36% der Population Schlafprobleme haben (10). Des Weiteren müssen viele Berufsgruppen mit Schlafentzug zurechtkommen. Beispielhaft seien hier das Gesundheitswesen (Krankenpfleger/innen, Ärzte/innen) aufgeführt. Dies bedeutet gleichzeitig auch einen psychischen Stresseinfluss. Es gibt nicht nur Arbeitsplätze mit dem Stressfaktor Schlafentzug, sondern auch noch Kälte- oder Hitzeexposition. Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin veröffentlichte in ihrer Ausgabe 2018, dass 13,3% der Männer und 8,3% der Frauen die Stressoren Kälte und Hitze (zusammen mit Nässe, Feuchtigkeit und Zugluft) als belastend empfinden. In der Zeitarbeitsbranche hatten 31,3% der Leiharbeiter und 20,7% der Nicht Leiharbeiter mit diesen Arbeitsbedingungen zu kämpfen (11). Insgesamt wird die Anzahl der Kältearbeitsplätze auf 1 Million geschätzt (12). Zu Hitze arbeitsplätzen gehören beispielsweise die Stahlindustrie und die Arbeit an Rund- oder Kammeröfen. Ein weiteres Beispiel für Stresseinflüsse ist die sportliche Aktivität, was die Gesamtbevölkerung in Deutschland betrifft. Von intensiver sportlicher Ausbelastung am Arbeitsplatz können beispielsweise Postboten, Pflegekräfte, Putz-, Reinigungs- und Müllabfuhr Arbeitskräfte, sowie Nischenberufe wie Ballett-, Musicaldarsteller oder Profisportler betroffen sein. Bei all diesen genannten psychischen und physischen Stresseinflüssen könnte im Rahmen einer übermäßigen Beanspruchung eine aseptische Inflammation entstehen und somit cfDNA als potentieller Belastungsmarker freigesetzt werden.

3. Zielstellung

Ziel des Forschungsvorhabens ist es die Zusammenhänge und Unterschiede in der Kinetik der cfDNA bei verschiedenen Stresseinflüssen zu untersuchen. Es sollen bereits gewonnene Blutplasmaproben analysiert werden. Folgende Studien, mit jeweils unterschiedlichen physischen, psychischen oder physikalischen Einflussfaktoren werden eingeschlossen:

- Kälte: Brief (10min) acute whole-body cold immersion study = Brief Cooling-Studie (Litauen), hierbei exponierten sich 9 Probanden 10min 14°Grad kaltem Wasser (Kopf oberhalb des Wassers)
- Kälte: Intermittent acute whole-body cold immersion study = Cooling H3-Studie (Litauen), hierbei exponierten sich 10 Probanden 14°C kaltem Wasser insgesamt 170min (intermittierend 20min im Wasser und 10min Pause in thermoneutraler Umgebung von 23°)
- Kälte: Control-Studie = Kontrollgruppe (Litauen), 6 Probanden ohne Intervention
- Hitze (Sauna) und/oder Schlafentzug und/oder mentale Arbeit: Sleep Deprivation Study (Litauen), hierbei exponierten sich 9 Probanden in unterschiedlichen Kombinationen Hitze, Schlafentzug und mentaler Arbeit
- Sport: Drop Jump-Studie (Litauen), hierbei absolvierten 14 Probanden 50 intermittierende (im 30 Sekundenintervall) Drop Jumps aus 50cm Höhe
- Sport: Wingate-Studie (Litauen), hierbei absolvierten 20 Probanden einen Ausbelastungstest auf einem Fahrrad Ergometer (Wingate-Test).

4. Zusammenfassende Darstellung der tiereperimentellen und klinischen, pharmakologisch toxikologischen Eigenschaften von Prüfsubstanzen/Arzneimitteln, wenn diese studienbedingt eingesetzt werden

Entfällt.

III. Allgemeine Planung

1. Zusammenfassende Darstellung des Prüfablaufs

Studientitel:	Zellfreie DNA als Biomarker der aseptischen Inflammation arbeitsmedizinisch relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse
Antragsteller:	Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Stephan Letzel
Studienort:	Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Finanzierung	Keine
Studien-Design / -Art:	Messung vorhandener Plasmaproben aus Litauen
Probandenzahl:	Insgesamt 53 Probanden verteilt auf die verschiedenen Studien aus Litauen: Intermittent acute whole-body cold immersion study = Cooling H3-Studie mit Kontrollgruppe Brief (10min) acute whole-body cold immersion study = Brief Cooling-Studie Sleep Deprivation Study Drop Jump-Studie Wingate-Studie
Studienpopulation:	Probanden im Alter zwischen 18 und 70 Jahren

Gepanter Studienbeginn:	01.05.2019
Geplante Studiendauer:	Dauer der Messungen: ein halbes Jahr
Primäre Zielgrößen:	Auswirkung arbeitsmedizinisch relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse auf die Menge an zellfreier DNA (als Biomarker für aseptische Inflammation)
Sekundäre Zielgrößen:	Leistungsparameter, Blutwerte, Zytokinmessungen soweit vorhanden.

2. Geplanter Beginn und voraussichtliche Dauer des Forschungsvorhabens

Der geplante Beginn der Doktorarbeit ist der 01.05.2019. Die Messungen der Proben wird voraussichtlich ein halbes Jahr dauern.

3. Untersuchung an Patienten/ Kontrollgruppen.

In den bereits durchgeführten Studien waren ausschließlich gesunde Probanden inkludiert.

4. Darstellung des Studiendesigns

Es handelt sich um Messungen von Proben aus Interventionsstudien.

5. Im Rahmen der Studie werden keine Arzneimittel an Patienten / Probanden eingesetzt.

6. Angaben zum Monitoring und Audit

Entfällt

7. Bei Prüfungen mit Medizinprodukten angeben

Entfällt

8. Angaben zum Ausschluss einer Schwangerschaft

Probandinnen wurden nach Schwangerschaft gefragt.

IV. Auswahl der Patienten

1. Vollständige Einschlusskriterien Probanden

Intermittent acute whole-body cold immersion study = Cooling H3-Studie

Die Kriterien für die Cooling H3 Studie Aufnahme waren: Alter 18-35 Jahre; keine übermäßigen sportlichen Aktivitäten, d.h. weniger als 3 mal pro Woche; keine Beteiligung an einem Temperaturmanipulationsprogramm oder extreme Temperaturbelastung während der letzten 3 Monate; Nichtraucher und keine Einnahme von Medikamenten, die die natürliche Thermoregulation beeinträchtigen könnten. Personen mit Raynaud-Syndrom, Asthma, neurologischer Pathologie oder Erkrankungen, die sich durch Kaltwassereinwirkung verschlimmern könnten, wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und gaben eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung

Sleep Deprivation Study

Die Teilnehmer der Sleep Deprivation Study galten als gesund, ohne psychische Erkrankungen (z.B. Epilepsie oder Schizophrenie), waren körperlich aktiv ohne übermäßige sportliche Aktivitäten (weniger als 3 mal pro Woche), hatten eine normale oder korrigierte Sehschärfe und nahmen keine psychotropen Substanzen oder andere Medikamente zu sich. Die Teilnehmer wurden vor der Studie nicht an die Hitze gewöhnt. Sie wurden gebeten, anstrengende Übungen und jeglichen Alkoholkonsum innerhalb von 48

Stunden vor dem Test, geistige und körperliche Arbeit während des Testtages, jegliche Lebensmittel und Getränke (außer Wasser) innerhalb von 4 Stunden vor dem Test zu vermeiden sowie jegliches Essen und Trinken während beider Studienversuche zu vermeiden. Die Teilnehmer wurden gebeten, in der Nacht vor dem Test 7-8 Stunden zu schlafen. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und gaben eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

Drop Jump

Die Kriterien für die Aufnahme in die Drop Jump Studie waren: Alter 18-35 Jahre; keine übermäßigen sportlichen Aktivitäten, d.h. unter 3 mal pro Woche und Nichtraucher. Die Teilnehmer galten als gesund. Sie wurden gebeten, anstrengende Übungen und jeglichen Alkoholkonsum innerhalb von 48 Stunden vor dem Test, körperliche Arbeit während des Testtages sowie jegliche Lebensmittel und Getränke (außer Wasser) innerhalb von 4 Stunden vor dem Test zu vermeiden. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und gaben eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

Wingate

Die Wingate-Studie wurde an gesunden Probanden im Alter zwischen 18 und 28 Jahren sowie im Alter von 60 bis 70 Jahren mit 3-5 Sporteinheiten pro Woche durchgeführt. Alle Probanden mussten folgende Kriterien erfüllen: keine chronischen oder akuten Erkrankungen, eingeschlossen keine kardiovaskulären Erkrankungen, der Blutdruck sollte unter 140/85 mmHg liegen und die Probanden sollten keine Medikamente einnehmen. Weitere Ausschlusskriterien waren Alkohol-, Nikotin- oder Drogenkonsum. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und gaben eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

2. Vollständige Ausschlusskriterien für Probanden

Der Studienleiter hielt sich das Recht vor, die Untersuchung oder die Teilnahme jederzeit abbrechen. Im Falle von unerwünschten Nebenwirkungen von beispielsweise Kühlung und / oder Erwärmung sowie bei Nichteinhaltung der Anweisungen des Studienleiters, sollte die Untersuchung eingestellt werden. Die Probanden konnten die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen verlassen.

Bei körperlicher Anstrengung mit hoher Intensität hätten Schwindel und Übelkeit auftreten können. Daher wurde die Untersuchung von einem Arzt überwacht (Vitalfunktionen: Atmung, Herzrhythmus, Bewusstsein).

3. Werden Patienten eingeschlossen, bei denen Zweifel an der Einsichtsfähigkeit bestehen bzw. die Einsichtsfähigkeit nicht vorliegt?

Nein.

4. Wie werden Probanden / Patienten rekrutiert, wird Rekrutierungsmaterial eingesetzt?

Die Probanden wurden über Informationsveranstaltungen bei Sportvereinen, Massensport- und Wellnessveranstaltungen (Lauf- und Radwettbewerb) sowie während Universitätsvorlesungen an der litauischen Universität für Gesundheitswissenschaften Kaunas rekrutiert.

V. Ablauf

1. Darstellung der Aufnahme in das Forschungsvorhaben

Probanden, die sich während der Informationsveranstaltungen für die Studien interessiert haben, wurden gebeten sich zu melden. Anschließend wurde ein Termin für weiterführende Informationen, Aufklärung und eine Studieneinführung vereinbart.

2. Darstellung der Durchführung der Studienprotokolle aus Litauen

Cooling H3

Vor dem Start der Intermittent acute whole-body cold immersion study wurden 10 Probanden gebeten sich für 20min hinzulegen und auszuruhen. Anschließend wurden Kontrollmessungen durchgeführt (Herzfrequenz, pulmonale Gasaustausch, Haut- und Rektaltemperatur, Blutprobe („pre“) mit der Bestimmung von Lipiden und Glukose). Während der Intervention wurden die Probanden intermittierend

20min lang 14°C kalten Wasser, in halb liegender Position bis auf Höhe des Brustbeins, ausgesetzt. Nach Ablauf der Zeit konnten sich die Probanden 10min bei Raumtemperatur (23°C) ausruhen. Dies wiederholte sich insgesamt 170min oder bis die Rektaltemperatur unter 35,5°C sank. Anschließend wurden Temperaturparameter erhoben und eine Blutprobe entnommen. Dies wurde 1h, 2h, 4h, 12h, 24h und 48h nach der Intervention wiederholt.

Brief Cooling

Im Rahmen der Brief Cooling (10min) wurden die gleichen Vorbereitungen und Kontrollmessungen wie bei der zuvor beschriebenen Intermittent acute whole-body cold immersion study durchgeführt. Der Unterschied bestand darin, dass die 9 Probanden insgesamt am Stück 10min im 14°C kalten Wasser verharften (wieder halb liegend bis auf Höhe des Brustbeins). Die Kontrollmessungen nach der Intervention wurden direkt wieder „post“ (Haut- und Rektaltemperatur, Blutprobe) und 15min nach Intervention erhoben. Anschließend erfolgte die Proben und Datenerhebung 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h und 48h nach der Intervention.

Sleep Deprivation

Bei der Sleep Deprivation Study haben insgesamt 9 Probanden randomisiert 3 verschiedene Interventionsprogramme durchlaufen. 1. Die Teilnehmer haben nachts nicht geschlafen und mussten während der Nacht kognitive Aufgaben erfüllen, (Schlafentzug 40-42 Stunden). 2. Die Teilnehmer schliefen 4-5 Stunden in ihrem eigenen zu Hause. 3. Die Teilnehmer hatten ihren normalen Tagesablauf und schliefen 8 Stunden zu Hause. Jede Bedingung wurde mit und ohne Wärmebelastung (Sauna) getestet. Es wurden insgesamt 4 Saunadurchgänge durchgeführt, der Erste war 15min lang, die darauffolgenden drei Durchgänge dauerten 10min. Zwischen den Durchgängen konnten die Probanden 15min in thermoneutraler Umgebung ausruhen. Morgens und abends wurde jeweils eine Blutprobe entnommen.

Drop Jump

Im Rahmen der Drop Jump Studie wurden 14 gesunde Probanden eingeschlossen. Vor der eigentlichen Intervention haben die Teilnehmer eine Eingewöhnungseinheit für die Tief-Hoch-Sprünge durchgeführt, mit einer anschließenden Pause von 3 Tagen. Zu Beginn der Studie gab es Kontrollmessungen. Als Intervention wurden insgesamt 50 Drop Jumps, das heißt Tief-Hoch-Sprünge aus 0,5m Höhe im 30 Sekunden Intervall absolviert. Hierbei sollte die Landung prellend abgefangen und wieder nach oben gesprungen werden. Blutproben wurden 15min vor und kurz vor der Intervention, sowie direkt im Anschluss, 5min, 45min, 90min, 6h, 12h, 24, 48h, 72h und 96h danach entnommen.

Wingate

Über einen Zeitraum von 3 Wochen leisteten 10 junge Probanden (18 - 28 Jahre) sowie 10 alte Probanden (60 – 70 Jahre) 9 Trainingseinheiten mit 3 Trainingseinheiten pro Woche. In der Trainingseinheit 1 sollten die Probanden 6 x 30 s möglichst intensiv auf einem Fahrradergometer fahren. Während den einzelnen Belastungen hatten die Teilnehmer 4 min Pause. In den Trainingseinheiten 2-3 hatten die Teilnehmer 4 x 30 s Belastungsintervalle. In den Trainingseinheiten 5-7 jeweils 5 x 30 s Belastung und in den Einheiten 8 und 9 jeweils 6 x 30 s Belastung. Die Pausenzeit zwischen den Belastungseinheiten betrug jeweils 4 min. Blutproben wurden vor und nach der 1. Trainingseinheit, sowie vor und nach der letzten Trainingseinheit entnommen.

3. Erfolgt während der Studie eine Strahlenanwendung

Nein

4. Kontrolle des Gesundheitszustands der Patienten vor, während und nach dem Forschungsvorhaben

Es gab eine ärztliche Überwachung der Vitalparameter während den Studien in Litauen.

5. Regeln zum Abbruch des Forschungsvorhabens für den einzelnen wie auch für die Gesamtstudie

Die Studienteilnehmer durften die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abbrechen oder verlassen.

6. Regeln für die Fortführung einer Therapie nach Studienende
Entfällt

VI Statistik und Auswertung

1. Fallzahlbegründung

Die Anzahl der Probanden und die damit verbundene Anzahl von Plasmaproben wurde jeweils von dem Studienleiter begründet.

2. Angaben zu Dokumentations-Prüfbögen

Keine

3. Angaben zur Gewinnung, Lagerung, Nutzung von biologischen Proben (begreifbarer Nutzungszweck; Lagerungsdauer; Lagerungsort, d.h. welche Institutionen erhalten biologische Proben; wie werden die Proben verschlüsselt? Werden die Proben zusammen mit Gesundheitsdaten des Betroffenen weitergegeben?)

Die Proben wurden pseudonymisiert, durchnummeriert und bei -80°C gelagert.

VIII Ethisch-rechtliche Aspekte

1. Angaben darüber, dass die bestehenden Gesetze, Vorschriften und Richtlinien (siehe nachfolgende Auflistung) beachtet und eingehalten werden.

Bestehende Gesetze, Vorschriften und Richtlinien werden beachtet und eingehalten. Die letzte Fassung der Deklaration des Weltärztebundes über biomedizinische Forschung am Menschen, die Berufsordnung der deutschen Ärzte und das Datenschutzgesetz werden eingehalten.

2. Angaben zu folgenden Fragen

Dient das Forschungsvorhaben:

- unmittelbar dem Interesse der Patienten?
 - Nein.
- einem rein wissenschaftlichen Ziel?
 - Ja.
- der künftigen Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Verfahren?
 - Ja.
- Der Gewinnung von Erkenntnissen über Pathogenese und Prognose von Krankheiten?
 - Ja.
- der Gewinnung von Erkenntnissen über sozialmedizinische Probleme?
 - Ja.
- der Versorgungsforschung oder ausschließlich der lokalen Qualitätssicherung bzw. der Verbesserung von Lehre?
 - Nein
- Welche Vorteile entstehen für die Patienten/Probanden durch die Teilnahme an dem Prüfvorhaben?
 - Keine
- Bestehen Risiken/Komplikationen für die Patienten/Probanden? Wenn ja, welche?
 - Da die Studien schon alle in Litauen durchgeführt und von der dortigen Ethikkommission auch genehmigt wurden sind. Bestehen für die Probanden keinerlei Risiko oder Komplikationen.

3. Angaben zum Umgang mit den Probanden-Patientendaten: welche Gesundheitsdaten werden erhoben, gespeichert, ausgewertet? Werden die Daten personenbeziehbar (d.h. kodiert oder pseudonymisiert) oder anonymisiert erhoben und gespeichert? Werden Namen und/oder Kontaktdaten erfasst, an Dritte weitergegeben? Wer hat Zugang zu den gespeicherten Daten? Wie wird der Zugang kontrolliert? Wie lange werden die Daten gespeichert? An wen werden Daten personenbeziehbar (d.h. kodiert) oder anonymisiert weitergegeben? Liegt eine Stellungnahme des/der Datenschutzbeauftragten vor?

Die Patientendaten und weitere Informationen inklusive Untersuchungsplan, Dokumentationen, Genehmigungen und alle anderen studienbezogenen Daten werden in einem geschützten Studiendokumentenordner aufbewahrt. Alle im Rahmen der Studie erhobene Daten wurden pseudonymisiert und die ärztliche Schweigepflicht sowie die Datenschutzbestimmungen werden gewahrt. Eine Rückführung der Daten ist über den Studienleiter in Litauen möglich

4. Besteht entsprechender Versicherungsschutz?

Nein.

5. Wurden ähnliche Forschungsvorhaben oder vergleichbare Untersuchungen mit der Prüfsubstanz bereits durchgeführt? Wenn ja, mit welchem Ergebnis?

Körperliche Aktivität und psychischer Stress führen zu einer akuten Erhöhung der Level an frei zirkulierender DNA.

6. Angaben zur vorgesehenen Publikation inklusive Publikationsvereinbarung und Abschlussbericht

Die Publikation der Ergebnisse erfolgt im Rahmen der Doktorarbeit von Kirsten Mögel.

7. Angaben darüber, ob ein Proband-/Patientenausweis ausgestellt wird (wenn ja, Kopie beilegen)

Nein

8. Wird der weiterbehandelnde Arzt (in der Regel der Hausarzt) über die Teilnahme seines Patienten an dem Forschungsvorhaben informiert?

Nicht nötig.

9. Angaben zur notwendigen fachlichen Qualifikation, Erfahrung, Personal, und Ausstattung der Einrichtung, um das Forschungsvorhaben in der beantragten Weise durchzuführen (u.a. aktueller Lebenslauf);

In der Abteilung für Sportmedizin am Institut für Sportwissenschaft der Johannes Gutenberg-Universität Mainz ist Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Perikles Simon Abteilungsleiter. Das molekularbiologische Labor steht unter der Leitung von Dr. Elmo Neuberger und hat alles für die nötige Ausstattung der Probenaufbereitung, -verarbeitung, - Lagerung und Analyse vorhanden.

10. Kenntnisnahme des Klinikdirektors beilegen, wenn dieser nicht Antragsteller ist (siehe sog. Zusammenfassung)

Einverständnis des Leiters der Einrichtung

Der Leiter des Instituts für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin des Universitätsklinikums Mainz, Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Stephan Letzel ist mit der Durchführung des Projektes einverstanden.



Mainz, 10.04.2019

Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Stephan Letzel
Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Universitätsmedizin Mainz



Mainz, 10.04.2019

Univ.-Prof. Dr. Dr. Perikles Simon
Abteilungsleiter Lehre, Forschung, sportmedizinische
Tauglichkeitsuntersuchungen, Trainingsberatung

Anlagen:

Positive Ethikvoten aus Litauen

Confirmation Letter Probanden Litauen

Referenzen:

1. Mandel P, Metals P. The nucleic acids in blood plasma in humans. *CR Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3.
2. Hummel EM, Hesses E, Muller S, Beiter T, Fisch M, Eibl A, et al. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational psychiatry.* 2018;8(1):236.
3. Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Kouretas D, et al. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry.* 2006;52(9):1820-4.
4. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews Cancer.* 2011;11(6):426-37.
5. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical chemistry.* 2003;49(4):562-9.
6. Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European journal of applied physiology.* 2008;104(4):711-7.
7. Tug S, Mehdorn M, Helmig S, Breitbach S, Ehlert T, Simon P. Exploring the Potential of Cell-Free-DNA Measurements After an Exhaustive Cycle-Ergometer Test as a Marker for Performance-Related Parameters. *International journal of sports physiology and performance.* 2017;12(5):597-604.
8. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P. Short-term tread mill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical chemistry.* 2011;57(4):633-6.
9. Statista. Durchschnittliche Schlafdauer in Deutschland im Jahr 2017 2019 [Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/801663/umfrage/durchschnittliche-schlafdauer-in-deutschland/>].
10. Hinz A, Glaesmer H, Brahler E, Löffler M, Engel C, Enzenbach C, et al. Sleep quality in the general population: psychometric properties of the Pittsburgh Sleep Quality Index, derived from a German community sample of 9284 people. *Sleep medicine.* 2017;30:57-63.
11. Arbeitsmedizin BfAu. Arbeitswelt im Wandel: Zahlen - Daten - Fakten 2018 [05.04.2019]. Available from: <https://www.baua.de/DE/Angebote/Publikationen/Praxis/A99.html>.
12. Arbeitsmedizin BfAu. Gesundes Klima und Wohlbefinden am Arbeitsplatz. 2011.

9.2 Ethikvoten

9.2.1 Ethik-Kommission Deutschland



- Ethik-Kommission -

Landesärztekammer Rhld.-Pfl. · Postfach 29 26 · 55019 Mainz

Johannes Gutenberg-Universität,
Abteilung Sportmedizin

Johann-Joachim-Becher-Weg 31
55099 Mainz

Landesärztekammer Rheinland-Pfalz

Körperschaft des Öffentlichen Rechts
Postfach 29 26 · 55019 Mainz
Deutschhausplatz 3 · 55116 Mainz
Telefon (06131) 28822-63 /-64 /-65 /-67
Telefax (06131) 28822-66

Ansprechpartner:

Telefon:

E-Mail: ethik-kommission@laek-rlp.de

Bitte bei jedem Schriftwechsel die
Bearbeitungsnummer angeben!

Mainz, den 23.05.2019 / Ler

Antragstitel: Zellfreie DNA als Biomarker der aseptischen Inflammation arbeitsmedizinisch relevanter physikalischer und psychischer Stresseinflüsse
Antragsnummer: 2019-14256-Klinische Forschung / erstberatend

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz über Ihren Antrag beraten.

Auf der Grundlage der vorgelegten Unterlagen bestehen nach dem gegenwärtigen Stand keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der geplanten Studie. Sie erhalten damit ein zustimmendes Votum.

Ferner gibt die Ethik-Kommission folgende allgemeine Hinweise:

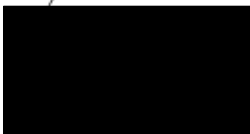
Die Verantwortlichkeit des Studienarztes bleibt in vollem Umfang bestehen und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Die Entscheidung ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Der Ethik-Kommission sind alle schwerwiegenden Komplikationen in beurteilbarer Form unverzüglich mitzuteilen. Die Ethik-Kommission bittet darum, dass ihr das Ergebnis der Studie zur Kenntnis gebracht wird.

Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethik-Kommission grundsätzlich nur kursorisch überprüft. Dieses Votum/diese Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen betrieblichen oder behördlichen Datenschutzbeauftragten.

Entsprechend § 9 der Geschäftsordnung der Ethik-Kommission wurde der Vorgang außerhalb einer Sitzung entschieden.

Mit freundlichen Grüßen





Folgende Unterlagen haben zur Beratung vorgelegen:

Antragsformular - Antragsformular SpoMed Mainz.PDF (hinzugefügt 17.04.2019)
Antrag auf Gebührenreduktion.pdf (hinzugefügt 17.04.2019)
sonstiges Studienmaterial - Confirmation letter.pdf (hinzugefügt 17.04.2019)
Antrag auf Gebührenreduktion - Antrag auf Gebührenreduktion.pdf (hinzugefügt 17.04.2019)
Antragsformular - Antragsformular.PDF (hinzugefügt 17.04.2019)
Datei Prüfsumme.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Kurzbeschreibung.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Informationsschrift und Einwilligungserklärung - nicht verfügbar - Informationsschrift.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Votum federführende/erstberatende Ethik-Kommission - Positives Ethikvotum Cooling und Sleep Deprivation.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Votum federführende/erstberatende Ethik-Kommission - Positives Ethikvotum Wingate.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Votum federführende/erstberatende Ethik-Kommission - Positives Ethikvotum Skenouta Hyperthermia.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
sonstiges Studienmaterial - Positives Ethikvotum Hyperthermia Elderly.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
sonstiges Studienmaterial - Positives Ethikvotum Drop Jump.pdf (hinzugefügt 10.04.2019)
Lebenslauf - Lebenslauf Prof. Dr. med. rer. nat. P. Simon.PDF (hinzugefügt 10.04.2019)
Prüfplan - Studienprotokoll.PDF (hinzugefügt 10.04.2019)
Anschreiben/Inhaltsverzeichnis - Anschreiben.PDF (hinzugefügt 10.04.2019)

Das Votum ist gültig für folgendes Studienzentrum:

Prof. Dr. Stephan Letzel,
Universitätsmedizin Mainz, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Obere Zahlbacher Straße 67, 55131 Mainz

9.2.2 Ethik-Kommission Litauen: Bestätigungsbrief Studienleiter



LIETUVOS SPORTO UNIVERSITETAS

Viešoji įstaiga, kodas 111951530, Sporto g. 6, LT-44221 Kaunas, tel.: (8-37) 30 26 21, faks.: (8-37) 20 45 15,
el. p. lsu@lsu.lt, http://www.lsu.lt, atsisk. sąsk. LT11 7044 0600 03325545 AB SEB bankas.
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre Kauno filiale.

Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. Perikles
Simon
Dpt. Sports Medicine,
Rehabilitation and Disease
Prevention
Faculty of Social Science, Media
and Sport
Johannes Gutenberg-University
Mainz

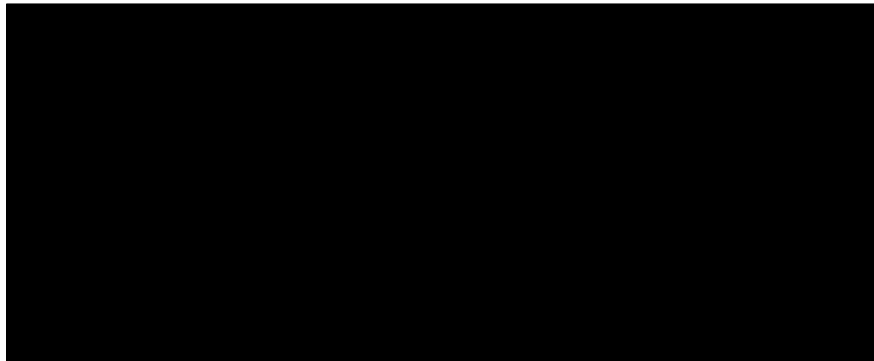
I

2019 03 19 Nr. 01-09-153
Nr.

CONFIRMATION LETTER

I, [REDACTED] certify that the Lithuanian ethics approvals for the mentioned studies, for which we have sent samples to our cooperation partner Prof. Perikles Simon, do include the purpose of laboratory analysis without further restriction.

Rector



10 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Gutachtern Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Stephan Letzel aus dem Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Jansky aus dem Institut für Allgemeinmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Elmo Neuberger aus der Abteilung für Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation des Instituts für Sportwissenschaft der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die sehr gute Unterstützung, die Beaufsichtigung im Labor und die Besprechungen, bei denen all die Fragen und Schwierigkeiten geklärt werden konnten. Danke auch an den Abteilungsleiter Herr Univ.-Prof. Dr. Dr. Perikles Simon für die Möglichkeit und das Überlassen der Dissertation.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung bedanken.

11 Lebenslauf

