

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Freisetzung von cell-free DNA unter psychosozialem Stress im Vergleich zu einer  
Ruhebedingung

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

Vorgelegt von

Sonja Brühl  
aus Karlsruhe

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 17. November 2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung und Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Theoretische Grundlagen von Stress.....	3
2.1.1 Definition .....	3
2.1.2 Stresstheorien .....	4
2.1.2.1 „Fight or flight“-Reaktion nach Walter Cannon.....	4
2.1.2.2 Generelles Adaptationssyndrom nach Hans Selye.....	5
2.1.2.3 Transaktionales Stressmodell nach Lazarus .....	5
2.1.2.4 Modell der Allostase und der allostatischen Last.....	6
2.1.2.5 Diathese-Stress-Modell .....	7
2.1.3 Stressachsen.....	7
2.1.3.1 Sympathiko-Adrenomedulläre Achse.....	7
2.1.3.2 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse .....	8
2.1.4 Stresshormone .....	9
2.1.4.1 Katecholamine .....	9
2.1.4.2 Cortisol .....	10
2.2 Theoretische Grundlagen von cell-free DNA.....	10
2.2.1 Definition .....	10
2.2.2 Struktur.....	11
2.2.3 Freisetzungsmechanismen.....	11
2.2.3.1 Apoptose .....	12
2.2.3.2 Nekrose .....	12
2.2.3.3 Pyroptose .....	13
2.2.3.4 NETose.....	13
2.2.3.5 aktive Sekretion .....	14
2.2.4 Elimination.....	14
2.3 Stress und cfDNA-Freisetzung.....	15

2.3.1	cfDNA-Freisetzung durch physischen Stress .....	15
2.3.2	cfDNA-Freisetzung durch psychischen Stress .....	17
2.4	Ableitung der Forschungsfrage .....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Stichprobenbeschreibung .....	20
3.2	Rekrutierung und Auswahl der Studienteilnehmer .....	22
3.3	Studiendesign .....	22
3.3.1	Ablauf der Ruhetestung .....	23
3.3.2	Ablauf der Stresstestung .....	24
3.3.3	Trierer Sozial Stress Test .....	24
3.4	Psychometrische Erhebungen .....	25
3.4.1	State-Trait Anxiety Inventory .....	25
3.4.2	Primary Appraisal Secondary Appraisal .....	26
3.4.3	Visuelle Analogskala .....	26
3.4.4	Gesundheitsanamnese.....	26
3.4.5	Symptomcheckliste SCL-90 .....	27
3.4.6	Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität.....	27
3.4.7	Beck-Depressions-Inventar .....	27
3.4.8	Perceived Stress Scale .....	28
3.4.9	Trierer Inventar zum chronischen Stress.....	28
3.4.10	Angstsensitivitätsindex .....	28
3.5	Blutprobenanalytik.....	29
3.6	Herzfrequenz-Analyse.....	30
3.7	Statistische Analyse .....	30
4	Ergebnisse .....	31
4.1	Psychische Symptome innerhalb der Stichprobe.....	31
4.1.1	Depressivität .....	32
4.1.2	Angst .....	33
4.1.3	Stress .....	33
4.1.3.1	subjektive allgemeine Stresswahrnehmung.....	33
4.1.3.2	chronische Stressbelastung.....	34

4.2	Vergleich des Stressempfindens während Stress- und Ruhetestung .....	34
4.2.1	Vergleich des Stressempfindens während TSST und Ruhebedingung ...	34
4.2.2	Vergleich des Stressempfindens nach TSST und Ruhebedingung .....	36
4.3	Vergleich des Verlaufs der Herzfrequenz während Ruhe- und Stresstestung 37	
4.4	Vergleich des Verlaufs der cfDNA-Konzentration während Ruhe- und Stresstestung .....	39
5	Diskussion .....	41
5.1	Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext.....	41
5.2	Klinische Implikationen .....	50
5.3	Stärken und Limitationen .....	56
5.4	Ausblick .....	59
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literaturverzeichnis .....	63
8	Danksagung .....	84
9	Tabellarischer Lebenslauf .....	85

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH:	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA:	Varianzanalyse
ASI:	Angstsensitivitätsindex
BDI:	Beck-Depressions-Inventar
BE:	Blutentnahme
BMI:	Body-Mass-Index
bp:	Basenpaare
bpm:	beats per minute
BRS:	Brief Resilience Scale
bzw.:	beziehungsweise
cfDNA:	cell-free DNA
cf-mtDNA:	cell-free mitochondrial DNA
CRH:	Corticotropin-Releasing Hormon
d:	Cohens d
df:	Anzahl der Freiheitsgrade
d.h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DNasen:	Desoxyribonukleasen
EV:	extrazelluläre Vesikel
G:	Gravitation
GAS:	generelles Adaptationssyndrom
GSI:	Global Severity Index der Symptomcheckliste 90
h:	Stunde
HF:	Herzfrequenz
HPA-Achse:	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse
HRV:	Herzratenvariabilität
HVL:	Hypophysenvorderlappen
ICD-10:	Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision
IL:	Interleukin
iv-Zugang:	intravenöser Zugang
M:	Mittelwert

mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
mtDNA:	mitochondriale DNA
N:	Gesamtmenge
NETs:	neutrophile extrazelluläre Fallen
NADPH:	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
p:	Signifikanz
PASA:	Primary Appraisal Secondary Appraisal
PSS:	Perceived Stress Scale
PTSD:	posttraumatische Belastungsstörung
RCF:	relative Zentrifugalbeschleunigung
s.:	siehe
SSCS:	12-Item-Screening-Skala des Trierer Inventar zum chronischen Stress
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PTBS:	Posttraumatische Belastungsstörung
qPCR:	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
PVN:	paraventriculärer Nukleus (des Hypothalamus)
RNA:	Ribonukleinsäure
SAM-Achse:	Sympathikus-Nebennierenmark-Achse
SD:	Standardabweichung
SCL-90:	Symptomcheckliste 90
STAI:	State-Trait Anxiety Inventory
TICS:	Trierer Inventar zum chronischen Stress
TNF $\alpha$ :	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSST:	Trierer Sozial Stress Test
u.a.:	unter anderem
VAS:	visuelle Analogskala
x:	x-Achsen-Abschnitt
z.B.:	zum Beispiel

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Stichprobenbeschreibung der 28 männlichen Probanden
- Tabelle 2: Psychische Symptome und Belastung innerhalb der Stichprobe anhand der SCL-90
- Tabelle 3: PASA der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST
- Tabelle 4: VAS der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST
- Tabelle 5: Herzfrequenz-Parameter der Stichprobe während Ruhe- und Stresstestung
- Tabelle 6: cfDNA-Parameter der Stichprobe während Ruhe- und Stresstestung

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Abbildung 2: Studiendesign und zeitlicher Ablauf der Ruhe- und Stresstestung

Abbildung 3: subjektive allgemeine Stresswahrnehmung der Stichprobe gemäß PSS

Abbildung 4: chronische Stressbelastung der Stichprobe gemäß SSCS des TICS

Abbildung 5: PASA der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST

Abbildung 6: Verlauf der Herzfrequenz während der Ruhe- und Stresstestung

Abbildung 7: Verlauf der cfDNA-Konzentration während der Ruhe- & Stresstestung

# 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Unsere moderne Welt besteht aus einem komplexen gesellschaftlichen Geflecht verschiedener und zu einem großen Teil miteinander konkurrierender Interessensgruppen. Inmitten dieses Geflechts ist das menschliche Individuum ständig mit oftmals widersprüchlichen beruflichen, familiären und privaten Ansprüchen und Herausforderungen konfrontiert. Somit ist unsere moderne Gesellschaft durch eine stetige Zunahme der subjektiven Stressbelastung geprägt (1, 2). Dies bleibt nicht ohne Folgen für unsere psychische und physische Gesundheit. Damit geht eine relevante sozioökonomische Belastung einher, denn das Ausmaß der subjektiven Stressbelastung korreliert signifikant mit der Anzahl der krankheitsbedingten Fehltag und mit der Höhe der damit verbundenen Gesundheitskosten für Arbeitnehmer, Arbeitgeber und Gesellschaft (3).

Sobald der menschliche Organismus in eine Situation gerät, die er als herausfordernd oder vital bedrohend bewertet, kommt es zu einer Aktivierung der Stressachsen und letztlich Ausschüttung der Stresshormone mit dem Ziel, die Herausforderung zu meistern und das Überleben zu sichern, exemplarisch durch den Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz und die Freisetzung von Glukose in die Blutbahn (4). Allerdings wird hierdurch auch das komplexe und empfindliche Zusammenspiel präzise aufeinander abgestimmter neuronaler, hormoneller und immunologischer Prozesse innerhalb des menschlichen Organismus aus dem Gleichgewicht gebracht. Während die akute und kurzfristige Anpassung des Gleichgewichts reversibel ist und der effektiven Stressbewältigung dient, kann häufiger bis chronischer Stress das Gleichgewicht auch langfristig und im schlimmsten Fall unwiederbringlich aushebeln, was in der Entstehung sowohl psychischer als auch somatischer Erkrankungen gipfelt (5, 6). Allerdings müssen hierbei die zum Teil erheblichen interindividuellen Unterschiede in Bezug auf die Bewertung und die Bewältigungsmöglichkeiten von Stress Berücksichtigung finden, was bedeutet, dass die Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung individuell verschieden ist (4, 5, 7). Fest steht jedoch, dass der Zusammenhang zwischen subjektiver Stressbelastung und einer Reihe psychischer Erkrankungen, darunter Depressionen, Angststörungen und Schizophrenie, bereits durch multiple Studien belegt werden konnte (8-10). Weiterhin ist bekannt, dass Stress einen modulierenden Effekt auf das Immunsystem ausübt und über die Freisetzung inflammatorischer Zytokine in die Blutbahn eine systemische Immun- und Entzündungsreaktion bewirkt (11, 12). Dies spielt eine zentrale Rolle in

der mit chronischem Stress assoziierten Pathogenese kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen (13, 14). Für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit gilt Stress sogar als ein unabhängiger Risikofaktor (15).

Aufgrund der hieraus resultierenden erheblichen gesundheitlichen, gesellschaftlichen und sozio-ökonomischen Belastung durch Stress, ist insbesondere angesichts der aktuell steigenden Tendenz der subjektiven Stressbelastung ein exaktes Verständnis der Stressreaktion und der stressassoziierten Krankheitsentstehung unabdingbar. In den letzten Jahren richtete sich das wissenschaftliche Interesse auf die Suche nach einem geeigneten Biomarker für Stress. Dieser kann dazu dienen, Personen mit einer erhöhten Stressvulnerabilität und somit Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung zu detektieren und folglich präventive Maßnahmen einzuleiten. Ein weiterer möglicher Anwendungsbereich ist das Monitoring von Krankheitsverlauf und Therapieansprechen stressassoziiierter Erkrankungen.

Die cell-free DNA (cfDNA) stellt einen solchen potenziellen Biomarker für Stress dar. Es handelt sich um extrazelluläre DNA-Fragmente, die physiologisch in nur sehr geringer Konzentration im Blut vorkommen und hauptsächlich hämatopoetischen Zellen entstammen (16). Erhöhte cfDNA-Konzentrationen findet man allerdings im Zusammenhang mit einer Vielzahl psychischer und somatischer Erkrankungen. Hierzu zählen neben malignen Erkrankungen, Sepsis und Trauma auch die oben genannten stressassoziierten somatischen und psychischen Erkrankungen (17-24). Von besonderem Interesse ist die Frage, ob und inwiefern die cfDNA an der physiologischen Stressreaktion oder gar an der stressassoziierten Krankheitsentstehung beteiligt ist. Hier muss zunächst die Frage beantwortet werden, ob akuter psychosozialer Stress bei Gesunden zu einer cfDNA-Freisetzung führt. Dies wurde bisher in zwei Studien untersucht, allerdings mit divergierenden Resultaten (25, 26). Zudem sind die beiden Studien durch das Fehlen einer ruhenden Kontrollgruppe, die keinerlei Stressoren ausgesetzt ist, limitiert. Bis dato existiert keine Studie, die den direkten Vergleich der cfDNA-Konzentration bei Gesunden zwischen einer Stress- und einer Ruhebedingung vornimmt. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, diese Forschungslücke zu schließen, und neue Erkenntnisse bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen psychosozialem Stress und cfDNA-Freisetzung zu gewinnen und darauf aufbauend einen Weg zum besseren Verständnis der Freisetzungsmechanismen und der Funktion von cfDNA und ihrer potenziellen Anwendung als Biomarker für Stress zu bereiten.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Theoretische Grundlagen von Stress

#### 2.1.1 Definition

Der Begriff „Stress“ entstand aus dem englischen Wort „distress“ und dem lateinischen „strictus“ (straff, stramm). Im damaligen Sprachgebrauch bedeutete dies so viel wie Druck, Anspannung oder Belastung (27). Der Begründer der Stressforschung Hans Selye bezeichnete Stress als eine unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung (28, 29). Heutzutage wird Stress definiert als Reaktion auf eine belastende Situation, deren Anforderungen die Bewältigungsmöglichkeiten des Individuums übersteigen (4). Alternativ wird Stress als eine reale oder empfundene Bedrohung der körperlichen oder psychischen Integrität beschrieben (6). Evolutionsbiologisch betrachtet, stellt Stress einen Verteidigungsmechanismus bei Bedrohung dar, welcher der Vorbereitung auf eine Flucht oder Kampfsituation dient (4). Durch Aktivierung der hormonellen Stressachsen werden die zum Überleben nötigen körperlichen Höchstleistungen ermöglicht (s. Kapitel 2.1.2 und 2.1.3).

Näher betrachtet, ist Stress ein übergeordneter Begriff für das Zusammenspiel von Stressor und Stressreaktion. Die Stressreaktion beschreibt die inneren Prozesse, die im betroffenen Individuum ablaufen. Der Begriff Stressor bezeichnet die stressauslösende Bedingung und umfasst alle situativen Anforderungsbedingungen, welche die Stressreaktion in Gang setzen (30). Hierzu zählen körperliche Stressoren (z.B. Verletzungen und Schmerzen), äußere physikalische Stressoren (z.B. Lärm, Hitze und Kälte), Gefahrensituationen und der Entzug primärer Bedürfnisse wie Wasser, Schlaf und Nahrung. Weiterhin gibt es soziale Stressoren, zu denen zwischenmenschliche Konflikte und Isolation zählen. Die Gruppe der Leistungsstressoren umfasst Situationen der Überforderung oder Unterforderung wie z.B. Prüfungen und Rehabilitationsmaßnahmen (5). Generell gilt, dass sich Stressoren häufig durch einen geringen Grad an Bekanntheit, Kontrollierbarkeit, Vorhersagbarkeit und Transparenz auszeichnen (31). Die Frage, ob und inwiefern ein Reiz als Stressor gilt, hängt außerdem wesentlich von der subjektiven Bewertung durch das Individuum und dessen Bewältigungsmöglichkeiten ab (4, 32). Dies führt gemeinsam mit der breiten Anwendung des Begriffs Stress im alltäglichen Sprachgebrauch, in der Populärliteratur und in den verschiedenen Forschungsdisziplinen dazu, dass es sich schwierig gestaltet, eine allgemein gültige Definition festzulegen (6).

Unabhängig von der Bandbreite an Definitionen und Stressoren steht allerdings fest, dass Stress für eine Vielzahl von Menschen zu einem alltäglichen Begleiter im Berufs- und Privatleben geworden ist. Passend hierzu ermittelte die Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS) erhöhte Prävalenzen überdurchschnittlicher Stressbelastung bei beiden Geschlechtern (13.9% für Frauen und 8.2% für Männer) (2). Der Stressreport Deutschland der Bundesagentur für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin berichtete über eine steigende subjektive Belastung und mengenmäßige Überforderung als Resultat der weiterhin weit verbreiteten hohen Arbeitsintensität (1). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der subjektiven Stressbelastung signifikant mit der Anzahl der krankheitsbedingten Fehltage und mit der Höhe der damit verbundenen Gesundheitskosten für Arbeitnehmer, Arbeitgeber und Gesellschaft korreliert (3). Zusammenfassend hat Stress eine erhebliche gesundheitliche, gesellschaftliche und sozio-ökonomische Relevanz für aktuelle und zukünftige Generationen.

## 2.1.2 Stresstheorien

Es existieren verschiedene Stresstheorien, die den Zusammenhang zwischen Stressoren und Stressreaktion darstellen. Diese werden im Folgenden auszugsweise beschrieben.

### 2.1.2.1 „Fight or flight“-Reaktion nach Walter Cannon

Die Anfänge der biologischen Stressforschung gründeten auf ein Experiment des Physiologen Walter Cannon. Dieser wies eine erhöhte Katecholamin-Konzentration im Blut von Tieren nach, die zuvor einem bedrohlichen Stimulus ausgesetzt worden waren (33). Im Laufe seiner darauffolgenden Forschungsbemühungen erkannte Cannon, dass diese Katecholamin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark prompt durch die Stimulation des sympathischen Nervensystems in Reaktion auf eine Bedrohung (z.B. eine aggressive Auseinandersetzung mit Artgenossen oder eine Begegnung mit einem Raubtier) in Gang gesetzt wird und mit der gesteigerten Durchblutung der Skelettmuskulatur, des Herzens und der Lungen sowie der Freisetzung von Glukose in die Blutbahn einhergeht, während sich die Durchblutung der Haut und der Verdauungsorgane verringert (34). Er schlussfolgerte, dass dieser Prozess dazu dient, das unmittelbare Überleben des Organismus zu sichern und gab ihm den Namen „Fight or flight“-Reaktion (35).

### 2.1.2.2 Generelles Adaptationssyndrom nach Hans Selye

Das Generelle Adaptationssyndrom (GAS) stellt gemäß Hans Selye eine typische Reaktion auf verschiedene schädigende Impulse (z.B. Kälteexposition oder Verletzung) dar. Im zeitlichen Verlauf konkretisierte Selye sein Konzept vom GAS als eine Stressreaktion, die in allen Organismen nach demselben Prinzip und unabhängig von der Art des stressauslösenden Reizes in den folgenden drei Stadien verläuft: Alarmreaktion, Widerstandsstadium und Erschöpfungsstadium (28). Die Alarmreaktion bezieht sich auf die von Cannon definierte „Fight or flight“-Reaktion und geht mit der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) und des sympathischen Nervensystems einher (36). Die Widerstands- und die Adaptationsfähigkeit gegenüber Stress sind laut Selye lebenswichtig, aber auch erschöpflich. Im Widerstandsstadium verschwinden die Symptome der Alarmreaktion, doch bei anhaltender Stressexposition manifestieren sie sich erneut (Erschöpfungsstadium). Geht die Adaptationsfähigkeit des Organismus an seine Grenzen oder das GAS aus dem Gleichgewicht, hat dies Krankheit zur Folge (37). Selye ergänzte sein Modell im Verlauf noch um die Unterscheidung zwischen Eustress und Distress. Der positive und nützliche Eustress ist notwendig, um Herausforderungen zu bewältigen und folglich Wohlbefinden zu erlangen. Dem gegenüber steht der negative Distress durch anhaltende Überforderung der persönlichen Ressourcen, Übermüdung und Versagen (29, 38).

### 2.1.2.3 Transaktionales Stressmodell nach Lazarus

Das transaktionale Stressmodell nach Lazarus und Folkman definiert Stress als ein Ereignis, das die Anpassungsfähigkeit des Individuums fordert oder übersteigt (39). Stress entsteht erst durch die Bewertung des Ereignisses durch das Individuum. Voraussetzung ist der ständige Austausch zwischen Individuum und Umwelt (Transaktion). Die primäre Bewertung bezieht sich auf die Auswirkung des Ereignisses auf das Wohlbefinden des Individuums (positiv, negativ oder irrelevant). Negative Auswirkungen werden in der Folge näher charakterisiert als Bedrohung, Herausforderung oder Schaden bzw. Verlust. Gegenstand der sekundären Bewertung sind innere Entscheidungsprozesse, wie reagiert werden soll und welche Bewältigungsressourcen hierfür verfügbar sind.

Lazarus und Folkman unterschieden zwei Mechanismen zur Bewältigung von Stress (Coping). Die problemorientierte Bewältigung richtet sich auf die direkte Beseitigung oder Minderung des Stressors durch Handlung. Zur emotionsorientierten Bewältigung

reguliert das Individuum seine Gefühle. Die Situation wird in der Folge anders bewertet, aber nicht verändert (39).

#### 2.1.2.4 Modell der Allostase und der allostatichen Last

Der Begriff Allostase wurde erstmals von Sterling und Eyer beschrieben und als „Stabilität durch Veränderung“ definiert (40). Die Allostase stellt einen Reaktionsmechanismus auf akuten Stress dar, welcher der Anpassung des Organismus an veränderte Umweltaforderungen dient. Alle Parameter des inneren Milieus werden gemäß den äußeren Anforderungen variiert, z.B. führt eine wahrgenommene oder tatsächliche Gefahr zu einem Blutdruckanstieg jenseits des physiologischen Sollwerts, um eine Flucht oder Kampfsituation zu ermöglichen (40, 41). Dies steht im Widerspruch zu dem damals allein vorherrschenden Prinzip der Homöostase, welches besagte, dass bei Abweichung vom Sollwert sofort gegenregulatorische Maßnahmen zur Wiederherstellung des Sollwerts unternommen werden (33). Diese strenge Regulation in engen Grenzen ist jedoch nur für bestimmte Parameter (z.B. pH-Wert des Blutes) nötig, während für das Herz-Kreislauf-System, den Stoffwechsel, das Immunsystem und das zentrale Nervensystem das Prinzip der Allostase gilt (32). Solange diese Anpassungsmechanismen reversibel sind und in Reaktion auf akute und kurzfristige vereinzelte Stressoren stattfinden, dienen sie der effektiven Stressbewältigung und können lebenswichtig sein. Auf lange Sicht, bei Überbeanspruchung oder fehlerhafter Regulation können die allostatichen Prozesse dem Organismus allerdings schaden und Krankheiten verursachen (5). McEwen bezeichnete dies als „allostatische Last“ und als „Preis der Adaptation“ und beschrieb die folgenden vier Typen allostaticher Last (6). Der erste Typ ist gekennzeichnet durch die Häufung physiologischer Stressreaktionen, die in geringem zeitlichen Abstand aufeinander folgen (repeated hits). Ursache hierfür ist chronischer Stress, der durch immer wieder neue Stresserlebnisse zur gehäuften Ausschüttung der Stresshormone führt. Die Wirkungen der Stresshormone und deren Zusammenhang mit Krankheit ist in den folgenden Kapiteln näher dargestellt. Die weiteren drei Typen der allostatichen Last nach McEwen stellen Fehlregulationen der hormonellen Stressantwort dar. Der zweite Typ ist durch die fehlende Adaptationsfähigkeit bei wiederholten Stressoren gleicher Art charakterisiert (lack of adaptation). Durch die fehlende Adaptation führen bei den Betroffenen auch bekannte Stressoren des Alltags immer wieder zur Ausschüttung der Stresshormone. Der dritte Typ besteht aus einer verlängerten Dauer der Stressreaktion (prolonged response), da diese nicht effizient

beendet werden kann. Der vierte Typ ist durch eine inadäquate Stressreaktion gekennzeichnet (inadequate response). In der Folge kann es zur kompensatorischen Hyperaktivität anderer Stressmediatoren kommen, z.B. kann eine verminderte Glucocorticoid-Sekretion zu erhöhten Zytokin-Konzentrationen führen (6, 32, 42). Die Regulation der allostatischen Prozesse obliegt dem Gehirn, welches die Umwelтанforderungen interpretiert und über das Ausmaß des Stressempfindens und über die physiologischen und behavioralen Konsequenzen entscheidet (42). Die Interpretation eines Reizes auf seine Bedrohlichkeit ist individuell sehr unterschiedlich und u.a. geprägt von Genetik, Entwicklungsstand und bisherigen Erfahrungen des Individuums. Das durch Stress ausgelöste Verhalten ist ebenfalls mannigfaltig und kann sogar das Ausmaß der allostatischen Last vergrößern, z.B. durch Alkohol- und Zigarettenkonsum (5).

#### 2.1.2.5 Diathese-Stress-Modell

Das Diathese-Stress-Modell besagt, dass die Entstehung von Krankheit durch unspezifische Belastungen, wie z.B. Stress, abhängig ist von der Vulnerabilität, der Resilienz und der Handlungskompetenz (Coping) des Individuums (7). Unter Vulnerabilität versteht man die Anfälligkeit zur Entwicklung psychopathologischer Symptome unter Belastung, was unter anderem durch genetische und lerngeschichtliche Faktoren bedingt wird (43). Im Gegensatz dazu sind Resilienz und Coping Fähigkeiten, die eine gesundheitsfördernde Stressbewältigung ermöglichen. Krankheit entsteht nach dem Diathese-Stress-Modell folglich nur dann, wenn neben der Stressbelastung auch eine erhöhte Vulnerabilität bzw. verringerte Bewältigungsressourcen vorliegen (4, 7).

#### 2.1.3 Stressachsen

Die Stressreaktion wird bei Bedrohung der Homöostase durch einen Stressor ausgelöst und über das zentrale Nervensystem (ZNS) und periphere Organe vermittelt (44). Im Folgenden werden die zwei wesentlichen Stressachsen vorgestellt.

##### 2.1.3.1 Sympathiko-Adrenomedulläre Achse

Die Sympathiko-Adrenomedulläre Achse (SAM-Achse) löst eine schnelle und kurzfristige Stressreaktion aus und wird durch die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin vermittelt (45). In Reaktion auf einen akuten Stressor projizieren Neurone

des Locus coeruleus, des paraventriculären Nukleus (PVN) des Hypothalamus und der rostralen ventrolateralen Medulla zu den präganglionären Neuronen des Sympathikus (46, 47). Der Sympathikus gehört zusammen mit dem Parasympathikus zum peripheren vegetativen Nervensystem. Die präganglionären sympathischen Neurone befinden sich im thorakolumbalen Rückenmark und projizieren zu den paravertebralen Ganglien (Grenzstränge) und den prävertebralen Bauchganglien (47). Die Signalübertragung an den präganglionären Nervenendigungen erfolgt über Acetylcholin. Von dort ziehen die Axone zu den Effektoren des Rumpfes und der Extremitäten (z.B. Blutgefäße und Schweißdrüsen) und zu den Organen im Kopfbereich, Brust-, Bauch- und Beckenraum. Die Signalübertragung an den postganglionären Synapsen erfolgt über Noradrenalin (48). Ein Teil der präganglionären sympathischen Neurone zieht direkt zu den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und verursacht die dortige Synthese und Sekretion eines Gemisches von 80% Adrenalin und 20% Noradrenalin (49). Die im Blut zirkulierenden Katecholamine binden an G-Protein-gekoppelte Adrenorezeptoren, die sich in den Zellmembranen multipler Organe und im ZNS befinden (45, 49). Insgesamt dient die SAM-Achse der schnellen Anpassung des Organismus an Situationen mit erhöhtem Leistungsbedarf. In lebensgefährlichen Notfallsituationen ist eine zehnfache Steigerung der Ruheausschüttung möglich (48).

### 2.1.3.2 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

In Reaktion auf einen Stressor wird im paraventriculären Nukleus (PVN) des Hypothalamus Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) synthetisiert und von dort über hypophyseotrope Neurone zur Eminentia mediana projiziert. Die Eminentia mediana ist die gefäßreiche Übergangszone zwischen Hypothalamus und Hypophyse. CRH wird in das dortige Kapillarnetz ausgeschüttet und gelangt dann über hypophysäre Portalvenen in den Hypophysenvorderlappen (HVL) (50). Das Neuropeptid CRH reguliert die Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus dem HVL in das Gefäßsystem (51, 52). ACTH bindet an Rezeptoren der Nebennierenrinde und induziert dadurch die Sekretion von Glucocorticoiden (im menschlichen Körper v.a. Cortisol) durch die Zona fasciculata (50). Die Hormone der HPA-Achse bewirken eine vergleichsweise langsame und länger anhaltende (chronische) Stressantwort (53). Die Regulation der HPA-Achsen-Aktivität erfolgt über eine endogene zirkadiane Rhythmik, exogene exzitatorische Impulse bei Stress und einen negativen Feedback-Mechanismus bei steigender Cortisol-Konzentration im Blut (54). Gemäß der

pulsatilen zirkadianen Rhythmik erreicht die Cortisol-Konzentration am frühen Morgen kurz vor dem Aufwachen ihr physiologisches Maximum und am Abend bzw. in der frühen Schlafphase ihr physiologisches Minimum (55). Bei chronischem Stress versagt der negative Feedback-Mechanismus und der Cortisol-Spiegel im Blut ist dauerhaft erhöht (53, 56).

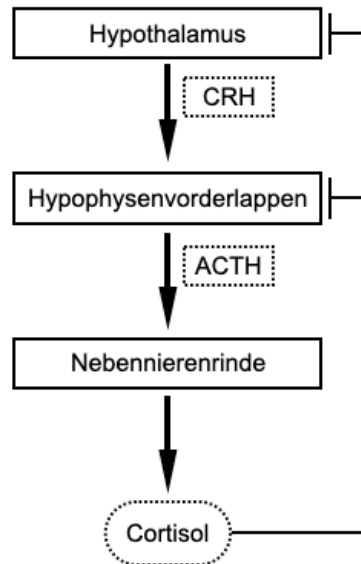


Abbildung 1: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

#### 2.1.4 Stresshormone

Die Aktivierung der Stressreaktion und folgende Ausschüttung der Stresshormone bedingt körperliche und verhaltensbezogene Veränderungen, die dazu dienen sollen, die Überlebenschancen des Individuums in der Stresssituation zu erhöhen (57). Im Folgenden werden die Stresshormone und ihre wesentlichen Wirkungen dargestellt.

##### 2.1.4.1 Katecholamine

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin dienen der kurzfristigen und schnellen Vorbereitung des Körpers auf eine „Fight or flight“-Reaktion, indem sie in Funktionen des Metabolismus und des Herz-Kreislauf-Systems eingreifen und die Aufmerksamkeit erhöhen (4). Die Effekte auf den Metabolismus zielen auf die Bereitstellung von Energie durch Steigerung der Glykogenolyse, Gluconeogenese und Lipolyse ab (58). Die Insulinsekretion wird vermindert, während die Sekretion des katabolen Gegenspielerhormons Glukagon angeregt wird (48, 59). In Bezug auf das Herz-Kreislauf-System bewirken die Katecholamine eine Vasokonstriktion und eine

Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft des Herzmuskels (60, 61). Zusammen mit der Steigerung der Sauerstoffzufuhr durch Erweiterung der Bronchien ermöglicht dies eine bessere Sauerstoffversorgung von Muskeln, Herz und Gehirn (48).

#### 2.1.4.2 Cortisol

Cortisol ist der wichtigste Vertreter der Glucocorticoide im menschlichen Körper und dient der mittel- bis langfristigen Stressbewältigung. Glucocorticoide sind Steroidhormone, deren Struktur und Synthese sich vom lipophilen Cholesterin ableiten (62). Cortisol entfaltet seine verschiedenen Wirkungen hauptsächlich durch Bindung an Glucocorticoid-Rezeptoren und zu einem geringen Anteil an Mineralocorticoid-Rezeptoren (63). Die Hauptaufgabe von Cortisol ist die mittel- bis langfristige Bereitstellung von Energiesubstraten zur Stressbewältigung (41, 64). Cortisol bewirkt einen Anstieg des Blutzuckerspiegels, indem es die intestinale Aufnahme von Glucose beschleunigt, die Gluconeogenese in der Leber steigert, den Glucoseverbrauch in der Peripherie einschränkt und die Glucoseaufnahme in Fettzellen hemmt (64-67). Zusätzlich werden durch Steigerung von Lipolyse und Proteinolyse vermehrt freie Fettsäuren und Aminosäuren bereitgestellt (62, 66). Des Weiteren besitzt Cortisol eine komplexe Wirkung auf das Immunsystem, die sowohl suppressiv als auch aktivierend sein kann (63, 68). Die immunsuppressive Wirkung von Cortisol, die man sich zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen zunutze macht, beruht auf der Synthesehemmung und Wirkungsabschwächung von Immunzellen und Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandine und Zytokine (4, 63, 69). An Herz und Gefäßen wirkt Cortisol sensibilisierend für Katecholamine, wodurch Herzkraft und peripherer Widerstand und folglich der Blutdruck ansteigen (63, 64, 70).

## 2.2 Theoretische Grundlagen von cell-free DNA

### 2.2.1 Definition

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist die Trägerin der genetischen Information und befindet sich bei Eukaryonten intrazellulär im Zellkern. Darüber hinaus sind die Mitochondrien die einzigen Organellen, die ihre eigene DNA (mtDNA) besitzen, deren Aufbau und genetischer Code sich von der nukleären DNA unterscheiden (71).

Der Begriff cfDNA bezeichnet extrazelluläre DNA-Fragmente, deren Vorkommen im menschlichen Blutplasma erstmals von Mandel und Métais beschrieben wurde (72). Abgesehen von menschlichem Blut (72), konnte die cfDNA auch im Tierreich (73) und in pflanzlicher Extrazellulärschubstanz (74) nachgewiesen werden. Im menschlichen Organismus befindet sich die cfDNA neben Blutplasma und -serum auch in vielen weiteren Körperflüssigkeiten, u.a. in Liquor, Lymphflüssigkeit, Aszites, Urin sowie Sputum (75). Die cfDNA liegt im Blut gesunder Individuen in nur sehr geringer Konzentration vor, besitzt eine kurze Halbwertszeit und entstammt hauptsächlich hämatopoetischen Zellen (55% weiße Blutzellen und 30% erythrozytäre Progenitorzellen) (16, 76). Darüber hinaus gehen 10% der cfDNA auf vaskuläre Endothelzellen und 1% auf Hepatozyten zurück (76).

### 2.2.2 Struktur

Die komplexe Struktur und Beschaffenheit der cfDNA ist Gegenstand aktueller Forschung. Es wird ein Zusammenhang zwischen Struktur, Herkunft und Freisetzungsmechanismus der cfDNA angenommen. Im Allgemeinen lässt sich eine große Variabilität in der Struktur feststellen. Es wurde sowohl doppelsträngige (77, 78) als auch einzelsträngige (79) cfDNA nachgewiesen. Das molekulare Gewicht und damit die Länge der einzelnen cfDNA-Fragmente ist ebenfalls variabel und abhängig von ihrer Herkunft (18, 80). Die Sequenzanalyse der cfDNA gesunder Probanden durch Suzuki et al. ergab einen hohen Gehalt an Cytosin am 5'-Ende und Guanin am 3'-Ende der cfDNA-Fragmente (81). Es wurden keine identischen oder überlappenden Sequenzen zwischen den Fragmenten festgestellt. Bei der Untersuchung der chromosomalen Herkunft der cfDNA-Fragmente waren die großen Chromosomen 1 und 2 am stärksten vertreten (81). Im Blut liegt die cfDNA entweder gelöst oder partikelgebunden vor (82). Letzteres beinhaltet die molekulare Komplexbildung mit Proteinen, Histonen, Lipiden und Vesikeln (83, 84).

### 2.2.3 Freisetzungsmechanismen

Die Freisetzungsmechanismen der cfDNA sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. Neben direkten Stimuli existieren komplexe Signalkaskaden, die oftmals nur indirekt zur cfDNA-Freisetzung beitragen. Bisher konnte kein Konsensus bezüglich des Hauptfreisetzungsmechanismus etabliert werden (85). Zudem besteht die Hypothese, dass die Freisetzung mitochondrialer cfDNA (cf-mtDNA) anderen

Mechanismen unterliegt als die Freisetzung nukleärer cfDNA (86). Im Folgenden werden die wesentlichen (möglichen) Freisetzungsmechanismen dargestellt.

### 2.2.3.1 Apoptose

Die Apoptose stellt einen wesentlichen Freisetzungsmechanismus von cfDNA dar (87-89). Der Begriff Apoptose bezeichnet einen programmierten suizidalen Zelltod, der beschädigte und unerwünschte Zellen eliminiert und somit die zelluläre Homöostase gewährleistet (19). Die Apoptose geht typischerweise einher mit Zellschrumpfung, Kondensation und Fragmentation von Nukleus und Chromatin, Abschnürung von Apoptosekörpern und Verlagerung von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche (90). Calciumabhängige Endonukleasen verursachen die internukleosomale DNA-Zerteilung in Fragmente mit einer Länge von circa 180 bis 200 Basen-Paaren (bp) (91, 92). Genauso wie apoptotische DNA ist die cfDNA hochgradig fragmentiert und doppelsträngig und besitzt ein geringes Molekulargewicht bei einer durchschnittlichen Länge von 150 bis 200 bp (19). Dies entspricht der Größe von Nukleosomen und stellt sich im Rahmen der Elektrophorese als für die Apoptose typische „DNA-Leiter“ dar (19, 80, 90, 93-95).

### 2.2.3.2 Nekrose

Ein weiterer cfDNA-Freisetzungsmechanismus ist die Nekrose (89). Der Begriff Nekrose bezeichnet den akzidentellen Zelltod, der in Folge eines schädigenden Einflusses von außen eintritt. Charakteristika der Nekrose sind Zellschwellung und Integritätsverlust der Zellmembran (19). Letzteres bedingt die Freisetzung intrazellulärer Proteine, was eine Entzündungsreaktion zur Folge hat (19, 96). Die DNA wird in einem ungeordneten und zufälligen Prozess durch Desoxyribonukleasen (DNasen) abgebaut, wodurch DNA-Fragmente verschiedener Länge entstehen (97). In Abgrenzung zur Apoptose entstehen infolge der Nekrose deutlich größere cfDNA-Fragmente mit einer Länge von mehr als 10 Kilo-Basenpaaren (87, 97). Zahlreiche Studien beurteilen die erhöhte cfDNA-Konzentration im Blut von Tumorerkrankten als ein Resultat der Nekrose (94, 97-101). Es ist allerdings unklar, ob die Nekrose zur cfDNA-Freisetzung bei Gesunden beiträgt (85).

### 2.2.3.3 Pyroptose

Der Begriff Pyroptose beschreibt den Caspase-1-abhängigen programmierten inflammatorischen Zelltod, der schnell zur Ruptur der Plasmamembran und Freisetzung von proinflammatorischen Zellbestandteilen führt (102, 103). Außerdem verursacht Caspase-1 die Aktivierung und Freisetzung der Zytokine Interleukin(IL)-1 beta und IL-18 (104, 105). Die Caspase-1 aktiviert zwei voneinander unabhängige Signalwege, deren jeweiliger Endpunkt die DNA-Fragmentierung und die Zellyse ist (103). Die Fragmentierung der DNA erfolgt durch eine Caspase-1-abhängige Nuklease und die osmotische Zellyse ist durch Porenbildung in der Zellmembran und anschließende Zellschwellung bedingt (103).

Tan et al. stellten eine signifikante Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von IL-18 als Marker für die Pyroptose und der Plasmakonzentration von cf-mtDNA fest (106). Diese Beobachtung führte zu der Annahme von Pyroptose als cf-mtDNA-Freisetzungsmechanismus (19).

### 2.2.3.4 NETose

Der Begriff NETose beschreibt die Synthese, Freisetzung und Aktivierung von neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs) durch neutrophile Granulozyten im Blut. Die NETs bestehen aus netzartigen Chromatinfilamenten, die von Histonen, Proteasen und granulären und zytosolischen Proteinen ummantelt sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (107, 108). In Abhängigkeit vom auslösenden Stimulus kommt es entweder zu suizidaler NETose als eine Form des Zelltodes neutrophiler Granulozyten oder zu vitaler NETose (109). Die multiplen Signalkaskaden zur Auslösung der NETose sind genauso wie ihr exakter Ablauf Gegenstand aktueller Forschung (108). Die am besten verstandene Signalkaskade wird durch Bereitstellung reaktiver Sauerstoffradikale durch eine NADPH-Oxidase aktiviert (108, 110, 111). Im Verlauf kommt es zur Freisetzung von neutrophiler Elastase aus Vesikeln in das Zytoplasma und anschließend zur Wanderung in den Nukleus (112). Neben Formverlust und Schwellung des Nukleus bewirkt die neutrophile Elastase die Dekondensation des Chromatins und letztlich die Freisetzung der NETs durch Ruptur der Zellmembran (110, 113). Bei multiplen Erkrankungen wurde zusätzlich zu NETs eine hohe cfDNA-Konzentration nachgewiesen (16, 114-116). Bei den erhöhten cfDNA-Konzentrationen kann es sich um Überreste der NETs handeln, die bei verstärkter NETose (114) oder vermindertem Abbau (117, 118) akkumulieren (19).

### 2.2.3.5 aktive Sekretion

Gahan und Stroun beschrieben im Jahr 2010 die aktive Sekretion von cfDNA in Form eines Komplexes mit Glykolipoproteinen und RNA und bezeichneten diesen spezifischen Komplex fortan als „Virtosom“ (119). Nach ihrer Synthese im Nukleus gelangen DNA, Proteine und Lipide in das Zytoplasma und liegen dort als Komplex vor (120). Es folgen die Transkription und Integration von RNA in den bestehenden DNA-Lipoprotein-Komplex (119, 121, 122). Die anschließende aktive Sekretion der Virtosomen erfolgt konzentrationsabhängig und unter Energieverbrauch durch sich teilende oder bereits ausdifferenzierte vitale Zellen (85, 119, 123). Als interzelluläre Messenger können Virtosomen in andere Zellen und Zelltypen aufgenommen werden und diese modifizieren (119, 124).

Eine weitere Form der aktiven Sekretion von cfDNA erfolgt über deren Integration in extrazelluläre Vesikel (EV) (85). Letztere werden anhand ihrer Größe in Exosomen und Mikropartikel eingeteilt und dienen vor allem der interzellulären Kommunikation (125). Exosomen sind extrazelluläre Vesikel endosomalen Ursprungs mit einer Größe von 30-100 nm (126). Sie enthalten unter anderem DNA, RNA, Proteine und Fette (127-129). Die Freisetzung von Exosomen ist ein Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress, den geschädigte oder alternde Zellen zur Ausschleusung akkumulierter DNA-Fragmente nutzen (130, 131). Die DNA-Fragmente sind variabel in Länge und Sequenzabfolge und repräsentieren das gesamte Genom (132, 133). Der genaue Freisetzungsmechanismus ist noch nicht bekannt (128). Mikropartikel sind extrazelluläre Vesikel mit einer Größe von 0,1-1,0 µm, die mittels Blasenbildung der Plasmamembran freigesetzt werden (134). Ihre Freisetzung wird unter anderem von proinflammatorischen Zytokinen, Stressfaktoren und Wachstumsfaktoren induziert (125).

### 2.2.4 Elimination

Die cfDNA wird unter physiologischen Bedingungen sehr schnell über die Milz, Leber und Nieren aus dem Blutstrom eliminiert (18, 135, 136). Der Abbau der cfDNA wird durch Endonukleasen bewerkstelligt (137). Genauer handelt es sich dabei um DNase 1 und DNase 1-like 3, die trotz Zugehörigkeit zu derselben Proteinfamilie einige funktionelle Unterschiede aufweisen (138, 139). Die Komplexbildung der cfDNA und ihre Internalisierung in Vesikel erschweren den Abbau durch die DNasen (128, 132). Durch eine verminderte Aktivität (140-142) oder Mutation (143, 144) der DNase 1 kann es zu verminderter Elimination und folglich zum Konzentrationsanstieg von cfDNA im

Blut kommen. Erhöhte Spiegel von G-Aktin oder anderen Inhibitoren der DNase 1 (145, 146) sowie Defekte ihrer Kofaktoren (138, 147, 148) können ebenfalls ursächlich sein. Der schnelle Abbau der cfDNA ist neben der Entzündungseindämmung vor allem auch zur Verhinderung einer Autoimmunitätsentwicklung gegen DNA essentiell (19, 149).

## 2.3 Stress und cfDNA-Freisetzung

Die cfDNA-Konzentration im Blut gesunder Individuen ist sehr gering und rangiert von kaum detektierbar bis in den Bereich von  $\mu\text{g/ml}$  (79, 81, 87, 150). Im Gegensatz dazu stießen Tan et al. im Rahmen ihrer Forschung zu systemischem Lupus erythematodes im Jahre 1966 erstmals auf deutlich erhöhte cfDNA-Konzentrationen (77). In den folgenden Jahren konnten zudem verschiedenste physische und psychische Stressoren mit erhöhten cfDNA-Spiegeln bei Gesunden in Zusammenhang gebracht werden, die im Folgenden auszugsweise vorgestellt werden.

### 2.3.1 cfDNA-Freisetzung durch physischen Stress

Physischer Stress wird unter anderem durch sportliche Aktivität ausgelöst. Intensive sportliche Aktivität ist mit einer inflammatorischen Leukozytose sowie mit mechanisch und metabolisch bedingten Muskelschäden assoziiert (151, 152). Durch Gewebshypoxie und Bildung von Sauerstoffradikalen entstehen Zellschäden und DNA-Strangbrüche und somit werden apoptotische Prozesse eingeleitet (153-155). Es existieren multiple Studien, die die Konzentrationen von cfDNA und cf-mtDNA in Reaktion auf sportliche Aktivität behandeln.

In Bezug auf die cfDNA-Konzentration wurde bereits mehrfach ein signifikanter Konzentrationsanstieg durch sportliche Aktivität verschiedener Modalitäten (z.B. Ausdauersport und Krafttraining) und Intensitäten nachgewiesen (86, 156-159). Direkt nach Ende der sportlichen Aktivität erreichte die cfDNA-Konzentration ihr Maximum und fiel danach rapide auf ihr Ausgangsniveau zurück (153, 154, 157, 160, 161). In Bezug auf die initiale Freisetzungsphase der cfDNA in Reaktion auf sportliche Aktivität wiesen Beiter et al. durch serielle Blutentnahmen im Rahmen eines anstrengenden Laufbandtrainings einen deutlichen cfDNA-Konzentrationsanstieg innerhalb von 10 Minuten nach Trainingsbeginn mit Erreichen des Maximums nach weiteren 20 Minuten nach (157). Eine von den oben genannten Beobachtungen abweichende cfDNA-Kinetik mit persistierend erhöhten cfDNA-Konzentrationen, jedoch ohne begleitend

höhere cfDNA-Maxima, wurde im Anschluss an extrem langandauerndes Ausdauertraining über mehrere Stunden beobachtet. Konkret wurde die cfDNA-Ausgangskonzentration im Anschluss an einen sechsstündigen Ultramarathon erst nach einer Regenerationsperiode von 24 Stunden wieder erreicht und bei Teilnehmern des sogenannten „Spartathlons“, einem Ultramarathon mit einer Distanz von 246 km und mit einer mittleren Laufdauer von 32 Stunden und 8 Minuten, zeigten sich auch nach 48 Stunden Regenerationszeit noch signifikant erhöhte cfDNA-Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert (154, 162). Atamaniuk et al. erklärten dieses Ergebnis durch das höhere Ausmaß von physischem Stress auf den Organismus (154). Bislang konnte allerdings keine eindeutige Beziehung zwischen der Höhe der cfDNA-Konzentration und Intensität, Dauer und durchschnittlichem Energieverbrauch eines Trainings festgestellt werden. Dasselbe gilt für die Konzentration von Laktat als Marker für oxidativen Stress und von Harnsäure sowie Kreatinkinase als Marker für entzündliche Aktivität (156). Ebenso konnte keinerlei Toleranzentwicklung im Sinne einer abnehmenden cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf repetitive sportliche Aktivität beobachtet werden (159).

In Bezug auf die cf-mtDNA-Konzentration sind die Ergebnisse der bisherigen Forschungsarbeiten uneinheitlich und teils widersprüchlich. In den Studien von Beiter et al. und Helmig et al. wurde unmittelbar nach einem Laufbandtraining kein signifikanter Anstieg der cf-mtDNA-Konzentration festgestellt (157, 158). Andere Forschungsgruppen berichteten hingegen von einem Konzentrationsanstieg von sowohl cfDNA als auch cf-mtDNA in Reaktion auf sportliche Aktivität (25, 159). Hierbei war der Anstieg der cfDNA-Konzentration allerdings um ein Vielfaches höher als der Anstieg der cf-mtDNA-Konzentration (25). Konträr hierzu wurde im Rahmen einer 90minütigen Aktivität auf dem Laufband eine Abnahme der cf-mtDNA-Konzentration registriert (163). Im Verlauf mehrerer Zyklen erschöpfender sportlicher Aktivität mit jeweils dreitägiger Regenerationsperiode wurden sinkende cf-mtDNA-Basiskonzentrationen im Sinne einer Toleranzentwicklung beobachtet (159). Passend hierzu berichteten Nasi et al. von niedrigeren cf-mtDNA-Spiegeln bei professionellen Volleyballspielern im Vergleich zu einer nicht-athletischen Kontrollgruppe (164).

Bei der Interpretation dieser teils stark voneinander abweichenden Studienergebnisse sind die geringen Fallzahlen und die methodischen Unterschiede in der Blutprobenanalytik zu berücksichtigen. Insgesamt weisen die divergierenden Resultate bezüglich Ausmaß und zeitlicher Kinetik der cfDNA- und cf-mtDNA-Konzentrationen in Reaktion auf physischen Stress in Form von sportlicher Aktivität

jedoch auf unterschiedliche Freisetzungs- und Eliminationsmechanismen von cfDNA und cf-mtDNA hin (86).

### 2.3.2 cfDNA-Freisetzung durch psychischen Stress

Der direkte Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration im Blut und psychischem Stress wurde erstmals von Czamanski-Cohen et al. beschrieben. Die Forschungsgruppe stellte fest, dass Maßnahmen zur Stressreduktion bei unter subjektiv starker psychischer Stressbelastung stehenden Frauen einen Abfall der cfDNA-Konzentration auf ein nicht pathologisches Level bewirkten (165, 166). Ausgehend von diesem Ergebnis in Bezug auf andauernden oder chronischen Stress, wurde der direkte Zusammenhang zwischen akutem psychosozialen Stress und der cfDNA-Konzentration im Blut gesunder Probanden in bisher zwei weiteren Studien untersucht, die nachfolgend im Detail vorgestellt werden.

Hummel et al. untersuchten die Konzentrationen von cfDNA und cf-mtDNA im Blut gesunder männlicher Probanden im Alter von 18 bis 36 Jahre in Reaktion auf eine psychosoziale und eine physische Stressbedingung. Zur Induktion von psychosozialen Stress wurde der Trierer Sozial Stress-Test (TSST) angewandt. Innerhalb von zwei Minuten nach Ende des TSST wurde ein 1.8-facher Anstieg der cfDNA-Konzentration und ein 1.7-facher Anstieg der cf-mtDNA-Konzentration festgestellt. Nach Erreichen des Maximums kam es zu einem rasanten Abfall der cfDNA- und cf-mtDNA-Konzentrationen auf das Ursprungslevel innerhalb von 30 Minuten. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der Konzentration der Stresshormone Cortisol, Noradrenalin und Adrenalin im Rahmen der psychosozialen Stressbedingung. Im Vergleich zur physischen Stressbedingung wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf die zeitliche Dynamik und das Ausmaß der cfDNA-Freisetzung festgestellt (25).

Trumpff et al. untersuchten die Konzentrationen von cfDNA und cf-mtDNA im Blut gesunder Männer und Frauen im Alter von 41 bis 58 Jahre an zwei Testungstagen im Abstand von einem Monat. Zur Induktion von psychosozialen Stress diente ein fünfminütiger aus einer freien Rede mit Videoaufzeichnung bestehender Stresstest. Gegensätzlich zu den Ergebnissen von Hummel et al. wurde im unmittelbaren Anschluss an den Stresstest kein signifikanter Konzentrationsanstieg der cfDNA und cf-mtDNA beobachtet. Jedoch kam es innerhalb von 30 Minuten nach Ende des

Stresstests zu einem selektiven signifikanten Anstieg der cf-mtDNA mit hoher Effektstärke ohne begleitenden Anstieg der cfDNA-Konzentration. Genauer wurde zu diesem Zeitpunkt sogar eine geringere cfDNA-Konzentration als vor dem Stresstest gemessen. Diese Ergebnisse weisen gemäß Trumpff et al. auf einen selektiven, möglicherweise regulierten Prozess mit Mitochondrien und cf-mtDNA als Hauptakteuren hin. Weiterhin sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Freisetzung, Dynamik und Regulation von cfDNA und cf-mtDNA unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen (26). Darüber hinaus stellte die Forschungsgruppe fest, dass es nach Applikation des künstlichen Glucocorticoids Dexamethason zu einer Verlagerung von mtDNA in das Zytosol kam. Dies spricht für eine Beteiligung von Glucocorticoiden (und gegebenenfalls weiterer neuroendokriner Stressmediatoren) an der beobachteten Verbindung zwischen akutem psychosozialen Stress und Freisetzung von cf-mtDNA (26).

Die oben genannten Studien weisen verschiedene Limitationen sowie Diskrepanzen bezüglich ihrer Ergebnisse auf.

Während beide Studien einen signifikanten Anstieg der cf-mtDNA in Reaktion auf psychosozialen Stress beobachteten, kamen sie zu divergierenden Ergebnissen in Bezug auf die cfDNA-Konzentration. Hummel et al. verzeichneten einen 1.8-fachen Anstieg der cfDNA-Konzentration, während Trumpff et al. keine signifikante Änderung der cfDNA-Konzentration feststellten.

Zudem berichteten Hummel et al. von einem unmittelbaren und kurzzeitigen Anstieg der cfDNA- und cf-mtDNA-Konzentrationen, wohingegen Trumpff et al. einen verzögerten Anstieg der cf-mtDNA-Konzentration nach 30 Minuten beschrieben.

Während Trumpff et al. eine Verlagerung von mtDNA in das Zytosol nach Applikation von Glucocorticoiden feststellten und dies im Sinne einer Beteiligung von Glucocorticoiden an der Freisetzung von cf-mtDNA in Reaktion auf psychosozialen Stress werteten, verzeichneten Hummel et al. keine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von cfDNA sowie cf-mtDNA und Cortisol, Noradrenalin und Adrenalin.

Angesichts dieser Diskrepanzen sind weitere Studien nötig, um die Transformationsprozesse von akutem psychosozialen Stress in eine biologische Stressreaktion und insbesondere die Rolle der cfDNA und cf-mtDNA sowie deren Kinetik, Freisetzungs- und Eliminationsmechanismen besser zu verstehen. Hierzu bedarf es eines verbesserten Versuchsaufbaus mit häufigeren Blutentnahmen in fest

definierten zeitlichen Abständen. Weiterhin ist die Anwendung evaluierter und standardisierter Verfahren zur cfDNA-Analytik zur besseren Vergleichbarkeit unbedingt erforderlich. Eine zusätzliche gemeinsame Limitation beider Studien ist das Fehlen einer ruhenden Kontrollgruppe, die keinen Stressoren ausgesetzt ist. Insgesamt sind auch aufgrund der geringen Fallzahl weitere Studien nötig, um beurteilen zu können, ob sich die Konzentration von cfDNA oder cf-mtDNA als Biomarker für psychosozialen Stress eignet.

## 2.4 Ableitung der Forschungsfrage

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zunächst mit der Fragestellung, ob sich das subjektive Stressempfinden der Probanden am Tag der Stresstestung vom Tag der Ruhetestung unterscheidet. Der angewandte Stresstest (s. Kapitel 3.3.3) stellt ein bewährtes Instrument zur experimentellen Auslösung einer psychosozialen Stressreaktion dar (167-169). Hieraus leitet sich die erste Unterschiedshypothese ab: Das subjektive Stressempfinden gesunder Probanden unterscheidet sich am Tag der Stresstestung vom Tag der Ruhetestung.

Weiterhin untersucht die vorliegende Arbeit die Frage, ob sich der Verlauf der Herzfrequenz der Probanden am Tag der Stresstestung vom Tag der Ruhetestung unterscheidet. Die im Rahmen der physiologischen Stressreaktion ausgeschütteten Katecholamine bewirken eine Vasokonstriktion und eine Zunahme der Herzfrequenz (60, 61). Hieraus ergibt sich die zweite Unterschiedshypothese: Der Verlauf der Herzfrequenz gesunder Probanden unterscheidet sich am Tag der Stresstestung vom Tag der Ruhetestung.

Darüber hinaus behandelt die vorliegende Arbeit die Fragestellung, ob sich der Verlauf der cfDNA-Konzentration am Tag der Stresstestung vom Tag der Ruhetestung unterscheidet. Der Zusammenhang zwischen cfDNA und akutem psychosozialen Stress bei Gesunden wurde bisher in zwei Studien untersucht. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 im Detail dargelegt, kamen die genannten Studien zu divergierenden Ergebnissen bezüglich der cfDNA-Konzentration in Reaktion auf psychosozialen Stress. Hummel et al. verzeichneten einen 1.8-fachen Anstieg der cfDNA-Konzentration, während Trumpff et al. keine signifikante Änderung der cfDNA-Konzentration feststellten (25, 26). Insgesamt sind die Studien durch das Fehlen einer

ruhenden Kontrollgruppe, die keinerlei Stressoren ausgesetzt ist, limitiert und lassen sich aufgrund unterschiedlicher Messzeitpunkte und -intervalle nur bedingt vergleichen. Bei gesunden Individuen, die keinem psychosozialen Stress ausgesetzt waren, wurden bisher niedrige bis nicht messbare cfDNA-Konzentrationen detektiert (79, 81, 86, 87, 150). Allerdings bestanden insgesamt individuelle Schwankungen der cfDNA-Konzentration (25). Bei subjektiv stark gestressten Individuen konnte unter Maßnahmen zur Stressreduktion ein Absinken der cfDNA-Konzentration beobachtet werden (165).

Hieraus ergab sich für die vorliegende Arbeit die dritte Unterschiedshypothese: Der Verlauf der cfDNA-Konzentration im Blut gesunder Probanden unterscheidet sich am Tag der Stresstestung im Vergleich zum Tag der Ruhetestung. Bis dato existiert keine Studie, die den direkten Vergleich der cfDNA-Konzentration bei Gesunden zwischen einer Stress- und einer Ruhebedingung vornimmt. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, diese Forschungslücke zu schließen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Stichprobenbeschreibung

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien (s. Kapitel 3.2) konnten insgesamt  $N = 28$  gesunde männliche Probanden im Alter von *Range* = 19-34 Jahren für die Studie rekrutiert werden. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug  $M = 24.61$  Jahre ( $SD = 4.06$ ).

In Bezug auf ihre Familien- und Partnersituation gaben 50% der Probanden eine unverheiratete feste Partnerschaft an. Es waren alle Probanden der Stichprobe ledig. Die Probanden hatten überwiegend Fachabitur oder Abitur (96.4%) und befanden sich zum Zeitpunkt der Testung noch in der beruflichen Ausbildung (39.3%). Keinen Berufsabschluss hatten 17.9% der Studienteilnehmer. Die Stichprobe beinhaltet keine Nacht- und Schichtarbeiter.

Weiterhin wurde eine Gesundheitsanamnese aller Probanden erhoben. Alle Studienteilnehmer waren körperlich und psychisch gesund und nahmen keinerlei Medikamente ein. Es wurde außerdem das Rauchverhalten ermittelt. Hierbei gaben 78.6% der Stichprobe an, Nicht-Raucher zu sein. Die Raucher unter den Studienteilnehmern konsumierten durchschnittlich  $M = 2.8$  Zigaretten täglich ( $SD = 1.47$ ). Ein Rauchverhalten von 10 oder mehr Zigaretten pro Tag war ein

Ausschlusskriterium für die Studienteilnahme. Das durchschnittliche Gewicht bezogen auf die Körperoberfläche lag bei einem Body-Mass-Index (BMI) von  $M = 22.55$  ( $SD = 1.60$ ). Es wurde außerdem das Sportverhalten der Stichprobe ermittelt, wobei 71.4% der Stichprobe eine regelmäßige sportliche Aktivität angaben. Die drei häufigsten genannten Sportarten waren Fitnessstudio/Krafttraining (32.14%), Joggen (28.57%) und Ballsportarten (17.86%).

Außerdem lässt sich die Stichprobe anhand verschiedener Fragebögen zur Selbstbeurteilung psychometrisch beschreiben (s. Tabelle 1). Der Global Severity Index (GSI) der SCL-90 bemisst die durchschnittliche psychische Belastung der Stichprobe zum Zeitpunkt der Testung mit  $M = 0.34$  Punkten ( $SD = 0.29$ ). In Bezug auf die Stresswahrnehmung der Stichprobe ergab die PSS ein moderates allgemeines subjektives Stressempfinden ( $M = 21.82$  Punkte,  $SD = 6.93$ ) und die 12-Item-Screening-Skala des TICS bezifferte die chronische Stressbelastung der Stichprobe mit  $M = 11.29$  Punkten ( $SD = 6.08$ ). Gemäß BDI bestand durchschnittlich keine Depressivität innerhalb der Stichprobe ( $M = 5.36$  Punkte,  $SD = 4.95$ ). In Bezug auf die Angstsensitivität ergab der ASI einen durchschnittlichen Wert von  $M = 15.82$  ( $SD = 7.25$ ).

Tabelle 1: Stichprobenbeschreibung der 28 männlichen Probanden

Merkmal	<i>M</i>	<i>SD</i>	Minimum	Maximum
Alter in Jahren	24.61	4.06	19.00	34.00
BMI in kg/m <sup>2</sup>	22.55	1.47	19.90	26.30
Anzahl Zigaretten/Tag	0.61	1.34	0.00	5.00
Basisaktivität in h/Woche	13.90	9.53	0.10	38.50
Freizeitaktivität in h/Woche	4.77	6.68	0.00	32.00
Sportaktivität in h/Woche	5.50	7.78	0.00	11.00
BDI-Score	5.36	4.95	0.00	15.00
PSS-Score	21.82	6.93	7.00	36.00
ASI-Score	15.82	7.25	2.00	33.00
SCL-90 GSI	0.34	0.29	0.01	1.17
TICS SSCS	11.29	6.08	3.00	28.00

### 3.2 Rekrutierung und Auswahl der Studienteilnehmer

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte hauptsächlich über Aushänge an schwarzen Brettern sowie über das Verteilen und Auslegen von Flyern auf dem Universitätscampus und dem Universitätsklinikgelände, in den Studentenwohnheimen, Bibliotheken und in Cafés. Darüber hinaus fand die Rekrutierung auch digital durch Aufrufe in den sozialen Netzwerken statt. Die Interessenten wurden hierbei aufgefordert, sich unter Angabe ihrer Kontaktdaten per E-Mail zur Teilnahme an der Studie anzumelden. Mit den potenziellen Studienteilnehmern wurden im Anschluss Telefonscreenings durchgeführt. Deren Ziel war es, die Eignung der Interessenten durch Abfrage der Einschluss- und Ausschlusskriterien festzustellen. Zu den Einschlusskriterien zählten männliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 35 Jahren und das Verständnis und flüssige Sprechen der deutschen Sprache. Weiterhin musste bei allen Probanden Einwilligungsfähigkeit bestehen. Die Ausschlusskriterien beinhalteten akute bzw. chronische somatische und psychische Erkrankungen, aktuelle außergewöhnliche psychische Belastungen (z.B. Tod eines nahen Angehörigen) und die Einnahme von Psychopharmaka. Weitere Ausschlusskriterien waren ein BMI über 25 kg/m<sup>2</sup>, Drogenabusus, Nikotinabusus von 10 oder mehr Zigaretten pro Tag sowie Impfungen innerhalb der letzten zwei Wochen. Innerhalb von 24 Stunden vor der Testung durfte keine intensive körperliche Aktivität ausgeübt worden sein und es durften keine Kenntnisse über Ablauf und Funktion des TSST bestehen.

Bei Eignung des Probanden wurden im Anschluss an das Telefonscreening zwei Termine für Ruhe- und Stresstestung vereinbart.

### 3.3 Studiendesign

Bei einer Gesamtstichprobe von  $N = 28$  gesunden, männlichen Probanden wurde ein Cross-over-Studiendesign angewandt. Genauer handelte es sich um jeweils eine Ruhetestung und eine Stresstestung pro Proband, die an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Die beiden Testungstage fanden zeitlich maximal eine Woche entfernt voneinander statt. Die eine Hälfte der Probanden startete mit der Ruhetestung, während die andere Hälfte zuerst die Stresstestung absolvierte. Die Zuordnung zur jeweiligen Startbedingung erfolgte per Randomisierung. Zu Beginn der Testung erhielten die Probanden ein Informationsblatt zur Studie und wurden umfassend aufgeklärt. Anschließend wurde die schriftliche Einwilligung der Probanden zur

Studienteilnahme eingeholt. Daraufhin wurde ein peripherer intravenöser Zugang (iv-Zugang) appliziert, worüber im Verlauf des Testungstages insgesamt elf Blutentnahmen (BE) in fest definierten zeitlichen Abständen durchgeführt wurden. Die ersten beiden BE erfolgten vor der jeweiligen Testbedingung (15 min und 1 min davor). Die restlichen BE fanden im Anschluss an die Testbedingung statt (nach 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 105 min). Außerdem wurde die Herzfrequenz permanent mit einer Sport-Pulsuhr Polar V800 aufgezeichnet. Die Probanden erhielten im Laufe beider Testungstage mehrere Selbstbeurteilungs-Fragebögen, die im folgenden Kapitel noch detaillierter beschrieben werden. Die Probanden wurden instruiert, während der Testdauer nur auf Aufforderung aufzustehen und keine digitalen Bildschirme, wie zum Beispiel Smartphones, zu benutzen. Die Gesamtdauer betrug für beide Termine jeweils drei Stunden. Der detaillierte zeitliche Ablauf der beiden Testungstage wird in Abbildung 2 dargestellt. Zur Minimierung der tageszeitlichen Schwankungen der Cortisol-Synthese wurden die Testungen ausschließlich nachmittags durchgeführt. Die Testungen fanden im Labor des Instituts für Medizinische Psychologie und Medizinische Soziologie statt. Bei erfolgreicher Teilnahme erhielten die Probanden eine Aufwandsentschädigung von 50 Euro. Der Ethikantrag wurde von der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz am 14.05.2019 bewilligt (Antragsnummer: 2019-14188).

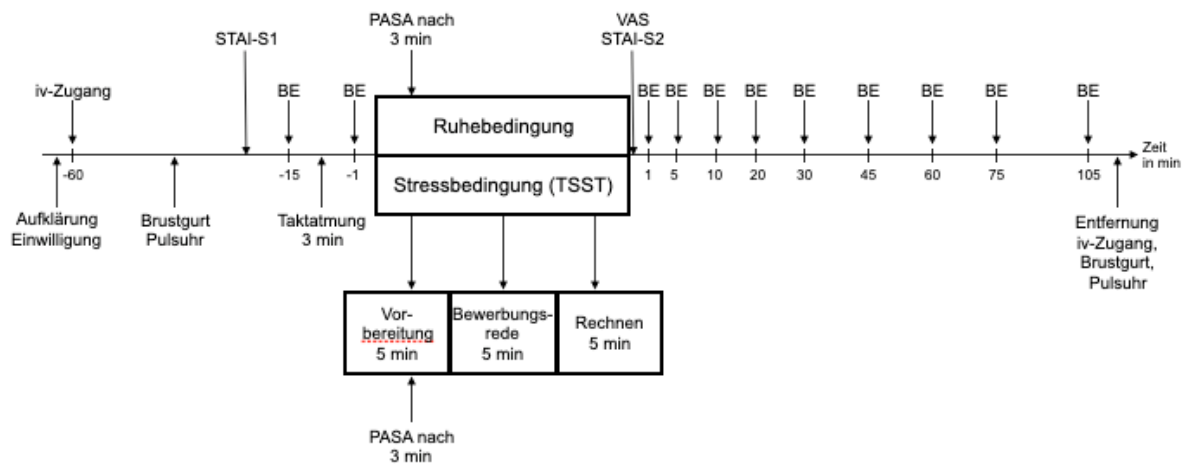


Abbildung 2: Studiendesign und zeitlicher Ablauf der Ruhe- und Stresstestung

### 3.3.1 Ablauf der Ruhetestung

Der genaue Ablauf der Ruhetestung wird in Abbildung 2 dargestellt. Im Verlauf der Ruhetestung erhielten die Probanden neben dem Stait-Trait-Angstinventar (STAI)

(170, 171), dem Primary-Appraisal-Secondary-Appraisal-Fragebogen (PASA) (172) und der Visuellen Analogskala (VAS) ein Fragenbogenpaket zum Ausfüllen. Darin enthalten waren die folgenden Fragebögen: Gesundheitsanamnese, Symptomcheckliste-90 (SCL-90) (173, 174), Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität (FFKA) (175), Beck-Depressions-Inventar (BDI) (176), Perceived-Stress-Scale (PSS) (177), Trierer Inventar zum chronischen Stress (TICS) (178), Angstsensitivitätsindex (ASI) (179) und Brief-Resilience-Scale (BRS) (180).

Kurz vor Beginn der Ruhebedingung wurde ein Intervall der Taktatmung durchgeführt, das beinhaltete, dass die Probanden über einen Zeitraum von drei Minuten jeweils im Fünf-Sekunden-Takt ein- und ausatmeten. Während der 15minütigen Ruhebedingung nahm der Proband eine entspannt sitzende Haltung ein. Nach drei Minuten wurde der Proband gebeten, den PASA-Fragebogen auszufüllen. Es wurden die Uhrzeit und die Stoppuhrzeit auf der Pulsuhr zu Beginn, nach fünf Minuten und zum Ende der Ruhebedingung protokolliert.

### 3.3.2 Ablauf der Stresstestung

Der genaue Ablauf der Stresstestung wird in Abbildung 2 dargestellt. Die 15minütige Stressbedingung bestand aus einer mentalen Belastungssituation, die den Probanden nicht bekannt war und auf die sie sich folglich nicht vorbereiten konnten. Es handelte sich um den Trierer Sozial Stress Test (TSST), dessen genauer Ablauf in Kapitel 3.3.3 beschrieben wird. Die Probanden wurden hierfür vom Versuchsleiter in einen separaten Raum begleitet und dort über ihre Aufgabe instruiert. Zu Beginn der Vorbereitungszeit, vor Beginn der Bewerbungsrede (nach 5 min) und zum Ende der Stressbedingung (nach 15 min) wurden die Uhrzeit und die Stoppuhrzeit auf der Pulsuhr protokolliert. Die Probanden wurden nach Entnahme der letzten Blutprobe über die Funktion des TSST aufgeklärt und unterschrieben diesbezüglich eine Schweigevereinbarung.

### 3.3.3 Trierer Sozial Stress Test

Der Trierer Sozial Stress Test (TSST) wurde von Kirschbaum, Pirke und Hellhammer entwickelt und ist mittlerweile ein bewährtes Instrument zur experimentellen Auslösung einer psychosozialen Stressreaktion (167-169).

Der TSST besteht aus einer fünfminütigen freien Bewerbungsrede im Rahmen eines simulierten Job-Interviews (hierfür erhält der Proband eine dreiminütige Vorbereitungszeit) und einer anschließenden fünfminütigen Rechenaufgabe unter

Beobachtung durch ein sogenanntes Auswahlgremium. Dieses sitzt dem Probanden in neutraler, emotionsloser Haltung gegenüber und gibt ihm keinerlei verbales oder nonverbales Feedback. Dem Probanden wird suggeriert, dass das Gremium in nonverbaler Kommunikation besonders geschult sei und seine Performance diesbezüglich analysiert werde. Hierzu wird außerdem eine Video- und Tonbandaufzeichnung simuliert und der Proband wird nochmals explizit dazu aufgefordert, auf Gestik und Mimik zu achten. Falls der Proband vor Ablauf der dafür vorgesehenen Zeit mit seiner Bewerbungsrede stoppt, wird er nach 20 Sekunden Schweigen in standardisierter Form zum Fortführen der Rede aufgefordert. Falls er sich bei der Rechenaufgabe verrechnet, wird er vom Gremium unterbrochen und muss wieder von vorne beginnen.

Zusammenfassend stellt der TSST eines der wenigen Instrumente zur Stresstestung dar, welches die beiden Elemente der Unkontrollierbarkeit und der Angst vor negativer sozialer Bewertung beinhaltet. Dies macht den TSST zu einem besonders wirksamen Stresstest, durch dessen Anwendung sich eine robuste und zuverlässige Stressinduktion mit signifikantem Anstieg der Cortisol-Spiegel erreichen lässt (31, 169).

### 3.4 Psychometrische Erhebungen

#### 3.4.1 State-Trait Anxiety Inventory

Das State-Trait Anxiety Inventory (STAI) ist ein von Spielberger et al. entwickelter Selbstbeurteilungsfragebogen zum Thema Angst, der aus einer State-Anxiety Skala (STAI-S) und einer Trait-Anxiety Skala (STAI-T) besteht (170, 171). Die State-Anxiety Skala behandelt die situationsbezogene Angst, die der Proband im Moment des Ausfüllens fühlt, während die Trait-Anxiety Skala die generelle und individuelle Neigung zum Angstempfinden misst. Insgesamt besteht das STAI aus 40 Items mit vierfach gestufter Antwortmöglichkeit. Das STAI weist eine hohe Reliabilität bzw. interne Konsistenz auf (Cronbachs  $\alpha = 0.90$  für beide Skalen). Die kriteriumsbezogene Validität wurde durch Korrelation mit anderen Testskalen ermittelt. Es besteht eine hohe konvergente Validität der Trait-Anxiety Skala mit der Skala zur Messung Manifesten Angst von Lück und Timaeus (170).

### 3.4.2 Primary Appraisal Secondary Appraisal

Der Primary Appraisal Secondary Appraisal (PASA) ist ein von Gaab et al. entwickelter standardisierter Fragebogen zur Selbstbeurteilung (172). Der PASA besteht aus 16 situationsbezogenen Items mit je sechsfach gestufter Antwortmöglichkeit von „ganz falsch“ bis „ganz richtig“. Die Grundlage des PASA bildet die transaktionale Stresstheorie von Lazarus und Folkmann und die darin definierten Prozesse der primären und sekundären Bewertung (primary appraisal, secondary appraisal) (39). Der PASA ermöglicht es, das Ausmaß der subjektiv empfundenen Belastung in Bezug auf eine konkrete Situation differenziert zu beurteilen. Zur Auswertung werden vier Primärskalen (Bedrohung, Herausforderung, Selbstkonzept eigener Fähigkeiten, Kontrollüberzeugung) und zwei Sekundärskalen (Erstbewertung, Zweitbewertung) berechnet. Der PASA-Gesamtwert oder Stressindex entspricht der Differenz der Sekundärskalen. Insgesamt weist der PASA eine hohe Reliabilität bzw. interne Konsistenz auf mit einem Cronbachs  $\alpha$  von  $\alpha = 0.61-0.81$  für die Primärskalen und  $\alpha = 0.74-0.80$  für die Sekundärskalen. Mittels Faktorenanalyse wurde die Validität des PASA bestätigt (172).

### 3.4.3 Visuelle Analogskala

Die Visuelle Analogskala (VAS) besteht aus acht Aussagen, die sich unter Berücksichtigung der Kriterien von Mason (181) auf die kürzlich vorangegangene Ruhe- bzw. Stressphase beziehen. Unter den Aussagen befindet sich jeweils eine Skala von 0 (überhaupt nicht zutreffend) bis 100 (volle Zustimmung). Der Proband soll auf dieser Skalenlinie den Bereich ankreuzen, der seiner persönlichen Einschätzung der vorangegangenen Situation am meisten entspricht. Bewertet werden sollen die Neuartigkeit, Schwierigkeit, Stresshaftigkeit, Kontrollierbarkeit und Unvorhersehbarkeit der Situation sowie das Ausmaß der persönlichen Mitwirkung und Herausforderung. Zur Auswertung der acht Skalen wird ein Gesamtwert gebildet.

### 3.4.4 Gesundheitsanamnese

Die Gesundheitsanamnese ist ein Fragebogen zum Gesundheitszustand und Gesundheitsverhalten des Probanden. Sie beinhaltet Fragen zum den Themen Schlaf, sportliche Aktivität, Alkohol- und Nikotinkonsum, letzte Nahrungsaufnahme und körperliches Befinden.

### 3.4.5 Symptomcheckliste SCL-90

Die Symptomcheckliste (SCL-90) von L.R. Derogatis ist ein Selbstbeurteilungsfragebogen zur Erfassung der subjektiven Beeinträchtigung durch körperliche oder psychische Symptome innerhalb der letzten sieben Tage (173). Hierzu dienen insgesamt 90 Items, die auf einer fünfstufigen Likertskala von null (überhaupt nicht belastend) bis vier (sehr stark belastend) bewertet werden sollen. Die Items decken in unterschiedlichem Ausmaß folgende neun primäre Symptomskalen ab: Somatisierung, Zwanghaftigkeit, Unsicherheit im Sozialkontakt, Depressivität, Ängstlichkeit, Aggressivität und Feindseligkeit, Phobische Angst, Paranoides Denken, Psychotizismus. Aus den Antworten ergeben sich folgende drei globale Kennwerte, die zur Quantifizierung der Gesamtbelastung herangezogen werden können. Der Global Severity Index (GSI) beschreibt die durchschnittliche psychische Belastung bezogen auf die 90 Items. Der Positive Symptom Distress Index (PDSI) bezeichnet die Intensität der Items, bei denen eine Belastung vorliegt. Das Positive Symptom Total (PST) beziffert wiederum die Anzahl der Items, bei denen eine Belastung vorliegt. Eine neu normierte deutsche Version des SCL-90 wurde von G. H. Franke veröffentlicht. Die internen Konsistenzen (Cronbachs  $\alpha$ ) betragen  $\alpha = 0.76-0.92$  für die Skalen und für den GSI bei Erwachsenen  $\alpha = 0.97$ . Es wurden befriedigende bis gute Reliabilitätswerte erbracht (174).

### 3.4.6 Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität

Der Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität (FKKA) von Frey et al. dient der Erfassung von Art und Umfang gesundheitswirksamer Aktivitäten (175). Letztere umfassen neben Sport auch alltägliche Aktivitäten, wie zu Fuß oder mit dem Rad zurückgelegte Wegstrecken, Treppensteigen und Gartenarbeiten. Weiterhin werden Angaben zu Alter, Größe, Gewicht und Geschlecht erhoben.

### 3.4.7 Beck-Depressions-Inventar

Das Beck-Depressions-Inventar (BDI) ist ein Selbstbeurteilungsfragebogen von Beck et al. zur Einschätzung der Schwere einer Depression und wird außerdem als Screeningmethode eingesetzt, um die Depressionsneigung in der Allgemeinbevölkerung zu ermitteln (176). Hierzu dienen insgesamt 21 Items mit je vier Antwortmöglichkeiten, die die Symptomatik in zunehmender Schwere beschreiben. Der Patient bzw. Proband soll hiervon die Aussage ankreuzen, die seine Gefühle

innerhalb der letzten Woche am besten wiedergibt (182). Das BDI wurde in zahlreichen Studien eingesetzt und zeigte eine sehr gute Wiederholungsreliabilität und eine interne Konsistenz (Cronbachs  $\alpha$ ) von  $\alpha = 0.89-0.93$  für deutsche Stichproben (183).

#### 3.4.8 Perceived Stress Scale

Die Perceived Stress Scale (PSS) von Cohen et al. ist ein Selbstbeurteilungsfragebogen, der anhand von 14 Fragen mit fünfstufiger Antwortmöglichkeit von „niemals“ bis „sehr oft“ das Stressempfinden in bestimmten Situationen erfasst (177). Außerdem wird erhoben, ob bzw. wie stark das eigene Leben als unvorhersehbar, unkontrollierbar oder überfrachtet wahrgenommen wird. Die PSS weist eine gute Validität und interne Konsistenz (Cronbachs  $\alpha = 0.84$ ) auf (184).

#### 3.4.9 Trierer Inventar zum chronischen Stress

Das Trierer Inventar zum chronischen Stress (TICS) von Schulz et al. ist ein normiertes Instrument zur Diagnostik von chronischem Stresserleben (178). Der Selbstbeurteilungsfragebogen besteht aus 57 Items, deren Häufigkeit innerhalb der letzten drei Monate auf einer fünfstufigen Skala von „nie“ bis „sehr häufig“ bewertet werden soll. Die Items lassen sich in zehn Skalen einteilen. Die Skalen Arbeitsüberlastung, soziale Überlastung und Erfolgsdruck erfassen Stress als Resultat hoher Anforderungen. Die Skalen Arbeitsunzufriedenheit, Überforderung bei der Arbeit, Mangel an sozialer Anerkennung, soziale Spannungen und soziale Isolation beziehen sich auf Stress als Resultat mangelnder Bedürfnisbefriedigung. Weiterhin sind eine Skala zur chronischen Besorgnis und eine 12-Item-Screening-Skala als Globalmaß für erlebten Stress im TICS enthalten. Die internen Konsistenzen (Cronbachs  $\alpha$ ) der Skalen betragen  $\alpha = 0.84-0.91$ . Die Rasch-Reliabilitäten liegen bei  $0.78-0.89$  und es besteht eine gute Profilreliabilität (178).

#### 3.4.10 Angstsensitivitätsindex

Der Angstsensitivitätsindex (ASI) von Reiss et al. ist ein Selbstbeurteilungsfragebogen, der das Prinzip der Angst vor der Angst behandelt (179). Er besteht aus 16 Aussagen, die auf einer fünfstufigen Skala von „sehr wenig“ bis „sehr stark“ zutreffend bewertet werden sollen. Die Aussagen lassen sich drei übergeordneten Faktoren zuordnen. Der erste Faktor enthält Items zu somatischen Bedenken, z.B. die Sorge vor einem

Herzinfarkt bei schnellem Herzschlag. Der zweite Faktor behandelt soziale Bedenken, d.h. Furcht vor öffentlich sichtbaren Angstsymptomen (z.B. Zittern). Der dritte Faktor erfasst kognitive Bedenken und die Furcht vor den erwarteten Folgen erregungsbedingt schwacher kognitiver Leistung (179). Die internen Konsistenzen (Cronbachs  $\alpha$ ) betragen  $\alpha = 0.75-0.92$  und die empirischen Validitätskoeffizienten entsprechen den aus der Literatur bekannten Beziehungen (185).

### 3.5 Blutprobenanalytik

Die Blutprobenanalytik erfolgte im Labor der Abteilung Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Im Rahmen der Testung wurde den Probanden zu den oben genannten fest definierten Zeitpunkten je eine EDTA-Monovette venöses Blut entnommen. Diese wurden direkt nach der Entnahme zunächst sanft geschwenkt und anschließend für eine Dauer von 10 Minuten bei RCF = 2000 xG und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, um Blutplasma zu erhalten. Danach wurden die Monovetten bis zum Ende der Testung im Kühlschrank auf Eis gestellt.

Nach Entnahme und Zentrifugation der letzten Blutprobe wurde das Blutplasma der insgesamt 11 EDTA-Monovetten mit einer auf 500  $\mu$ l geeichten Pipette unter Laborbedingungen pipettiert. Die Tubes wurden danach direkt auf Trockeneis gelegt und bei -80°C im Eisschrank gelagert.

Anschließend erfolgte die Detektion und Quantifizierung der cfDNA durch Anwendung eines direkten Quantifizierungs-Assay. Genauer handelt es sich hierbei um die Methodik der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Hierdurch kann die präanalytische cfDNA-Extraktion umgegangen werden, welche üblicherweise mit hohen Kosten und Zeitaufwand sowie cfDNA-Verlusten einhergeht (186-188). Durch die Nutzung von Multilocus-Primern, die an diverse Stellen innerhalb der DNA binden, ist eine ausreichende Sensitivität gegeben. Eine passende Zielstruktur stellt aufgrund seiner Spezifität und Häufigkeit das long intersperced element 1 (LINE1) family 2 (L1PA2) dar. Der exakte Ablauf der hier angewandten cfDNA-Methodik wurde durch Neuberger et al. ausführlich beschrieben und validiert (186).

### 3.6. Herzfrequenz-Analyse

Die Auswertung der mittels Sport-Pulsuhr erhobenen Herzfrequenz-Daten erfolgte mittels Kubios HRV Standard Version 3.3.1.

Initial wurden die gemessenen Herzfrequenzen (HF) auf generelle Plausibilität und Vollständigkeit über die gesamte Dauer der Testung überprüft. Anschließend wurde eine Artefakt-Korrektur vorgenommen und hierfür ein sehr geringer Schwellenwert (0.45 Sekunden) eingestellt. Weiterhin wurde die smoothness prior Methode ( $\lambda=500$ ) angewendet, um den Effekt einer langsamen Änderung der mittleren Herzfrequenz auszugleichen (189).

Für die anschließende HF-Analyse wurden die HF-Daten in insgesamt 17 Sequenzen pro Testungstag aufgeteilt. Zeitpunkt und Dauer dieser HF-Sequenzen wurden im Vorhinein fest definiert und orientieren sich am Ablauf des Testungstages. Es wurde auf eine einheitliche Sequenz-Dauer von 5 Minuten geachtet. Die einzige Ausnahme hiervon stellt die Sequenz während der dreiminütigen Taktatmung dar.

Die erste Sequenz stellt die basale Ruhe-HF dar und wurde im Anschluss an die erste BE (demnach circa 10 min vor Beginn der Testbedingung) erhoben. Es folgten drei Sequenzen während der 15minütigen Testbedingung. Am Tag der Stressbedingung entsprachen diese Sequenzen jeweils der Vorbereitungszeit auf den TSST, der anschließenden Bewerbungsrede und der darauffolgenden Rechenaufgabe. Am Tag der Ruhebedingung wurden hierzu identische Sequenz-Intervalle ausgewählt. Es folgten weitere 12 direkt aneinander anschließende jeweils fünfminütige Sequenzen während der an beide Testbedingungen anschließenden einstündigen Ruheperiode.

### 3.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mithilfe des statistischen Auswertungsprogramms IBM SPSS Statistics Version 23 durchgeführt.

Die Auswertung der Untersuchungsdaten erfolgte durch deskriptive und interferenzstatistische Methoden. Zur Beschreibung der Gesamtstichprobe wurden die empirischen Daten in Tabellen und Grafiken zusammengefasst. Zur speziellen Beschreibung der Merkmalsverteilung innerhalb der Stichprobe dienten der Mittelwert als Maß der zentralen Tendenz und die Standardabweichung als Maß für die Variabilität der Verteilung.

Zunächst erfolgte die deskriptive statistische Auswertung der mittels Fragebögen erhobenen Daten zu psychischen Symptomen sowie allgemeinem und chronischem

Stressempfinden innerhalb der Stichprobe. Es folgte die Analyse des akuten subjektiven Stressempfindens der Stichprobe während der Stressbedingung im Vergleich zur Ruhebedingung. Hierzu wurde ein Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Skalen des PASA sowie der VAS-Gesamtskala zwischen Ruhe- und Stressbedingung mittels *t*-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Ziel war es, den Effekt des TSST auf das subjektive Stressempfinden zu erheben. Zudem wurde durch Berechnung von Cohens *d* die Effektstärke ermittelt.

Weiterhin erfolgte die vergleichende Analyse der Mittelwerte der cfDNA-Konzentrationen sowie der Herzfrequenzen zu vorher definierten Messzeitpunkten während Ruhe- und Stresstestung. Hierzu wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung angewandt mit dem Ziel, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Testbedingungen zu detektieren. Vor Durchführung der ANOVA wurden die entsprechenden Daten auf Plausibilität und Ausreißer untersucht und mittels Shapiro-Wilk-Test einer Prüfung auf Normalverteilung unterzogen. Daraufhin wurde eine log-Transformation der cfDNA-Daten durchgeführt, um einer asymmetrischen Verteilung vorzubeugen. Zudem erfolgte der Mauchly-Test auf Sphärizität. Bei Verletzung der Sphärizität wurde eine Korrektur der Freiheitsgrade mittels Greenhouse-Geisser-Koeffizient vorgenommen. Zur Ermittlung der Effektstärke wurde hier das partielle  $\eta^2$  berechnet. Für die anschließenden Paarvergleiche wurden Post-hoc-Tests mit Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt. Bei allen Berechnungen wurde ein statistisches Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$  zugrunde gelegt.

Die Aufzeichnung der Herzfrequenz gelang aufgrund eines technischen Problems nicht für die gesamte Stichprobe. Zur statistischen Analyse wurden lediglich die vollständigen Datensätze einer reduzierten Fallzahl  $N = 22$  herangezogen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Psychische Symptome innerhalb der Stichprobe

Die Stichprobe wies mit einem Global Severity Index (GSI) der SCL-90 von  $M = 0.34$  ( $SD = 0.29$ ) eine insgesamt geringe durchschnittliche psychische Belastung auf. Verglichen mit der repräsentativen Eichstichprobe (Männer und Frauen) von Hessel et al. (174) ist der GSI der Stichprobe geringer. Im Vergleich jedoch mit ausschließlich dem männlichen Anteil der repräsentativen Stichprobe zeigte die hier untersuchte

Stichprobe im Mittel einen höheren GSI. In Bezug auf die einzelnen Skalenwerten sind (ebenfalls im Vergleich zu oben genannter Eichstichprobe) insbesondere die erhöhten Mittelwerte für Depressivität ( $M = 0.48$ ,  $SD = 0.48$ ) und Zwanghaftigkeit ( $M = 0.56$ ,  $SD = 0.47$ ) erwähnenswert. Die Ergebnisse für die weiteren Skalenwerte und globalen Kennwerte der SCL-90 sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Psychische Symptome und Belastung innerhalb der Stichprobe gemäß SCL-90

SCL-90	<i>M</i>	<i>SD</i>	Minimum	Maximum
Somatisierung	0.22	0.23	0.00	0.75
Zwanghaftigkeit	0.56	0.47	0.00	1.70
Unsicherheit im Sozialkontakt	0.47	0.50	0.00	1.89
Depressivität	0.48	0.48	0.00	1.62
Ängstlichkeit	0.28	0.31	0.00	1.40
Aggressivität	0.26	0.32	0.00	1.17
Phobische Angst	0.14	0.26	0.00	1.00
Paranoides Denken	0.37	0.45	0.00	1.83
Psychotizismus	0.22	0.26	0.00	0.90
GSI	0.34	0.29	0.01	1.17
PSDI	0.01	0.00	0.01	0.02
PST	31.46	16.05	1.00	57.00

#### 4.1.1 Depressivität

Die Stichprobe wies im Durchschnitt einen niedrigen BDI-Score von  $M = 5.36$  Punkten ( $SD = 4.95$ ) auf. Allerdings erhielten nur 75% der Studienteilnehmer einen BDI-Score unter dem Grenzwert von 8 Punkten und litten demnach gemäß BDI nicht unter Depressivität. Dahingegen erreichten 10.7% der Stichprobe den Schweregrad einer minimalen Depression und 14.3% der Stichprobe den Schweregrad einer leichten Depression. Die höheren Schweregrade einer mittelschweren und schweren Depressionen waren innerhalb der Stichprobe nicht vertreten.

Die Auswertung der SCL-90 ergab für die Symptomskala Depressivität einen Mittelwert von  $M = 0.48$  ( $SD = 0.48$ ).

#### 4.1.2 Angst

Die Stichprobe wies im Durchschnitt einen ASI-Score von  $M = 15.82$  Punkten ( $SD = 7.25$ ) auf. Orientierend befindet sich dieses Ergebnis unterhalb des von Kemper et al. bei gesunden Studenten berichteten Mittelwerts von  $M = 19.61$  Punkten ( $SD = 10.33$ ) (185) und spricht demnach für eine geringe Angstsensitivität innerhalb der Stichprobe. Die Auswertung der SCL-90 ergab für die Skala Ängstlichkeit einen geringen mittleren Skalenwert von  $M = 0.28$  Punkten ( $SD = 0.31$ ). Auf der Skala phobische Angst erreichte die Stichprobe einen noch niedrigeren mittleren Skalenwert von  $M = 0.28$  Punkten ( $SD = 0.26$ ).

#### 4.1.3 Stress

##### 4.1.3.1 subjektive allgemeine Stresswahrnehmung

Die Stichprobe wies im Durchschnitt einen PSS-Score von  $M = 21.82$  Punkten ( $SD = 6.93$ ) auf, was einer moderaten subjektiven allgemeinen Stresswahrnehmung entspricht. Die genauere Auswertung ergab, dass 35.71% der Stichprobe einen PSS-Score unterhalb von 19 Punkten und demnach sogar eine geringe subjektive allgemeine Stresswahrnehmung aufwiesen. Der Grenzwert für eine hohe subjektive allgemeine Stresswahrnehmung wurde von keinem Studienteilnehmer erreicht. Demnach waren 64.29 % der Stichprobe durch eine moderate subjektive Stresswahrnehmung gekennzeichnet.

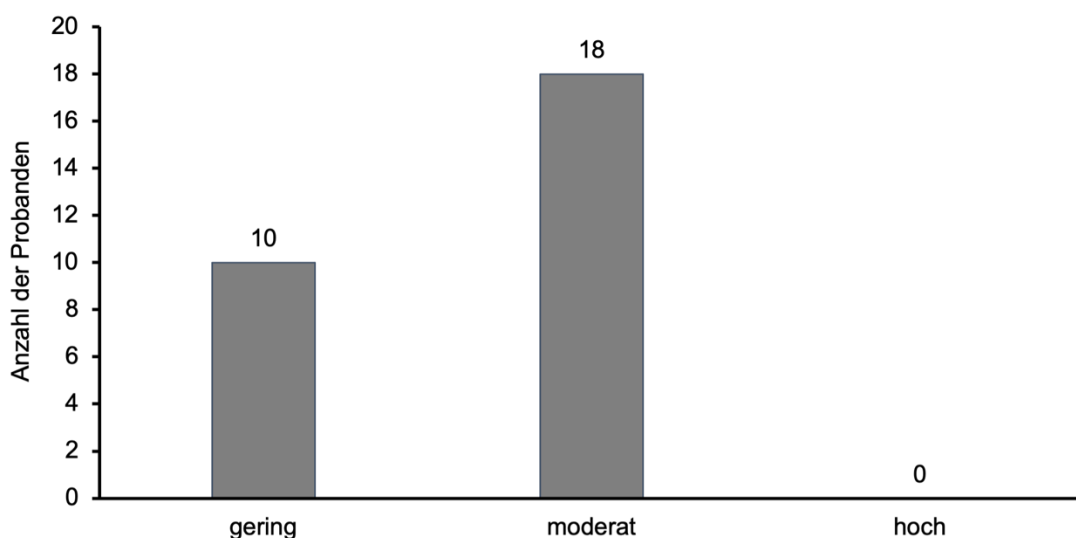


Abbildung 3: subjektive allgemeine Stresswahrnehmung der Stichprobe gemäß PSS

#### 4.1.3.2 chronische Stressbelastung

Die Stichprobe erreichte auf der 12-Item-Screening-Skala (SSCS) des TICS einen mittleren Summenwert von  $M = 11.29$  ( $SD = 6.08$ ). Orientierend an der von Hapke et al. etablierten Kategorisierung liegt dieser Mittelwert nur minimal unterhalb der Grenze von 12 Punkten zwischen einer unterdurchschnittlichen bis durchschnittlichen und einer überdurchschnittlichen Stressbelastung (2). Die genauere Auswertung ergab, dass 57.14% der Stichprobe eine unterdurchschnittliche bis durchschnittliche Stressbelastung zeigten. Eine überdurchschnittliche Stressbelastung wiesen 39.29% der Stichprobe auf, wohingegen 3.57% der Stichprobe sogar unter einer hohen Stressbelastung standen.

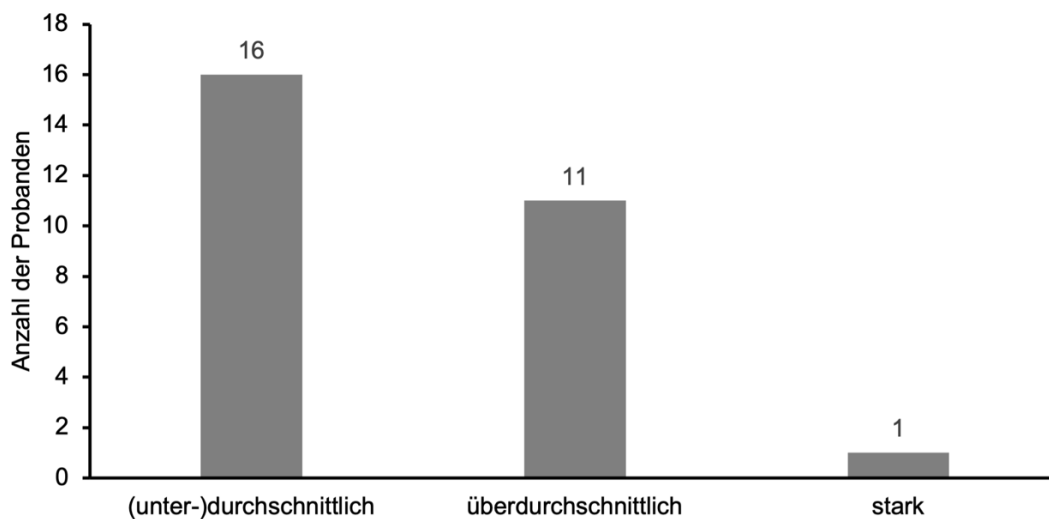


Abbildung 4: chronische Stressbelastung der Stichprobe gemäß SSCS des TICS

## 4.2 Vergleich des Stressempfindens während Stress- und Ruhetestung

### 4.2.1 Vergleich des Stressempfindens während TSST und Ruhebedingung

Der Vergleich des subjektiven Stressempfindens der Probanden während des TSST und der Ruhebedingung mittels Auswertung des PASA-Fragebogens ergab die in Tabelle 3 und Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 3: PASA der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST

PASA	Ruhe	TSST	<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>d</i>
	<i>M</i> ( <i>SD</i> )	<i>M</i> ( <i>SD</i> )				
Bedrohung	1.46 (0.84)	3.03 (1.09)	-7.794	27	≤.001	1.473
Herausforderung	2.24 (0.92)	4.07 (0.81)	-9.038	27	≤.001	1.708
Selbstkonzept eigener Fähigkeiten	4.59 (0.91)	3.78 (1.03)	3.169	27	≤.01	0.599
Kontrollüberzeugung	4.58 (0.71)	4.18 (1.02)	2.186	27	≤.05	0.413
Erstbewertung	1.85 (0.79)	3.55 (0.83)	-9.990	27	≤.001	1.888
Zweitbewertung	4.58 (0.64)	3.98 (0.89)	3.417	27	≤.01	0.646
Stressindex	-2.74 (1.27)	-0.43 (1.44)	-7.606	27	≤.001	1.437

Der abhängige *t*-Test (Konfidenzintervall 95%) ergab für die Primärskalen, Sekundärskalen und für den Stressindex signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen ( $p < .05$ ). Hieraus lässt sich ableiten, dass das Stressempfinden der Probanden während des TSST gegenüber der Ruhebedingung signifikant erhöht war. Darüber hinaus weisen die beiden Primärskalen Bedrohung und Herausforderung, die Erstbewertung sowie der Stressindex eine hohe Effektstärke (Cohens *d*) auf.

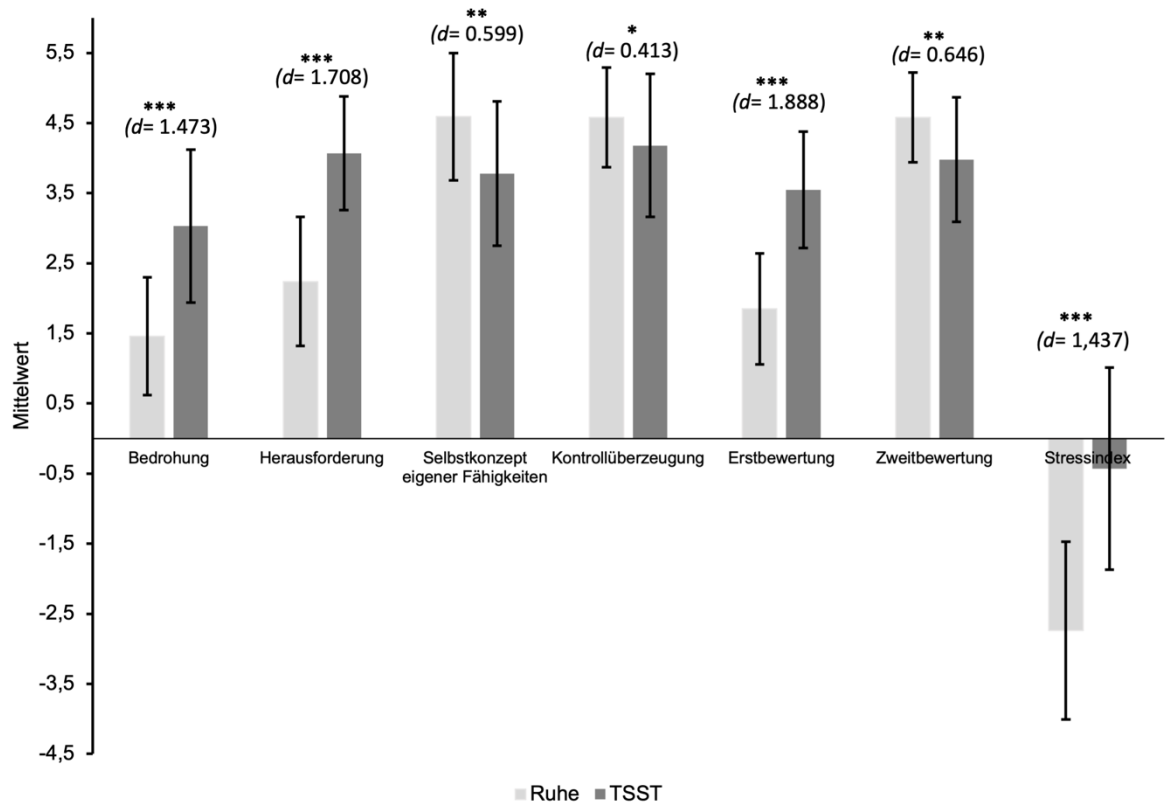


Abbildung 5: PASA der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST

#### 4.2.2 Vergleich des Stressempfindens nach TSST und Ruhebedingung

Der Vergleich des subjektiven Stressempfindens der Probanden unmittelbar in Anschluss an den TSST und die Ruhebedingung mittels Auswertung der VAS ergab die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse. Der abhängige *t*-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen ( $p < .05$ ). Weiterhin zeigte sich eine hohe Effektstärke (Cohens *d*).

Tabelle 4: VAS der Stichprobe für Ruhebedingung und TSST

	Ruhe	TSST	<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>d</i>
	<i>M</i> ( <i>SD</i> )	<i>M</i> ( <i>SD</i> )				
VAS Gesamtwert	41.70 (11.62)	57.75 (10.03)	-7.056	27	≤.001	1.333

### 4.3 Vergleich des Verlaufs der Herzfrequenz während Ruhe- und Stresstestung

Der genaue zeitliche Verlauf der mittleren Herzfrequenz der Probanden während Ruhe- und Stresstestung lässt sich der Abbildung 6 entnehmen.

Ausgangspunkt beider Graphen ist die mittlere Ruheherzfrequenz (Baseline), welche sich zwischen Ruhe- und Stresstestung nicht wesentlich unterscheidet und dem physiologischen Bereich entspricht. Mit dem Beginn der jeweiligen Testbedingung weisen die beiden Graphen einen deutlich voneinander abweichenden Verlauf auf. Während der Graph für die Ruhetestung flach verläuft, zeigt der Graph für die Stresstestung einen deutlichen Anstieg im Bereich des eingerahmten Zeitintervalls der Testbedingung bis zu einem mittleren Peak-Wert von  $M = 100.78$  ( $SD = 19.15$ ). Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall bis auf Werte knapp unterhalb des Ausgangsniveaus. Am Tag der Ruhetestung betrug der Peak-Wert im Mittel nur  $M = 73.42$  ( $SD = 12.90$ ).

Dieser Unterschied zwischen den beiden Testbedingungen lässt sich weiterhin an dem Parameter  $\Delta$  Peak-Base verdeutlichen. Am Tag der Stresstestung wurde ein mittleres  $\Delta$  Peak-Base von  $M = 31.36$  ( $SD = 16.04$ ) erreicht, während es am Tag der Ruhetestung im Mittel lediglich  $M = 4.43$  ( $SD = 6.01$ ) ausmachte. Der abhängige  $t$ -Test zeigt für die Parameter Peak und  $\Delta$  Peak-Base einen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Herzfrequenz-Parameter der Stichprobe während Ruhe- und Stresstestung

Herzfrequenz Parameter	Ruhe	TSST	$t$	$df$	$p$	$d$
	$M$ ( $SD$ )	$M$ ( $SD$ )				
Baseline	68.99 (11.98)	69.43 (8.87)	-0.225	21	.82	0.048
Peak	73.42 (12.90)	100.78 (19.15)	-6.493	21	$\leq .001$	1.384
$\Delta$ Peak-Base	4.43 (6.01)	31.36 (16.04)	-8.171	21	$\leq .001$	1.742

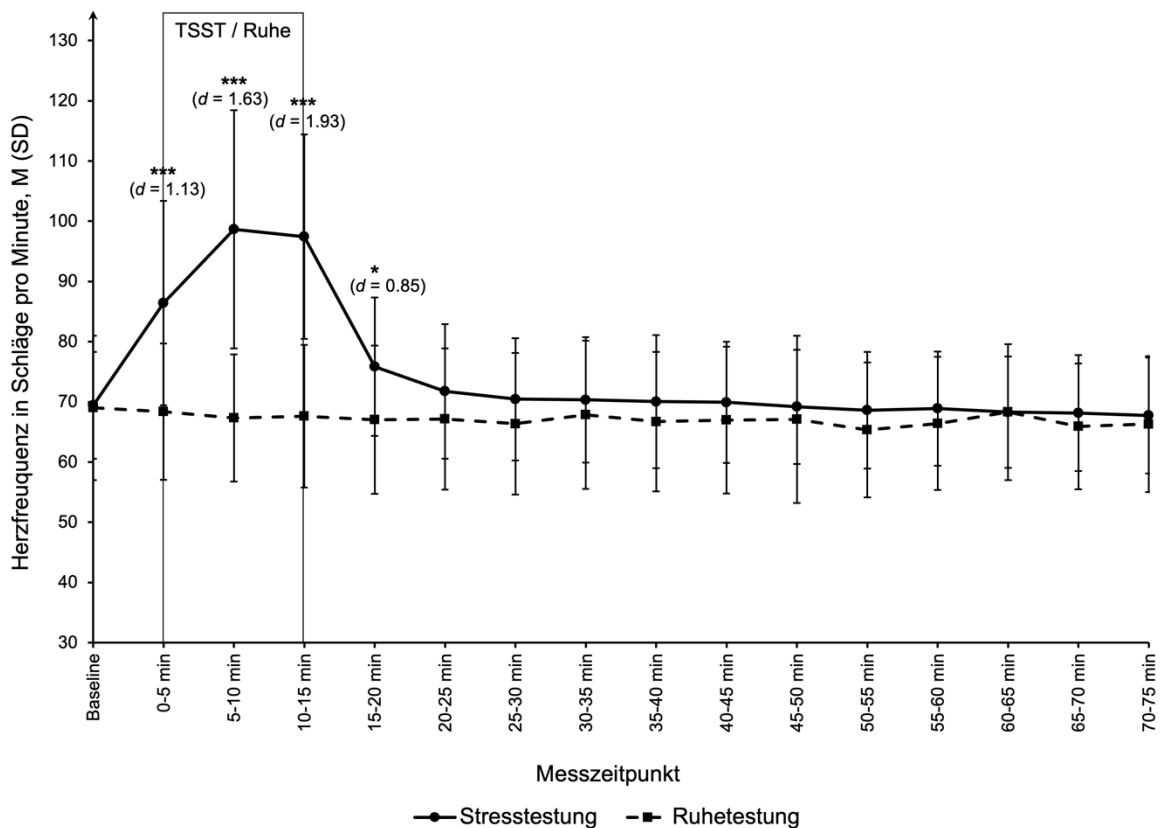


Abbildung 6: Verlauf der Herzfrequenz während der Ruhe- und Stresstestung

Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung der Herzfrequenzen ergab die folgenden Ergebnisse. Die Herzfrequenz unterschied sich hoch signifikant zwischen den Testbedingungen ( $F(1, 21) = 13.224, p \leq .01, \text{partielles } \eta^2 = 0.386$ ). Weiterhin zeigte sich nach Korrektur mittels Greenhouse-Geisser-Koeffizient ein höchst signifikanter Haupteffekt der Zeit ( $F(2.119, 44.495) = 47.171, p \leq .001, \text{partielles } \eta^2 = 0.692$ ) und ein höchst signifikanter Interaktionseffekt Testbedingung x Zeit ( $F(2.689, 56.465) = 49.696, p \leq .001, \text{partielles } \eta^2 = 0.703$ ).

Die anschließenden Bonferroni-Holm-korrigierten Post-hoc-Vergleiche ergaben einen höchst signifikanten Unterschied zwischen Ruhe- und Stresstestung für die Zeitintervalle 0-5 min ( $t(21) = -5.319, p \leq .001, d = 1.13$ ), 5-10 min ( $t(21) = -7.633, p \leq .001, d = 1.63$ ) sowie 10-15 min ( $t(21) = -9.069, p \leq .001, d = 1.93$ ). Im darauffolgenden Zeitintervall gab es immer noch einen signifikanten Unterschied zwischen Ruhe- und Stresstestung ( $t(21) = -3.974, p \leq .05, d = 0.85$ ). Im Anschluss waren die Ergebnisse nicht mehr signifikant. Bezüglich der Baseline-Herzfrequenzen ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Testbedingungen.

#### 4.4 Vergleich des Verlaufs der cfDNA-Konzentration während Ruhe- und Stresstestung

Die Abbildung 7 zeigt den Verlauf der mittleren cfDNA-Konzentration im Blut der Probanden während der Ruhe- und Stresstestung. Zum ersten Messzeitpunkt (15 Minuten vor Beginn der jeweiligen Testbedingung, Baseline) wiesen die Probanden im Durchschnitt eine cfDNA-Konzentration von  $M = 9.47$  ng/ml ( $SD = 5.16$ ) am Tag der Ruhetestung und  $M = 11.80$  ng/ml ( $SD = 12.69$ ) am Tag der Stresstestung auf.

Am Tag der Stresstestung kam es unmittelbar vor Beginn des TSST zu einem Abfall der mittleren cfDNA-Konzentration auf ihr Minimum. Im Rahmen des folgenden TSST wiederum wurde ein deutlicher Anstieg der mittleren cfDNA-Konzentration bis auf ihren Peak-Wert im Mittel von  $M = 21.46$  ng/ml ( $SD = 15.21$ ) verzeichnet. Im Anschluss fiel dieser kontinuierlich ab und erreichte nach 30 Minuten einen Mittelwert von  $M = 11.31$  ( $SD = 7.69$ ) leicht unterhalb des Ausgangsniveaus.

Am Tag der Ruhetestung zeigte sich ausgehend von einem ähnlichen Ausgangswert kein deutlicher Anstieg der cfDNA-Konzentration wie am Tag der Stresstestung. Im direkten Anschluss an die Ruhebedingung wiesen die Probanden eine mittlere cfDNA-Konzentration von  $M = 9.70$  ng/ml ( $SD = 3.02$ ) auf. Nach weiteren 5 Minuten erreichte diese ihr Minimum. Der mittlere Peak-Wert betrug  $M = 14.45$  ( $SD = 5.66$ ).

Der Unterschied zwischen den beiden Testbedingungen lässt sich weiterhin durch den Parameter  $\Delta$  Peak-Base verdeutlichen. Am Tag der Stresstestung betrug das mittlere  $\Delta$  Peak-Base  $M = 9.66$  ( $SD = 7.27$ ), während es am Tag der Ruhetestung im Mittel lediglich  $M = 4.98$  ( $SD = 3.37$ ) ausmachte. Der abhängige  $t$ -Test zeigte für die Parameter Peak und  $\Delta$  Peak-Base einen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: cfDNA-Parameter der Stichprobe während Ruhe- und Stresstestung

cfDNA Parameter	Ruhe	TSST	$t$	$df$	$p$	$d$
	$M$ ( $SD$ )	$M$ ( $SD$ )				
Baseline	9.47 (5.16)	11.80 (12.69)	-0.889	27	.38	0.168
Peak	14.45 (5.66)	21.46 (15.21)	-2.433	27	$\leq .05$	0.460
$\Delta$ Peak-Base	4.98 (3.37)	9.66 (7.27)	-3.260	27	$\leq .01$	0.616

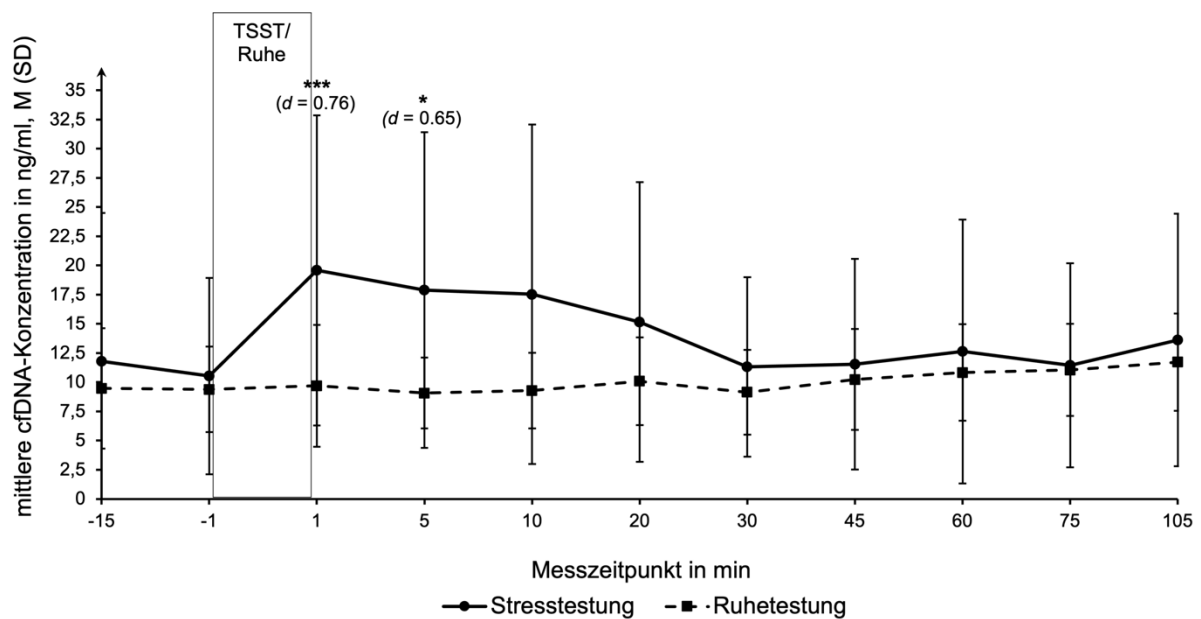


Abbildung 7: Verlauf der cfDNA-Konzentration während der Ruhe- & Stresstestung

Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung der logarithmierten cfDNA-Konzentrationen erbrachte die folgenden Ergebnisse. Die cfDNA-Konzentration unterschied sich signifikant zwischen den Testbedingungen ( $F(1, 27) = 5.28, p \leq .05$ , partielles  $\eta^2 = 0.163$ ). Nach Korrektur mittels Greenhouse-Geisser-Koeffizient zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt der Zeit über die 11 Messzeitpunkte ( $F(6.09, 164.45) = 18.5, p \leq .001$ , partielles  $\eta^2 = 0.402$ ) und ein signifikanter Interaktionseffekt Testbedingung x Zeit ( $F(6.01, 162.15) = 25.63, p \leq .001$ , partielles  $\eta^2 = 0.487$ ).

Die anschließenden Bonferroni-Holm-korrigierten Post-hoc-Vergleiche erbrachten in Bezug auf die Baseline-cfDNA-Konzentration keinen signifikanten Unterschied zwischen den Testbedingungen (Messzeitpunkt -15 min:  $t(27) = 0.952, p > .999, d = 0.18$ , Messzeitpunkt -1 min:  $t(27) = 0.666, p > .999, d = 0.13$ ). Im direkten Anschluss an die Testbedingung (Messzeitpunkt +1 min) zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied ( $t(27) = 4.037, p \leq .001, d = 0.76$ ) und zum darauffolgenden Messzeitpunkt + 5 min ein signifikanter Unterschied ( $t(27) = 3.426, p \leq .05, d = 0.65$ ) zwischen der Ruhe- und Stresstestung. Zum nächsten Messzeitpunkt + 10 min wurde knapp kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Ruhe- und Stresstestung erreicht ( $t(27) = 2.961, p = .054, d = 0.56$ ). Die folgenden Ergebnisse waren ebenfalls nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Forschungsarbeit untersuchte die cfDNA-Konzentration im Blut gesunder männlicher Probanden in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress im direkten Vergleich zu einer Ruhebedingung. Zusammenfassend erbrachte die statistische Auswertung der erhobenen Daten folgende Ergebnisse in Bezug auf die in Kapitel 2.5 formulierten Unterschiedshypothesen.

Im Hinblick auf die erste Unterschiedshypothese zeigte sich, dass das subjektive Stressempfinden der Probanden während und im direkten Anschluss an die Stressbedingung im Vergleich zur Ruhebedingung signifikant erhöht war.

Bezüglich der zweiten Unterschiedshypothese wurde ein hochsignifikanter Unterschied der Herzfrequenzen zwischen den Testbedingungen festgestellt.

Hinsichtlich der dritten Unterschiedshypothese zeigte sich ein signifikanter Unterschied der cfDNA-Konzentrationen zwischen den Testbedingungen.

Diese Ergebnisse werden nachfolgend in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet und es werden klinische Implikationen abgeleitet. Zudem erfolgt eine Diskussion der Stärken und Limitationen der vorliegenden Forschungsarbeit und es wird ein Ausblick auf weiterführende Forschungsarbeiten formuliert.

### 5.1 Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext

Die effiziente Induktion von akutem psychosozialen Stress war von entscheidender Bedeutung für die vorliegende Forschungsarbeit. Der hierfür angewandte TSST stellt ein bewährtes Instrument zur experimentellen Auslösung einer psychosozialen Stressreaktion dar (167-169). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit durch subjektive und objektive Parameter erneut bestätigt werden.

Die statistische Auswertung des PASA und der VAS ergab ein signifikant höheres subjektives Stressempfinden der Probanden während und unmittelbar nach der Stressbedingung im Vergleich zur Ruhebedingung. Insbesondere die beiden Primärskalen Bedrohung und Herausforderung, die Erstbewertung sowie der Stressindex des PASA wiesen eine hohe Effektstärke auf. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass der TSST eine Zunahme des Stressempfindens verursacht hat und somit als akuter Stressor fungierte.

Wie in Kapitel 2.1.3 bereits im Detail dargestellt, aktiviert der Stressor die beiden Stressachsen (SAM-Achse und HPA-Achse) und bewirkt letztlich die Ausschüttung der Stresshormone (Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol) in die Blutbahn. Die

Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin dienen der kurzfristigen und schnellen Vorbereitung des Körpers auf eine „Fight or flight“-Reaktion und bewirken unter anderem eine Vasokonstriktion und eine Zunahme der Herzfrequenz (4, 60, 61). Dies konnte im Rahmen der Auswertung der mittels Pulsuhr aufgezeichneten Herzfrequenzdaten ebenfalls für die vorliegende Forschungsarbeit bestätigt werden. Ausgehend von nahezu identischen Ruheherzfrequenzen kam es durch die Stressbedingung zu einem Anstieg der Herzfrequenzen von im Mittel 31 Schlägen pro Minute, während sich die Herzfrequenzen während der Ruhebedingung nicht wesentlich veränderten. Die ANOVA mit Messwiederholung erbrachte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Testbedingungen mit einem höchst signifikanten Haupteffekt der Zeit und einem höchst signifikanten Interaktionseffekt Testbedingung x Zeit. Die anschließenden Post-hoc-Vergleiche ergaben einen höchst signifikanten Unterschied zwischen Ruhe- und Stresstestung für die Dauer der Testbedingung und das darauffolgende fünfminütige Zeitintervall. Im Anschluss waren die Ergebnisse nicht mehr signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die erwartete rasche Aktivierung des sympathischen Nervensystems im Rahmen der akuten Stressreaktion durch den TSST. Nach Beendigung des Stressors kam es wie in der Literatur für die physiologische Stressreaktion vorbeschrieben zu einer schnellen Normalisierung der Herzfrequenzen zurück zur Baseline (64, 190).

Der Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration und akutem psychosozialen Stress bei Gesunden wurde bisher in zwei Studien untersucht mit divergierenden Resultaten. Hummel et al. stellten einen Anstieg der cfDNA-Konzentration in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress fest, während Trumpff et al. keine signifikante Änderung der cfDNA-Konzentration beobachteten (25, 26). Die beiden Studien weisen einige relevante methodische Unterschiede und Limitationen auf.

Die Studie von Trumpff et al. beinhaltete im Vergleich zu der Studie von Hummel et al. zwar eine mehr als doppelt so hohe Fallzahl, allerdings war die Stichprobe heterogen im Geschlecht. Schwangerschaft und Stillzeit stellten zwar Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme dar, allerdings nicht die Einnahme oraler Kontrazeptiva. Die Freisetzung von Cortisol im Rahmen der Stressreaktion wird jedoch durch die Sexualhormone und deren Schwankungen im Verlauf des weiblichen Zyklus beeinflusst (191, 192). Daher wurden in der Studie von Hummel et al. sowie in der vorliegenden Forschungsarbeit ausschließlich männliche Probanden rekrutiert.

Weiterhin unterscheiden sich die beiden Studien durch das angewandte Verfahren zur Stressinduktion. Wie in der vorliegenden Forschungsarbeit kam in der Studie von Hummel et al. der als Stressor standardisierte TSST zum Einsatz. Trumpff et al. hingegen nutzten ein eigenes Protokoll von nur fünf Minuten Dauer (inklusive zwei Minuten Vorbereitungszeit), für das die Induktion einer kardiovaskulären und immunologischen Stressreaktion allerdings ebenfalls reproduzierbar belegt werden konnte (26). Daher ist davon auszugehen, dass die Stressinduktion in beiden Studien genauso wie in der vorliegenden Forschungsarbeit erfolgreich war.

Einen zusätzlichen Unterschied und limitierenden Faktor stellen die Anzahl und die zeitliche Abfolge der Messzeitpunkte dar. In der Studie von Trumpff et al. war die Anzahl von drei Messzeitpunkten zu gering und deren zeitliche Abfolge angesichts des 30minütigen Abstands von der Messung unmittelbar nach dem nur fünfminütigen Stresstest zur darauffolgenden Messung nicht ideal. Prinzipiell wäre es sogar denkbar, dass der Zeitpunkt der cfDNA-Konzentrationsänderung innerhalb des Intervalls ohne Messung lag und schlicht verpasst wurde. Dahingegen zeichnete sich die Studie von Hummel et al. durch eine höhere Anzahl von fünf Messzeitpunkten in engeren zeitlichen Intervallen rund um den Stresstest aus. Der erste Messzeitpunkt befand sich allerdings nur zwei Minuten vor Beginn des Stresstests. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Ausgangswert bereits durch die psychische Aufregung und Erwartungsangst angesichts der bevorstehenden unbekanntem Situation verfälscht wurde. Die vorliegende Forschungsarbeit führte daher die erste Blutentnahme zur Ermittlung der Baseline-cfDNA-Konzentration bereits 15 Minuten vor Beginn der Testbedingung durch. Weiterhin wurde die Anzahl der Messzeitpunkte im Vergleich zur Studie von Hummel et al. nochmals gesteigert, wodurch der Verlauf der cfDNA-Konzentration noch engmaschiger und über eine längere Zeitspanne im Anschluss an die Testbedingung verfolgt werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den Studien betrifft die Blutprobenanalytik. Wie in der vorliegenden Studie analysierten auch Hummel et al. Plasmaproben, während Trumpff et al. ihre Untersuchungen an Serumproben durchführten. Im Vergleich zwischen Serum und Plasma wiesen mehrere Studien eine höhere cfDNA-Konzentration in Serum im Vergleich zu Plasma nach (193). Dies ist allerdings auf eine Verfälschung durch Blutgerinnungsprozesse zurückzuführen, die im Rahmen der Blutprobenlagerung vor der Zentrifugation ablaufen (194, 195). Somit repräsentiert die im Blutplasma gemessene cfDNA-Konzentration besser den Zustand in vivo und wird demnach auch für die cfDNA-Analytik empfohlen (193).

Neben den genannten (limitierenden) Unterschieden weisen die Studien noch eine weitere gemeinsame Limitation auf und zwar das Fehlen einer Kontrollgruppe. Die vorliegende Arbeit führte daher erstmals den direkten Vergleich mit einer ruhenden Kontrollgruppe durch.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Hummel et al. stellte die vorliegende Studie einen Anstieg der cfDNA-Konzentration im Verlauf der Stresstestung fest. Im Gegensatz dazu verblieb die cfDNA-Konzentration im Verlauf der Ruhetestung auf dem Ausgangsniveau. Genauer wurde im Rahmen der Stresstestung ein 1.8-facher Anstieg der cfDNA-Konzentration mit Erreichen des Maximums im direkten Anschluss an die Stressbedingung (Messzeitpunkt +1 min) festgestellt. Dies entspricht auch in Bezug auf Ausmaß und Kinetik des cfDNA-Konzentrationsanstiegs den von Hummel et al. berichteten Ergebnissen (25).

Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung erbrachte einen signifikanten Haupteffekt der Zeit und einen signifikanten Interaktionseffekt Testbedingung x Zeit. Die anschließenden Post-hoc-Vergleiche ergaben (höchst) signifikante Unterschiede zwischen Ruhe- und Stressbedingung für die Messzeitpunkte +1 min und + 5 min. Zum nächsten Messzeitpunkt + 10 min wurde knapp kein signifikanter Unterschied mehr erreicht und die folgenden Ergebnisse waren ebenfalls nicht signifikant. Zusammenfassend lässt sich hieraus ableiten, dass die Stressbedingung im Gegensatz zur Ruhebedingung eine signifikante Veränderung der cfDNA-Konzentration im zeitlichen Verlauf bewirkt hat. Konkreter zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es als unmittelbare Folge der psychosozialen Stressinduktion durch den TSST zu einem Anstieg der cfDNA-Konzentration kam mit konsekutivem Abfall innerhalb von 10 Minuten im Verlauf der auf den TSST folgenden Ruheperiode. Somit konnte durch die vorliegende Forschungsarbeit der direkte Zusammenhang zwischen akuter psychosozialer Stressinduktion durch den TSST und cfDNA-Konzentrationsanstieg nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu der bisher geringen Anzahl an Studien zu psychosozialem Stress wurde der Zusammenhang zwischen cfDNA-Konzentration und physischem Stress in Form von sportlicher Aktivität bei Gesunden bereits in einer Vielzahl von Studien behandelt. Es wurde eine Reihe verschiedener Trainingsmodalitäten mit variierender Dauer und Intensität untersucht, was allerdings auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einschränkt.

In Bezug auf die akuten Effekte von sportlicher Aktivität zeigte sich genauso wie in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress ein signifikanter Anstieg der cfDNA-Konzentration mit maximalen Werten im Anschluss an die Stressbedingung und mit konsekutiv raschem Absinken (156). Allerdings wurden in Reaktion auf sportliche Aktivität deutlich höhere cfDNA-Maxima zu einem leicht späteren Zeitpunkt nach Beendigung des Stressors erreicht als in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress (25, 157-159). Exemplarisch stellten Hummel et al. einen 5-fachen Anstieg der cfDNA-Konzentration mit einem Maximum zum Messzeitpunkt +15 Minuten nach Ende der sportlichen Aktivität fest, während es in Reaktion auf den TSST lediglich zu einem 1.8-fachen Anstieg der cfDNA-Konzentration mit früherem Erreichen des Maximums zum Messzeitpunkt +2 Minuten nach Ende des TSST kam. Die Post-hoc-Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Testbedingungen (sportliche Aktivität und TSST) zu allen Messzeitpunkten (25). Der bislang höchste relative cfDNA-Konzentrationsanstieg um den Faktor 18.6 wurde im unmittelbaren Anschluss an einen Halbmarathon gemessen mit darauffolgendem Absinken bis zur Ausgangskonzentration innerhalb von zwei Stunden (153). Der bislang geringste relative cfDNA-Konzentrationsanstieg um den Faktor 3.1 wurde anschließend an ein Krafttraining mit hoher Intensität erhoben und lag damit immer noch deutlich über dem von Hummel et al. und dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten relativen Anstieg in Reaktion auf psychosozialen Stress (160).

In Bezug auf den Zeitpunkt der initialen cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf sportliche Aktivität wiesen Beiter et al. durch serielle Blutentnahmen im Rahmen eines anstrengenden Laufbandtrainings einen deutlichen cfDNA-Konzentrationsanstieg innerhalb von 10 Minuten nach Trainingsbeginn mit Erreichen des Maximums nach weiteren 20 Minuten nach (157). Allerdings wurden diese seriellen Blutentnahmen lediglich an einer geringen Fallzahl von drei Probanden durchgeführt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen jedoch auch Hummel et al., die im direkten Anschluss an ein Laufbandtraining von nur 10 bis 15 Minuten Dauer einen signifikanten cfDNA-Konzentrationsanstieg mit Erreichen des Maximums nach weiteren 15 Minuten verzeichneten (25). In der vorliegenden Arbeit konnte in der Blutentnahme im unmittelbaren Anschluss an den fünfzehnminütigen TSST und mit siebzehnminütigem Abstand zur vorherigen Blutentnahme ein signifikanter Anstieg der cfDNA-Konzentration nachgewiesen werden. Der exakte Beginn der cfDNA-Freisetzung konnte aufgrund fehlender Blutentnahmen während des TSST zwar nicht bestimmt werden, aber es lässt sich dennoch ableiten, dass es in Reaktion auf akuten

psychosozialen Stress genauso wie durch akuten physischen Stress zu einer schnellen und akuten cfDNA-Freisetzung kommt.

Im weiteren zeitlichen Verlauf nach Ende der sportlichen Aktivität kam es in mehreren Studien zu einem raschen kontinuierlichen Abfall der cfDNA-Konzentration mit Erreichen der Ausgangskonzentration innerhalb von 60 Minuten bis zu zwei Stunden (153, 160, 161). Nach 30 Minuten wurden im Vergleich zur Ausgangskonzentration durch Beiter et al. noch 4.1-fach und durch Fatouros et al. sogar noch 13-fach erhöhte cfDNA-Konzentrationen nachgewiesen (157, 161). In Reaktion auf langandauernden Ausdauersport über mehrere Stunden zeigte sich sogar eine leicht abweichende cfDNA-Kinetik mit persistierend erhöhten cfDNA-Konzentrationen, allerdings ohne begleitend höhere cfDNA-Maxima (154, 162). Im deutlichen Gegensatz dazu hatte die cfDNA-Konzentration in der vorliegenden Studie in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress ihren Ausgangswert nach 30 Minuten bereits wieder erreicht. Bereits zum Zeitpunkt +10 Minuten wurde (knapp) kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Stress- und Ruhetestung erreicht. Diese Beobachtung kann nicht ausschließlich durch die insgesamt geringere cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf den TSST im Vergleich zu sportlicher Aktivität bei identischer cfDNA-Halbwertszeit erklärt werden. Atamaniuk et al. erklärten die prolongiert erhöhten cfDNA-Konzentrationen in Reaktion auf langandauernde sportliche Aktivität durch das höhere Ausmaß von physischem Stress auf den Organismus (154). In diesem Zusammenhang ist außerdem eine Studie von Fatouros et al. zu nennen, deren Teilnehmer ein hoch intensives Krafttrainingsprogramm von insgesamt 12 Wochen mit dem Ziel eines Übertrainings durchliefen und die 96 Stunden nach einem jeweils dreiwöchigen Trainingsintervall mit zunächst hoher und dann sehr hoher Intensität noch signifikant erhöhte cfDNA-Konzentrationen aufwiesen (196). Bislang konnte allerdings keine eindeutige Beziehung zwischen der Höhe der cfDNA-Konzentration und Intensität, Dauer und durchschnittlichem Energieverbrauch eines Trainings festgestellt werden. Dasselbe gilt für die Konzentration von Laktat als Marker für oxidativen Stress und von Harnsäure sowie Kreatinkinase als Marker für entzündliche Aktivität, so dass am ehesten davon auszugehen ist, dass die cfDNA-Freisetzung von einem Zusammenspiel mehrerer Faktoren beeinflusst wird (156).

Zusammenfassend lösen sowohl akuter physischer als auch akuter psychosozialer Stress eine vergleichbar schnelle cfDNA-Freisetzung aus, was auf einen identischen Freisetzungsmechanismus im Rahmen der Stressreaktion hinweist. Allerdings weisen Unterschiede im Methylierungsmuster der cfDNA (hypermethyliert in Reaktion auf

physischen Stress und hypomethyliert in Reaktion auf psychosozialen Stress) auf eine unterschiedliche zelluläre Herkunft hin. Es wäre möglich, dass die hypermethylierte cfDNA eher aus Blut- und Muskelzellen stammt, während die hypomethylierte cfDNA am ehesten auf neuronale Zellen zurückgeht (25). Zur weiteren Einordnung dieser Hypothese sind allerdings weitere Studien nötig.

Aufgrund der darüber hinaus beobachteten Unterschiede in Bezug auf Höhe und Zeitpunkt des cfDNA-Maximums kann geschlussfolgert werden, dass es nicht nur mehr als einen Herkunftsort, sondern auch mehr als nur einen Freisetzungsmechanismus von cfDNA gibt und dass darüber hinaus in Reaktion auf unterschiedliche Stressoren auch unterschiedliche cfDNA-Freisetzungsmechanismen mit voneinander abweichender Kinetik in Gang gesetzt werden. Hierzu ist es sinnvoll, wesentliche Unterschiede zwischen akutem physischem und psychosozialen Stress im Zusammenhang zur cfDNA-Freisetzung zu betrachten. Ein wesentlicher Unterschied stellen die mechanisch und metabolisch bedingten Muskelschäden im Rahmen der sportlichen Aktivität dar (151, 152). Neben der bereits vielfach belegten Leukozytose wurde nach abgeschlossener sportlicher Aktivität außerdem eine Lymphopenie durch Einwanderung der Lymphozyten in die verletzten Muskelzellen beobachtet (197, 198). Im Anschluss an die durch die Lymphozyten vermittelten muskulären Reparatur- und Anpassungsmechanismen, muss die Immunreaktion wieder beendet werden, was durch Apoptose der Lymphozyten geschieht (198). Darüber hinaus kommt es im Rahmen von sportlicher Aktivität durch oxidativen Stress zu verschiedenen DNA-Schäden bis hin zu DNA-Strangbrüchen, unter anderem in Leukozyten, mit daraus resultierender Apoptose (199, 200). Demnach liegt die Hypothese nahe, dass die cfDNA-Freisetzung im Rahmen von sportlicher Aktivität mittels Apoptose geschieht. Passend hierzu zeigten sich nach dem Training erhöhte Konzentrationen von Myoglobin, Harnsäure und Kreatinkinase, die gemeinhin als molekulare Marker für Zellschädigung bekannt sind (156). Jedoch handelt es sich bei der Apoptose um einen mehrstufigen Prozess und die Dauer von Stimulus bis zur Freisetzung von apoptotischer DNA in den Blutstrom beträgt etwa 5 Stunden (201). In sport-spezifischen Studien wurde allerdings in Lymphozyten ein schnelleres Voranschreiten der Apoptose beobachtet und mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie konnten im direkten Anschluss an ein Ausdauertraining für Apoptose typische DNA-Konfigurationen in Lymphozyten nachgewiesen werden (154, 197, 198). Folglich kann angenommen werden, dass die Apoptose mindestens anteilig für die Freisetzung von cfDNA im Rahmen von langanhaltendem Ausdauersport

ursächlich ist und dass es sich hierbei nicht nur um die Apoptose von Muskelzellen, sondern auch von Leukozyten handelt (154). Dies liefert zudem eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der cfDNA-Kinetik zwischen physischem und psychosozialen Stress, denn in Reaktion auf psychosozialen Stress kommt es zwar ebenfalls zu einer Entzündungsreaktion, aber es treten keine muskulären Schäden auf und der Anteil der durch Apoptose freigesetzten cfDNA sollte demnach wesentlich geringer ausfallen. Insbesondere im Rahmen von langandauerndem Ausdauersport oder regelmäßigem Krafttraining erscheint es durchaus plausibel, dass die Apoptose zu einer kontinuierlichen, eher langsam ablaufenden cfDNA-Freisetzung beiträgt (156). Allerdings kann die Apoptose nur teilweise als Erklärung für die erhöhten cfDNA-Konzentrationen dienen, denn wie weiter oben bereits aufgezeigt wurde, ist von einem schnellen Beginn der cfDNA-Freisetzung nach circa 10 Minuten auszugehen (157). Eine derart rapide Freisetzung von DNA-Fragmenten ist mit dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand zu Ablauf und Geschwindigkeit der Apoptose nicht vereinbar (156). Daher müssen für die akute und schnelle cfDNA-Freisetzung andere Mechanismen verantwortlich sein. Hier kommen die NETose und die aktive Sekretion in Betracht. Die NETose kann neben den verschiedensten Pathogenen auch durch reaktive Sauerstoffspezies, Zytokine und Chemokine (IL-8, Tumornekrosefaktor alpha) aktiviert werden (202). Sowohl akuter physischer Stress in Form von sportlicher Aktivität als auch akuter psychosozialer Stress führen zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg inflammatorischer Zytokine (hierunter IL-1 beta, IL-6, IL-10 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) (203-205). Demnach ist denkbar, dass physische und psychosoziale Stressoren die NETose über die Freisetzung von Zytokinen aktivieren und sich die erhöhte cfDNA-Konzentration über die vermehrte Produktion oder den verminderten Abbau von NETs erklären lässt (19). Das gleichzeitig vermehrte Vorkommen von NETs und cfDNA im Rahmen verschiedener entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen weist ebenfalls auf einen Zusammenhang hin (16, 114-116). Letztlich kann zum aktuellen Forschungsstand jedoch nicht erklärt werden, ob und wie NETs konkret zur erhöhten cfDNA-Konzentration beitragen und es sind weiterführende Studien nötig.

Als ein weiterer potenzieller Freisetzungsmechanismus von cfDNA wird die aktive Sekretion von DNA-Fragmenten diskutiert. Es ist bekannt, dass extrazelluläre Vesikel (EV) und Partikel mit DNA assoziiert sind, weshalb eine Freisetzung von cfDNA aus dem EV-Lumen angenommen wurde (206). Im Blut gesunder Individuen fanden sich jedoch nur geringe Mengen EV-assoziiertes cfDNA, wobei der Hauptteil hiervon an

deren Oberfläche gebunden vorlag und nicht wie angenommen intraluminal zum Schutz vor Abbau durch DNasen (158). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf sportliche Aktivität bei Gesunden völlig unabhängig von der Freisetzung der EV stattfindet (158, 207). Somit kann eine aktive Sekretion von cfDNA durch EV ausgeschlossen werden.

Es besteht jedoch weiterhin die Hypothese, dass DNA-Fragmente durch hauptsächlich hämatopoetische Zellen oder Endothelzellen aktiv sezerniert werden und daraufhin zunächst an deren Zelloberfläche oder der Oberfläche von EV binden und sich erst dann lösen, sobald die DNA-Bindungskapazität dieser Zellen bzw. Vesikel erreicht ist (156). Gemäß Stroun et al. unterliegt die aktive Sekretion von cfDNA homöostatischen Regulationsprinzipien (208, 209). Es ist möglich, dass sich in Reaktion auf chronischen Stress ein neues Gleichgewicht zwischen intrazellulärer, extrazellulär an der Zelloberfläche gebundener und frei im Blut zirkulierender DNA einstellt, das für Stunden bis Tage persistieren kann. Dies ist passend zu dem verlängerten Zeitintervall von 24 Stunden bis zu mehr als 48 Stunden bis zur Normalisierung der cfDNA-Konzentration im Anschluss an einen Ultramarathon (154, 162). Im Falle von rezidivierenden Stressoren könnte das verschobene Gleichgewicht auch persistieren, was wiederum eine mögliche Erklärung für die interindividuell unterschiedlichen Baseline-Konzentrationen der cfDNA in Ruhe darstellt (156). Bislang fehlen entsprechende Studien zum Effekt von rezidivierendem bzw. chronischem psychosozialen Stress auf die cfDNA-Konzentration bei gesunden menschlichen Individuen. In einer tierexperimentellen Studie von Filev et al. wurden Wistar-Ratten einem chronischen Stressprotokoll über die Dauer von elf aufeinander folgenden Tagen ausgesetzt. Es zeigte sich ein mit der Stressdauer korrelierender, signifikanter Anstieg der cfDNA-Konzentration sowie des Anteils oxidiertes cfDNA-Sequenzen (210). Prinzipiell erscheint die Hypothese einer Verschiebung des cfDNA-Gleichgewichts mit dem Resultat von höheren basalen cfDNA-Konzentrationen in Reaktion auf repetitive psychosoziale Stressoren möglich, jedoch sind hier weitere Studien nötig. Im Umkehrschluss wäre zu erwarten, dass durch Maßnahmen zur Stressreduktion (z.B. durch Strategien der kognitiven Verhaltenstherapie oder Meditation) eine Reduktion der cfDNA-Konzentration im Blut chronisch gestresster Individuen erreicht werden kann. Czamanski-Cohen et al. konnten diese Hypothese für eine Gruppe von Frauen bestätigen, die im Rahmen einer In-vitro-Fertilisationsbehandlung zusätzlich Maßnahmen zur Stressbewältigung anwandten

und deren initial erhöhte cfDNA-Konzentrationen am Ende der Behandlung signifikant auf ein nicht-pathologisches Level abgefallen waren (165).

## 5.2 Klinische Implikationen

Die Funktionalität und Gesundheit des menschlichen Organismus beruhen auf einem empfindlichen Gleichgewicht aus neuronalen, hormonellen und immunologischen Prozessen. Die kurzfristige und reversible Anpassung dieses Gleichgewichts in Reaktion auf einen Stressor ist notwendig und sinnvoll, um Herausforderungen zu bewältigen und das Überleben zu sichern. Auf lange Sicht, bei Überbeanspruchung oder fehlerhafter Regulation kann diese Anpassung im Rahmen der Stressreaktion jedoch auch Schaden anrichten und Krankheiten verursachen, was erstmals von McEwen unter der Bezeichnung allostatiche Last oder Preis der Adaptation beschrieben wurde (6, 32).

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel dargelegt wurde, geht akuter Stress mit einer durch das sympathische Nervensystem vermittelten, schnell einsetzenden systemischen Entzündungsreaktion mit Freisetzung verschiedener Zytokine einher (11). Während dies in der Akutsituation protektiv wirkt, haben chronische Entzündungsprozesse eine schädigende Langzeitwirkung (14). Durch multiple Studien konnte belegt werden, dass chronischer Stress mit einer Reihe schwerwiegender Erkrankungen, wie z.B. Schizophrenie, depressive Störung, kardiovaskuläre Erkrankungen, Insulinresistenz, Autoimmunerkrankungen und bestimmte Karzinome, assoziiert ist und dass dieser Zusammenhang wesentlich auf inflammatorische Prozesse zurückzuführen ist (14, 211, 212).

Die Schizophrenie ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, wobei rezidivierender bzw. chronischer Stress wesentlich an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Angesichts der im Rahmen dieser Studie festgestellten cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress, erscheint eine erhöhte cfDNA-Konzentration im Blut schizophrener Personen plausibel. Passend hierzu berichteten Melamud et al. in einer Metaanalyse über signifikant erhöhte cfDNA-Konzentrationen bei schizophrenen Probanden im Vergleich zu Gesunden (213). Die Schizophrenie ist mit einer Vielzahl immunologischer Veränderungen assoziiert, die sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem betreffen (214). Schizophrene Probanden weisen im Vergleich zu Gesunden eine höhere Blutkonzentration an Neutrophilen und einen

höheren Neutrophilen-Lymphozyten-Index auf (215, 216). In diesem Zusammenhang ist eine cfDNA-Freisetzung in Form von NETose denkbar (213). Daneben besteht bei Schizophrenie eine erhöhte Suszeptibilität der Fibroblasten und kortikalen Neurone für Apoptose (217, 218). Weiterhin gehören oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion zur Pathogenese der Schizophrenie und fördern apoptotische Prozesse (219). Somit kann die erhöhte cfDNA-Konzentration bei Schizophrenie auch durch Apoptose bedingt sein (213). Darüber hinaus ist es möglich, dass eine Störung der cfDNA-Eliminationsmechanismen zu deren erhöhter Konzentration beiträgt (19). Ershova et al. stellten bei schizophrenen Probanden eine abnormal hohe Aktivität von Endonukleasen bei ebenfalls erhöhter cfDNA-Konzentration fest (220). Prinzipiell kann die erhöhte Endonukleasen-Aktivität im Sinne der Homöostase als kompensatorische Reaktion auf die erhöhte cfDNA-Konzentration verstanden werden, allerdings sind weitere Studien zur Funktionalität der Endonukleasen und Effektivität der cfDNA-Elimination zur exakten Einordnung sinnvoll (213). Nach Freisetzung der cfDNA wird diese durch Rezeptoren des Immunsystems (sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren) erkannt, wodurch eine Immunreaktion eingeleitet wird (221, 222). Darüber hinaus kann die cfDNA durch den mit Schizophrenie einhergehenden oxidativen Stress oxidiert werden, was ihr zusätzliche proinflammatorische Eigenschaften verleiht (219, 223). Zusammenfassend ist eine Beteiligung der cfDNA an den chronischen inflammatorischen Prozessen bei Schizophrenie wahrscheinlich und die Neutralisierung der proinflammatorischen Effekte der cfDNA könnte sogar einen neuen potenziellen Angriffspunkt zur Therapie der Erkrankung darstellen (213). Allerdings sind weitere Studien nötig, um diesen potenziellen klinischen Implikationen näher nachzugehen.

Eine weitere stressassoziierte Erkrankung ist die depressive Störung. Für diese Erkrankung ist eine Hyperaktivität der HPA-Achse typisch (224, 225). Außerdem wurde bei depressiven Probanden im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Konzentration des proinflammatorisch wirkenden IL-6 und darüber hinaus ein linearer Zusammenhang zwischen der IL-6-Konzentration und dem Ausmaß der depressiven Symptome festgestellt (226). Passend hierzu ist bekannt, dass proinflammatorische Mediatoren (darunter IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ ) einen potenten Aktivator der HPA-Achse darstellen (227). Es wird angenommen, dass die HPA-Achsen-Hyperaktivität auf eine Störung des negativen Feedbackmechanismus mit resultierender Hypersekretion von CRH und Cortisol zurückzuführen ist (226). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass proinflammatorische Zytokine eine Resistenz der für die Steuerung des negativen

Feedbackmechanismus verantwortlichen zentralen Glukokortikoid-Rezeptoren bewirken (228). Der genaue Mechanismus ist bis dato jedoch noch nicht geklärt. Angesichts der in dieser Studie festgestellten cfDNA-Freisetzung durch akuten psychosozialen Stress wäre eine erhöhte cfDNA-Konzentration bei Personen mit depressiver Störung denkbar. Die bisherige Studienlage beschränkt sich allerdings auf nur wenige Studien zur cf-mtDNA-Konzentration mit insgesamt widersprüchlichen Ergebnissen, denn es wurden sowohl erhöhte als auch erniedrigte als auch mit der gesunden Kontrollgruppe übereinstimmende cf-mtDNA-Konzentrationen bei depressiven Personen ermittelt (17). In einer Metaanalyse von Melamud et al. fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der cf-mtDNA-Konzentration im Blut von Probanden mit depressiver Störung im Vergleich zu Gesunden bei allerdings erheblicher Heterogenität der untersuchten Daten (213). Die Konzentration der nukleären cfDNA bei depressiven Probanden wurde bislang nicht untersucht.

Zum umfassenden Verständnis der Pathogenese und Auswirkungen der HPA-Achsen-Störungen ist weiterhin von Interesse, wie sich die cfDNA-Konzentration bei Erkrankungen mit Hypoaktivität der HPA-Achse verhält. Zu den Erkrankungen, die mit einer HPA-Achsen-Hypoaktivität einhergehen, zählen Panikstörungen und posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS) (229-231). Die HPA-Achsen-Hypoaktivität wird hier ebenfalls auf einen gestörten Feedbackmechanismus zurückgeführt, allerdings besteht im Gegensatz zu depressiven Störungen eine erhöhte Sensitivität des Feedbacks mit konsekutivem Hypocortisolismus in der Peripherie (231). In Reaktion auf akuten psychosozialen Stress ist die Cortisol-Freisetzung bei Personen mit Panikstörung stark vermindert (229, 232). Eine mögliche Erklärung hierfür befindet sich im Einklang mit dem Modell der allostatistischen Last von McEwen und besagt, dass es durch häufige stressbedingte Cortisol-Freisetzung (repeated hits) zu einer Herabregulierung der CRH-Rezeptor-Dichte mit folglich erhöhter Sensitivität des negativen Feedback-Mechanismus kommt (232). Zusammenfassend beschreibt dies eine Art Verschleißeffekt der HPA-Achse mit folglich stark reduzierter Cortisolantwort in Reaktion auf akuten Stress (233). In Bezug auf die cfDNA-Konzentration wäre eine verminderte cfDNA-Konzentration bei HPA-Achsen-Hypoaktivität zu erwarten. Allerdings ist die aktuelle Studienlage auch hier sehr dünn. Bis dato existieren keine Studien zur cfDNA-Konzentration bei Vorliegen einer Panikstörung. In einer Studie zu PTBS bei Kriegsveteranen wurden signifikant niedrigere cf-mtDNA-Konzentrationen festgestellt als bei der gesunden Kontrollgruppe und darüber hinaus zeigte sich, dass geringere cf-mtDNA-Konzentrationen mit einer

höheren Glukokortikoid-Sensitivität des Feedbackmechanismus der HPA-Achse assoziiert waren (234). Die nukleäre cfDNA wurde auch hier nicht untersucht. Zusammenfassend sind die bisherigen Studienergebnisse zur cfDNA-Konzentration bei HPA-Achsen-Störungen angesichts der Heterogenität der Daten, der geringen Fallzahlen und der alleinigen Betrachtung der cf-mtDNA nicht wegweisend. Es sind weitere Studien notwendig, die zudem alle Formen von cfDNA umfassen sollten.

Darüber hinaus existiert eine Vielzahl weiterer somatischer stressassoziierter Erkrankungen, die ebenfalls einen Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen aufweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine durch Stress bedingte Hypoaktivität der HPA-Achse dar, denn aufgrund des resultierenden peripheren Hypocortisolismus ist die immunsupprimierende Wirkung des Cortisols abgeschwächt, was wiederum chronische inflammatorische Prozesse begünstigt (231). Chronische Entzündungsprozesse gelten gemeinsam mit der Hyperkoagulabilität des Blutes als die wesentlichen Mechanismen bei der Pathogenese von Atherosklerose und Thrombose (235). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die NETose zu endothelialer Dysfunktion und arterieller Hypertonie beiträgt (236). Der Schweregrad der koronaren Atherosklerose ist mit erhöhten Markern für NETose und mit erhöhten cfDNA-Konzentrationen assoziiert (237). Das gleichzeitige Vorliegen von erhöhten Markern für NETose und erhöhten cfDNA-Konzentrationen spricht für die Hypothese, dass die NETose einen Freisetzungsmechanismus für cfDNA darstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein durch akuten psychosozialen Stress induzierter cfDNA-Konzentrationsanstieg im Vergleich zu einer ruhenden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es wäre denkbar, dass es im Rahmen der stressinduzierten immunologischen Reaktion zur NETose und in deren Folge zur cfDNA-Freisetzung kommt. Um diese Hypothese zu verifizieren, sind allerdings weitere Studien nötig. Inwiefern NETs und cfDNA dann konkret zu der Entstehung von Atherosklerose und Thrombose beitragen, ist ebenfalls noch Gegenstand aktueller Forschung. Belegt ist bereits, dass chronischer, z.B. durch die Pflege eines kranken Familienmitglieds ausgelöst, psychosozialer Stress mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht (238, 239). Zudem zeigten sich im Verlauf eines sechsjährigen Follow-ups vierfach höhere Konzentrationsanstiege von IL-6 bei Pflegenden im Vergleich zur Kontrollgruppe (240). Es gibt allerdings auch Studien mit gegenteiligem Ergebnis, so dass insgesamt von einer deutlichen individuellen Variabilität ausgegangen werden muss, welche zumindest anteilig mit dem Ausmaß des subjektiven Stressempfindens erklärt werden

kann (14). So konnte gezeigt werden, dass Pflegende, die eine größere psychische Belastung angaben, höhere IL-6-Konzentrationen aufwiesen (241). Auch bei Personen mit positiver Anamnese für eine Misshandlung (physisch, emotional oder sexuell) in der Kindheit fanden sich persistierend erhöhte Entzündungsparameter (242). Diese Assoziation präsentierte sich noch deutlicher bei Pflegenden mit Missbrauchserfahrung in der Kindheit, was die erhöhte Vulnerabilität der Betroffenen für Stress verdeutlicht und somit auch eine erhöhte Prädisposition für stressassoziierte Erkrankungen impliziert (243). Passend hierzu zeigten sich in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress höhere Konzentrationsanstiege inflammatorischer Parameter bei Vorliegen bestimmter Persönlichkeitsmerkmale wie z.B. Feindseligkeit und geringem Selbstwertgefühl (244, 245). Dies gilt ebenfalls für Individuen mit geringerem sozioökonomischen Status und höherer beruflicher Stressbelastung (246-248). Diese Erkenntnisse passen vom Grundsatz her zu den einschlägigen psychologischen Stressmodellen. Gemäß transaktionalem Stressmodell entsteht Stress erst durch die Bewertung des Ereignisses durch das Individuum (39). Folglich treten die laborchemischen und klinischen Zeichen chronischer Stressbelastung nur bei denjenigen Pflegenden auf, die diese Tätigkeit auch subjektiv als belastend empfinden. In Bezug auf die stressbedingte Genese von Krankheiten besagt das Diathese-Stress-Modell, dass zusätzlich zu der Stressbelastung auch noch eine erhöhte Vulnerabilität bzw. verringerte Bewältigungsressourcen vorliegen müssen (4, 7). Die erhöhte Vulnerabilität bzw. Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung beruht auf verschiedenen genetischen und lerngeschichtlichen Faktoren und lässt sich somit nicht aufheben oder heilen (43). Mithilfe eines geeigneten Biomarkers könnten allerdings diejenigen Personen mit einer erhöhten Prädisposition für eine stressassoziierte Erkrankung erkannt und in der Folge hierüber aufgeklärt werden mit dem Angebot der Teilnahme an Präventivmaßnahmen. Falls bereits eine stressassoziierte Erkrankung vorliegt, könnten ergänzend zur jeweiligen Standardtherapie der Erkrankung auch Maßnahmen zur Stressreduktion angewandt werden. Bezüglich der Wirksamkeit und des Wirkmechanismus solcher Maßnahmen konnten Black et al. nachweisen, dass eine kurze tägliche Meditationsübung über einen Zeitraum von 6 Wochen bei Pflegenden eines an Demenz erkrankten Angehörigen eine Umkehr der initial erhöhten Expression proinflammatorischer Gene bewirkte (249). In einer Studie von Laudensberger et al. zeigte sich, dass eine achtwöchige Stressbewältigungsmaßnahme eine Reduktion zweier proinflammatorischer Transkriptions-Kontrollmechanismen verursachte (250).

Bei unter subjektiv starker psychischer Stressbelastung stehenden Frauen bewirkten Maßnahmen zur Stressreduktion einen Abfall der cfDNA-Konzentration auf ein nicht pathologisches Level (165, 166). Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf einen gesundheitsfördernden, antiinflammatorischen Effekt von Meditation und anderen Stressbewältigungsmaßnahmen hin, wobei die Ergebnisse durch weitere Studien verifiziert werden sollten. Auf der Suche nach einem geeigneten Biomarker für Stress bzw. Präventivmarker für stressassoziierte Erkrankungen wird neben verschiedenen Zytokinen auch die cfDNA diskutiert. In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankung gibt es bereits Studien, welche einen erhöhten Konzentrationsanstieg verschiedener Zytokine in Reaktion auf akuten Stress mit einem erhöhten Krankheitsrisiko in Verbindung bringen. In einer Längsschnittstudie von Bryden et al. konnten erhöhte ambulante Blutdruckwerte in der Follow-up-Untersuchung anhand der höheren stressinduzierten Anstiege der IL-6-Konzentration drei Jahre zuvor antizipiert werden (251). Passend hierzu stellten Ellins et al. bei Probanden mit höherem stressinduzierten Anstieg von Fibrinogen und  $TNF\alpha$  in der Follow-up-Untersuchung nach ebenfalls drei Jahren eine erhöhte Steifigkeit der Gefäßwand der Carotiden fest, was wiederum ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko widerspiegelt (252). Derartige oder ähnliche Längsschnittstudien zur cfDNA-Konzentration fehlen bis dato. In Anbetracht des in dieser Studie festgestellten signifikanten cfDNA-Konzentrationsanstiegs in Reaktion auf den TSST, konnte die Beteiligung der cfDNA an der akuten Stressreaktion belegt werden. Zusammen mit den beobachteten interindividuellen Schwankungen der basalen cfDNA-Konzentration und den erhöhten cfDNA-Konzentrationen bei Vorliegen verschiedener stressassoziiierter Erkrankungen erscheint es grundsätzlich möglich, dass sich die cfDNA als Biomarker für chronischen psychosozialen Stress eignet. Es ist allerdings wichtig, zu berücksichtigen, dass Herkunft, Freisetzungsmechanismen und Funktion der cfDNA bislang nicht vollständig verstanden sind und dass darüber hinaus von verschiedenen Herkunftsorten und Freisetzungsmechanismen auszugehen ist. Außerdem gibt es eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Zuständen, die mit erhöhten cfDNA-Konzentrationen einhergehen. Neben der sportlichen Aktivität sind hier exemplarisch die erhöhten cfDNA-Konzentrationen bei Übergewicht, Tumorerkrankungen, Schwangerschaft oder Trauma zu nennen (85, 253). Es ist denkbar, dass diese Zustände den Betroffenen zum Teil nicht bekannt sind (z.B. eine bislang unentdeckte Tumorerkrankung), was es praktisch unmöglich macht, allein von der Höhe der cfDNA-Konzentration auf eine bestimmte Pathologie oder Prädisposition hierzu zu schließen. Die cfDNA-

Konzentration ist somit nicht spezifisch, was ihre Anwendung als Biomarker für Stress limitiert. Als eine geeignetere Anwendungsmethode kommt allerdings ein Scoring-System in Frage, welches die cfDNA-Konzentration zusammen mit anderen Kriterien und Laborparametern berücksichtigt. In speziellen Fällen kann durch eine ergänzende Analyse des Methylierungsmusters die Herkunft der cfDNA näher bestimmt werden (76). Aufgrund der mit der Methode einhergehenden Kosten und je nach Fragestellung auch fraglicher klinischer Signifikanz, kommt dies eher nicht als Screening-Untersuchung für stressassoziierte Erkrankungen in Frage. Eine größere klinische Relevanz hat die Verlaufsmessung der cfDNA-Konzentration im Bereich des Monitorings von Therapieansprechen und Krankheitsverlauf. Auf diese Weise könnten eine schnellere Detektion von Therapie-Non-Respondern und eine generelle Optimierung des individuellen Therapieerfolgs erreicht werden.

### 5.3 Stärken und Limitationen

Die wesentlichen Stärken sowie Kritik und Limitationen der vorliegenden Forschungsarbeit werden nachfolgend zusammenfassend dargestellt.

Das Studiendesign und die Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme wurden in Anlehnung an frühere erfolgreiche Forschungsprojekte und Empfehlungen der aktuellen Literatur entwickelt. Insgesamt zeichnete sich das Studiendesign durch einen im Vorhinein minutiös geplanten Ablauf und ein hohes Maß an Standardisierung aus. Hierdurch konnten Unterschiede im Ablauf der einzelnen Testungen und in der Behandlung der Probanden vermieden werden. Aus der Perspektive der Probanden bestand zudem keine Möglichkeit, kontrollierend in den Ablauf einzugreifen, was zur Stressinduktion beigetragen haben sollte.

Die effiziente Induktion von psychosozialen Stress war von entscheidender Bedeutung für die vorliegende Forschungsarbeit. Gemäß einer Metaanalyse von Dickerson und Kemeny wiesen Testverfahren, welche eine Kombination von freier Rede und einer Denkaufgabe zur Stressinduktion nutzten und zudem die Aspekte soziale Bewertung, Unkontrollierbarkeit und Neuartigkeit beinhalteten, eine hohe Effektstärke auf (31). Alle diese Kriterien konnten im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit durch die Durchführung des TSST zur Stressinduktion Anwendung finden. Bei Wiederholung des TSST innerhalb von 24h konnte ein Absinken der Cortisolkonzentration im Speichel im Sinne eines Habituationseffekts nachgewiesen werden, während eine Wiederholung des TSST nach zehnwöchentlichem Intervall mit

einer Aktivierung der HPA-Achse in typischer Weise einherging (254). Um eine Ergebnisverfälschung durch mögliche Habituationseffekte sicher zu vermeiden, wurden in die vorliegende Studie ausschließlich solche Probanden eingeschlossen, denen der Ablauf und die Funktionsweise des TSST unbekannt waren.

Durch die häufigen Blutentnahmen zu insgesamt 11 Messzeitpunkten konnte der Verlauf der cfDNA-Konzentration insbesondere im Anschluss an die Testbedingungen detailliert ermittelt werden. Allerdings erfolgten keine Blutentnahmen während der jeweiligen Testbedingungen, so dass der exakte Zeitpunkt der cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf den TSST nicht bestimmt werden konnte. Eine mögliche Stressinduktion durch die Venenpunktion wurde berücksichtigt, weshalb die Anlage des iv-Zugangs 45 Minuten vor der ersten Blutentnahme erfolgte. Bisherige Studien zur Geschwindigkeit des cfDNA-Abbaus im Blut ermittelten in verschiedenen Settings cfDNA-Halbwertszeiten von 16 Minuten bis 2,5 Stunden (255-258). Die im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit gemessenen niedrigen basalen cfDNA-Konzentrationen mit anschließendem signifikantem Anstieg im Rahmen der Stressbedingung im Gegensatz zur Ruhebedingung sprechen dafür, dass die Venenpunktion keinen Störfaktor darstellte.

Darüber hinaus wurde die zirkadiane Rhythmik der Cortisol synthese im Studiendesign berücksichtigt. Die Testungen fanden nachmittags statt, da die Schwankungen des Basiscortisols hier am geringsten ausgeprägt sind. Mehrere Studien zeigten, dass die Effektstärke der Cortisolantwort am Nachmittag besonders hoch ist und dass hier demnach die aussagekräftigsten Messwerte erzielt werden (31, 259, 260). Die zirkadiane Rhythmik der Cortisol synthese wird außerdem durch Änderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus beeinflusst, weshalb Schicht-/Nachtarbeiter von der Studienteilnahme ausgeschlossen wurden (261).

Weiterhin wurde der Einfluss der Sexualhormone auf die Stressreaktion bedacht. Die Freisetzung von Cortisol im Rahmen der weiblichen Stressreaktion wird durch den Menstruationszyklus und die in der jeweiligen Zyklusphase vorherrschenden Sexualhormone beeinflusst (191, 192). Zur Vermeidung einer Ergebnisverfälschung durch hormonelle Zyklusschwankungen, Schwangerschaft oder Einnahme oraler Kontrazeptiva wurden daher ausschließlich männliche Probanden rekrutiert.

Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen cfDNA-Konzentration und Lebensalter stellte die Forschungsgruppe von Meddeb et al. fest, dass ein Lebensalter von mehr als 47 Jahren prädiktiv für eine erhöhte cfDNA-Konzentration im Blut war (262). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden nur Probanden bis zu einem Alter von 35

Jahren zugelassen. Im Vergleich zu der im Durchschnitt älteren deutschen Gesamtbevölkerung besteht innerhalb dieser Stichprobe eine geringere Wahrscheinlichkeit bzw. Häufigkeit von Stresserlebnissen im Rahmen ihres bisherigen Lebens. Das junge Probandenalter birgt außerdem den Vorteil, dass in dieser Altersgruppe deutlich seltener unentdeckte Vorerkrankungen bestehen. Der Einfluss verschiedener physischer und psychischer Erkrankungen sowie Medikamente auf die physiologische Stressreaktion und auf die cfDNA-Konzentration im Blut wurde bereits in multiplen Studien nachgewiesen (21, 87). Durch den Einschluss ausschließlich gesunder Probanden ohne Dauermedikation konnte somit eine Ergebnisverfälschung durch Vorerkrankungen oder Medikamente im Rahmen der vorliegenden Arbeit verhindert werden. Bei einer sportlichen Aktivität von durchschnittlich 5.50 Stunden pro Woche handelt es sich um eine verhältnismäßige hohe Trainingsdauer bzw. -häufigkeit. Um eine Beeinflussung der cfDNA-Konzentration durch akute sportliche Aktivität zu vermeiden, wurde ein Sportverzicht für 24 Stunden vor Testungsbeginn mit den Probanden vereinbart. Zudem wurden die Probanden instruiert, sich für die Dauer der Testung nicht körperlich zu belasten und z.B. im Raum umherzulaufen. Wie im vorherigen Kapitel bereits dargelegt wurde, ist von unterschiedlichen Herkunftsorten und Freisetzungsmechanismen der cfDNA in Reaktion auf physischen im Vergleich zu psychosozialen Stress auszugehen. Daher erscheint eine Beeinflussung der im Rahmen der vorliegenden Studie festgestellten cfDNA-Freisetzung durch die langfristigen Effekte von regelmäßiger, sportlicher Aktivität nicht wahrscheinlich. Dennoch sind zur Verifizierung dieser Annahme weiterführende Studien nötig.

Die Probanden berichteten an den Testungstagen über Wohlbefinden, allerdings erfolgte keine klinische oder laborchemische Untersuchung auf Entzündungs- bzw. Infektionszeichen oder auf Verletzungen. In Anbetracht der bekannt erhöhten cfDNA-Konzentrationen im Rahmen von entzündlichen oder infektiösen Prozessen und nach Traumata stellt dies ein Versäumnis der vorliegenden Studie dar.

Die homogene Stichprobenszusammensetzung aus jungen Männern mit überwiegend hohem Bildungsgrad ist zudem nicht repräsentativ für die deutsche Gesamtbevölkerung. Der hohe Bildungsgrad innerhalb der Stichprobe ist am ehesten durch die verstärkte Werbung für die Studie an Universitäten zu begründen und stellt kein Einschlusskriterium dar. Es kann angenommen werden, dass die Studienteilnehmer angesichts ihres hohen Bildungsgrads im Vergleich zur deutschen Gesamtbevölkerung weniger mit Stress infolge von Arbeitslosigkeit und finanziellen Sorgen konfrontiert sind oder waren. Andererseits kann auch eine akademische

Laufbahn mit erheblichem Leistungsdruck und subjektiver Stressbelastung einhergehen.

Zur Erhebung der psychischen Symptome innerhalb der Stichprobe wurden ausschließlich subjektive Selbstbeurteilungsfragebögen angewandt. Hier sind Verzerrungen durch begrenztes Wissen über sich selbst, arbiträres Antwortverhalten oder Antworttendenzen wie soziale Erwünschtheit oder eine Tendenz zur Mitte bzw. zu Extremwerten möglich. Somit konnten trotz größter Sorgfalt nicht alle Angaben auf den Fragebögen zweifelsfrei verifiziert werden. Mittels eines strukturierten Interviews wäre womöglich eine differenziertere Betrachtung insbesondere psychischer Symptome möglich gewesen. Allerdings handelte es sich um eine bis dato psychisch unauffällige und gesunde Stichprobe, sodass die Anwendung mehrerer standardisierter und etablierter psychologischer Fragebögen für den Zweck dieser Studie ausreichen sollte.

Der Stichprobenumfang von  $N=28$  war zur Beantwortung der Fragestellung dieser Forschungsarbeit passend gewählt. Für weiterführende statistische Analysen wie z.B. Korrelationsanalysen mit psychologischen oder anderen physiologischen Parametern war die Stichprobenanzahl allerdings zu gering, was als limitierender Faktor angesehen werden kann. Zudem konnte die Herzfrequenz-Analyse aufgrund eines technischen Defekts der verwendeten Pulsuhr nur für eine reduzierte Fallzahl von  $N=22$  vorgenommen werden. Positiv ist wiederum zu vermerken, dass alle Probanden sowohl die Stress- als auch die Ruhetestung komplett durchliefen und es somit keine Dropouts gab.

Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit liegt in der Blutprobenanalytik. Hier wurden Plasmaproben verwendet, welche im Vergleich zu Serumproben die cfDNA-Konzentration in vivo besser repräsentieren (193). Zudem wurde durch Anwendung eines validierten cfDNA-Assays eine zuverlässige und kosteneffiziente Quantifizierung von cfDNA gewährleistet.

#### 5.4 Ausblick

In Anbetracht der zunehmenden Häufigkeit und Relevanz stressassoziierter physischer und psychischer Erkrankungen ist ein eingehendes und umfassendes Verständnis der Stressreaktion von erheblicher Bedeutung für unsere moderne Zeit und aktuelle sowie zukünftige Generationen. Die vorliegende Forschungsarbeit erbrachte den erstmaligen Nachweis eines signifikanten durch akuten psychosozialen

Stress induzierten Anstiegs der cfDNA-Konzentration im direkten Vergleich mit einer Ruhebedingung bei gesunden Probanden. Dieses Ergebnis sollte in weiterführenden Studien für alle Altersgruppen und für das weibliche Geschlecht überprüft werden. Bis dato fehlen systematischen Studien über den Effekt der Sexualhormone auf die cfDNA-Konzentration. Von Interesse ist weiterhin die gezielte Untersuchung der cfDNA-Konzentration im Blut von gesunden Probanden mit subjektiv erhöhtem Stresslevel sowie von Probanden, die unter einer stressassoziierten Erkrankung leiden. Hierfür bilden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine solide Grundlage und einen Vergleichswert. Bei entsprechender Stichprobengröße können Korrelationsanalysen zu psychologischen oder weiteren physiologischen Parametern ergänzt werden.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme, dass die cfDNA-Konzentration im Blut einen molekularen Marker für akuten psychosozialen Stress darstellt. Darüber hinaus könnte eine erhöhte basale cfDNA-Konzentration auf eine Prädisposition oder Manifestation einer stressassoziierten Erkrankung hindeuten. Zur weiteren Einordnung sind hier jedoch weitere Studien zum Effekt von chronischem Stress auf die basale cfDNA-Konzentration notwendig. Es sollte die langfristige Dynamik der cfDNA-Konzentration in Form von Längsschnittstudien erhoben werden. Insbesondere die Nachverfolgung von Probanden mit erhöhten basalen cfDNA-Konzentrationen ist von Relevanz. Hierbei sollten intra- und interindividuelle Schwankungen der cfDNA-Konzentration sowie potenzielle Einflussfaktoren, z.B. Ernährung, Schlaf und sportliche Aktivität, näher untersucht werden. Insbesondere der Einfluss von (regelmäßiger) sportlicher Aktivität auf die cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf psychosozialen Stress ist ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Studien. Ergänzend zu den Untersuchungen an Gesunden sind weitere Studien zur Dynamik der cfDNA-Konzentration in Reaktion auf akuten und chronischen Stress bei an einer stressassoziierten Erkrankung leidenden Probanden nötig. Weiterführend sollte untersucht werden, ob sich die cfDNA-Konzentration als Biomarker zur Detektion einer erhöhten Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung eignet. Aufgrund der fehlenden Spezifität der cfDNA erscheint hierzu ein Scoring-System zusammen mit weiteren Parametern sinnvoll. Zum aktuellen Stand der Forschung verbleibt offen, welche Parameter sich konkret eignen, so dass auch hierzu weitere Studien nötig sind. Die bisherigen Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die cfDNA-Konzentration als Parameter zur individuellen Therapiekontrolle eingesetzt

werden kann (21, 165). Dies sollte ebenfalls in Studien mit größerer Fallzahl für die bekannten stressassoziierten Erkrankungen verifiziert werden.

Die exakten Freisetzungsmechanismen von cfDNA in Reaktion auf akuten und chronischen Stress sowie die Kinetik der Freisetzung sind bis dato nicht vollständig geklärt. Dies gilt ebenso für die physiologische Funktion der cfDNA und deren Effekte auf den Organismus, so dass hier weiterhin großer Forschungsbedarf besteht. Die Beziehung zwischen cfDNA und inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-10 und TNF $\alpha$  in Reaktion auf Stress sollte näher untersucht werden.

Die in den bisherigen Studien zu cfDNA angewandte Methodik weist einige wesentliche Unterschiede auf, weshalb sich die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichen lassen. Weiterhin existieren Studien, die einander widersprechende Ergebnisse lieferten. Daher ist es essenziell, bei der Planung und Durchführung zukünftiger Studien standardisierte Methoden zur besseren Vergleichbarkeit und Interpretation der Ergebnisse zu etablieren und anzuwenden. Zudem können die Erkenntnisse bezüglich nukleärer cfDNA nicht auf die cf-mtDNA übertragen werden und umgekehrt, so dass es sinnvoll erscheint, zukünftig beide Formen von cfDNA zu bestimmen und miteinander zu vergleichen.

## 6 Zusammenfassung

Unsere moderne Gesellschaft ist durch eine stetige Zunahme der subjektiven Stressbelastung geprägt (1, 2). Sowohl akuter als auch chronischer psychosozialer Stress können das physiologische Gleichgewicht aus neuronalen, hormonellen und immunologischen Prozessen innerhalb des menschlichen Organismus stören und folglich zur Entstehung von psychischen und somatischen Krankheiten führen (6).

Daher besteht ein hohes wissenschaftliches Interesse am genauen Ablauf der physiologischen Stressreaktion, an den Mechanismen der Krankheitsentstehung in Reaktion auf psychosozialen Stress und ferner an der Etablierung eines geeigneten Biomarkers zur Detektion einer erhöhten Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung sowie zum Monitoring von deren Krankheitsverlauf und Therapieansprechen.

Die cfDNA stellt einen solchen potenziellen Biomarker für psychosozialen Stress dar. Die Freisetzung von cfDNA in Reaktion auf akuten psychosozialen Stress bei Gesunden wurde jedoch erst in zwei Studien untersucht mit divergierenden Resultaten

(25, 26). Zudem sind beide Studien durch das Fehlen einer ruhenden Kontrollgruppe, die keinerlei Stressoren ausgesetzt ist, limitiert. Die vorliegende Forschungsarbeit hatte das Ziel, diese Forschungslücke zu schließen.

Zur Umsetzung des Forschungsprojekts wurde bei einer Gesamtstichprobe von 28 gesunden, männlichen Probanden ein Cross-over-Studiendesign angewandt. Die Probanden durchliefen jeweils eine Stressbedingung in Form des TSST und eine Ruhebedingung. Zur Bestimmung der cfDNA-Konzentration wurde zu zwei Messzeitpunkten vor der jeweiligen Testbedingung und zu 9 Messzeitpunkten im Anschluss an die Testbedingung aus einem zuvor etablierten iv-Zugang Blut entnommen. Zudem erfolgten ein permanentes Monitoring der Herzfrequenz der Probanden via Pulsuhr und psychometrische Erhebungen (u.a. zum subjektiven Stressempfinden) mittels verschiedener Selbstbeurteilungsfragebögen.

Die vorliegende Forschungsarbeit konnte einen 1.8-fachen Anstieg der cfDNA-Konzentration als unmittelbare Folge der Stressinduktion durch den TSST nachweisen im Gegensatz zur Ruhebedingung. Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung erbrachte einen signifikanten Haupteffekt der Zeit und einen signifikanten Interaktionseffekt Testbedingung x Zeit. Die anschließenden Post-hoc-Vergleiche ergaben (höchst) signifikante Unterschiede zwischen Ruhe- und Stressbedingung für die Messzeitpunkte +1 min und + 5 min. Somit konnte gezeigt werden, dass bereits ein kurzer akuter psychosozialer Stressor ausreichend ist, um eine signifikante und schnelle cfDNA-Freisetzung zu verursachen.

Ob sich die cfDNA auch als Biomarker zur Detektion einer erhöhten Prädisposition zur Entwicklung einer stressassoziierten Erkrankung oder zum Monitoring von deren Krankheitsverlauf und Therapieansprechen eignet, kann anhand dieser Forschungsarbeit zur cfDNA-Freisetzung in Reaktion auf akuten Stress bei Gesunden zwar nicht beantwortet werden, doch liefern die berichteten Ergebnisse einen wertvollen Ansatzpunkt und Vergleichswert für folgende Studien zur cfDNA-Konzentration unter chronischem Stress und bei kranken Probanden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. BAuA. Stressreport Deutschland 2019: Psychische Anforderungen, Ressourcen und Befinden. Dortmund; 2020.
2. Hapke U, Maske UE, Scheidt-Nave C, Bode L, Schlack R, Busch MA. Chronischer Stress bei Erwachsenen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 2013;56(5-6):749-54.
3. Müller G, Bombana M, Heinzl-Gutenbrenner M, Kleindienst N, Bohus M, Lyssenko L, et al. Socio-economic consequences of mental distress: quantifying the impact of self-reported mental distress on the days of incapacity to work and medical costs in a two-year period: a longitudinal study in Germany. BMC Public Health. 2021;21(1).
4. Faller H, Lang H. Gesundheit- und Krankheitsmodelle. In: Faller H, Lang H, editors. Medizinische Psychologie und Soziologie. Berlin: Springer; 2019. p. 16-51.
5. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. Arch Intern Med. 1993;153(18):2093-101.
6. McEwen BS. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. Neuropsychopharmacology. 2000;22(2):108-24.
7. Roch S, Hampel P. Modelle von Gesundheit und Krankheit. In: Haring R, editor. Gesundheitswissenschaften. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 247-55.
8. Goddard AW. The Neurobiology of Panic: A Chronic Stress Disorder. Chronic Stress. 2017;1:247054701773603.
9. Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. Annu Rev Psychol. 1997;48:191-214.
10. Corcoran C, Gallitano A, Leitman D, Malaspina D. The neurobiology of the stress cascade and its potential relevance for schizophrenia. J Psychiatr Pract. 2001;7(1):3-14.
11. Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. Brain Behav Immun. 2007;21(7):901-12.
12. Rohleder N. Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems --2011 Curt Richter Award Winner. Psychoneuroendocrinology. 2012;37(3):307-16.
13. Chandola T, Brunner E, Marmot M. Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. Bmj. 2006;332(7540):521-5.

14. Rohleder N. Stress and inflammation - The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;105:164-71.
15. Wirtz PH, Von Känel R. Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. *Current Cardiology Reports*. 2017;19(11).
16. Andargie TE, Tsuji N, Seifuddin F, Jang MK, Yuen PS, Kong H, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury. *JCI Insight*. 2021;6(7).
17. 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.
18. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347-76.
19. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:502.
20. Stertz L, Fries GR, Rosa AR, Kauer-Sant'anna M, Ferrari P, Paz AV, et al. Damage-associated molecular patterns and immune activation in bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 2015;132(3):211-7.
21. Lindqvist D, Wolkowitz OM, Picard M, Ohlsson L, Bersani FS, Fernstrom J, et al. Circulating cell-free mitochondrial DNA, but not leukocyte mitochondrial DNA copy number, is elevated in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(7):1557-64.
22. Lindqvist D, Fernström J, Grudet C, Ljunggren L, Träskman-Bendz L, Ohlsson L, et al. Increased plasma levels of circulating cell-free mitochondrial DNA in suicide attempters: associations with HPA-axis hyperactivity. *Translational Psychiatry*. 2016;6(12):e971-e.
23. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical Care*. 2006;10(2):R60.
24. Lam NYL, Rainer TH, Chan LYS, Joynt GM, Lo YMD. Time Course of Early and Late Changes in Plasma DNA in Trauma Patients. *Clinical Chemistry*. 2003;49(8):1286-91.

25. Hummel EM, Hesses E, Muller S, Beiter T, Fisch M, Eibl A, et al. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):236.
26. Trumpff C, Marsland AL, Basualto-Alarcon C, Martin JL, Carroll JE, Sturm G, et al. Acute psychological stress increases serum circulating cell-free mitochondrial DNA. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;106:268-76.
27. Kultz D. Defining biological stress and stress responses based on principles of physics. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*. 2020;333(6):350-8.
28. Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*. 1936;138(3479):32.
29. Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J*. 1976;115(1):53-6.
30. Gerrig RJ. Stress und Gesundheit. In: Dörfler T, Roos J, editors. *Psychologie*. Hallbergmoos: Pearson; 2018. p. 497-533.
31. Dickerson SS, Kemeny ME. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull*. 2004;130(3):355-91.
32. McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:33-44.
33. Cannon WB. *The wisdom of the body*. New York: W. W. Norton; 1932.
34. Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1914;33(2):356-72.
35. Cannon WB. *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage*: D. Appleton and company; 1915.
36. Fink G. In retrospect: Eighty years of stress. *Nature*. 2016;539(7628):175-6.
37. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*. 1950;1(4667):1383-92.
38. Selye H. Stress and distress. *Compr Ther*. 1975;1(8):9-13.
39. Lazarus RS, Folkman S. *Stress, appraisal, and coping*. New York: Springer; 1984.
40. Sterling P, Eyer J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J, editors. *Handbook of life stress, cognition and health*. Oxford: John Wiley & Sons; 1988. p. 629-49.
41. Sterling P, Eyer J. Biological basis of stress-related mortality. *Social Science & Medicine Part E: Medical Psychology*. 1981;15(1):3-42.

42. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):367-81.
43. Berking M. Ursachen psychischer Störungen. In: Berking M, Rief W, editors. *Klinische Psychologie und Psychotherapie für Bachelor*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 19-28.
44. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):374-81.
45. Tank AW, Lee Wong D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol*. 2015;5(1):1-15.
46. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):397-409.
47. Galosy RA, Clarke LK, Vasko MR, Crawford IL. Neurophysiology and neuropharmacology of cardiovascular regulation and stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1981;5(1):137-75.
48. Jänig W, Baron R. Peripheres vegetatives Nervensystem. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. p. 879-91.
49. McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*. 2007;71(4):78.
50. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999;79(1):1-71.
51. Rivier CL, Plotsky PM. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:475-94.
52. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981;213(4514):1394-7.
53. Lee DY, Kim E, Choi MH. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep*. 2015;48(4):209-16.
54. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev*. 1984;5(1):1-24.
55. Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1971;33(1):14-22.
56. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*. 1986;7(3):284-301.

57. Chrousos GP. Organization and Integration of the Endocrine System: The Arousal and Sleep Perspective. *Sleep Medicine Clinics*. 2007;2(2):125-45.
58. Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, et al. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S508-18.
59. Komada H, Hirota Y, So A, Nakamura T, Okuno Y, Fukuoka H, et al. Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Before and After Surgical Treatment of Pheochromocytoma or Paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(9):3400-5.
60. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the Effects of Exercise, Training and Gender. *Sports Medicine*. 2008;38(5):401-23.
61. Ton QV, Hammes SR. Recent Insights on Circulating Catecholamines in Hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2014;16(12).
62. Birbaumer N, Schmidt RF. Endokrine Systeme. In: Birbaumer N, Schmidt RF, editors. *Biologische Psychologie*. Heidelberg: Springer; 2010. p. 117-40.
63. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions\*. *Endocrine Reviews*. 2000;21(1):55-89.
64. Lang F, Föller M. Nebennierenrindenhormone. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. p. 943-50.
65. Froesch ER, Winegrad AI, Renold AE, Thorn GW. Mechanism of the glucosuria produced by the administration of steroids with glucocorticoid activity. *Journal of Clinical Investigation*. 1958;37(4):524-32.
66. Brindley DN, Rolland Y. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 1989;77(5):453-61.
67. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. *Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids*. Springer New York; 2015. p. 99-126.
68. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*. 1997;23(1-2):79-133.
69. Wieggers GJ, Reul JMHM. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1998;19(8):317-21.

70. Krakoff LR. Glucocorticoid excess syndromes causing hypertension. *Cardiol Clin.* 1988;6(4):537-45.
71. Koch H-G, Brix J, Heinrich PC. Nucleinsäuren - Struktur und Funktion. Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie.* 10 ed: Heinrich, Peter C. Müller, Matthias Graeve, Lutz Koch, Hans-Georg 2022. p. 171-96.
72. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3.
73. Schutz E, Urnovitz HB, Iakoubov L, Schulz-Schaeffer W, Wemheuer W, Brenig B. Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(7):814-20.
74. Stroun M, Anker P. Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact. *Mol Gen Genet.* 1971;113(1):92-8.
75. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):181-232.
76. Moss J, Magenheim 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.
77. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966;45(11):1732-40.
78. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1980;66(6):1391-9.
79. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest.* 1973;52(1):198-204.
80. 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.
81. 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.

82. Pisetsky DS, Ullal AJ. The blood nucleome in the pathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev*. 2010;10(1):35-7.
83. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):806-11.
84. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(1):21-9.
85. 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.
86. Trumpff C, Michelson J, Lagranha CJ, Taleon V, Karan KR, Sturm G, et al. Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA: A systematic review of human studies, physiological considerations, and technical recommendations. *Mitochondrion*. 2021;59:225-45.
87. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61(4):1659-65.
88. Rostami A, Lambie M, Yu CW, Stambolic V, Waldron JN, Bratman SV. Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics. *Cell Rep*. 2020;31(13):107830.
89. Boyapati RK, Tamborska A, Dorward DA, Ho GT. Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Res*. 2017;6:169.
90. Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;Chapter 18:18 3 1- 3 23.
91. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1995;5(1):21-6.
92. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):12-8.
93. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23(6):707-12.
94. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering

from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 1995;91(2):221-7.

95. Holdenrieder S, Stieber P, Forg T, Kuhl M, Schulz L, Busch M, et al. Apoptosis in serum of patients with solid tumours. *Anticancer Res.* 1999;19(4A):2721-4.

96. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.

97. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63(14):3966-8.

98. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med.* 1996;2(9):1035-7.

99. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer.* 1983;51(11):2116-20.

100. Maebo A. Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1990;28(8):1085-91.

101. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):65-73.

102. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99-109.

103. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8(11):1812-25.

104. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol.* 1999;19(1):1-11.

105. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 2012;3:e338.

106. Tan HY, Yong YK, Shankar EM, Paukovics G, Ellegard R, Larsson M, et al. Aberrant Inflammasome Activation Characterizes Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *J Immunol.* 2016;196(10):4052-63.

107. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.

108. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, et al. Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol.* 2018;3(30).

109. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.

110. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
111. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE.* 2007;2007(379):pe11.
112. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014;8(3):883-96.
113. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
114. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med.* 2016;22(2):146-53.
115. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(3):R122.
116. Oklu R, Sheth RA, Wong KHK, Jahromi AH, Albadawi H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7(Suppl 3):S140-S9.
117. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
118. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 2012;188(7):3522-31.
119. Gahan PB, Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct.* 2010;28(7):529-38.
120. Adams DH, Gahan PB. The DNA extruded by rat spleen cells in culture. *Int J Biochem.* 1983;15(4):547-52.
121. Stroun M, Anker P, Beljanski M, Henri J, Lederrey C, Ojha M, et al. Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res.* 1978;38(10):3546-54.

122. Stroun M, Anker P. Transcription of spontaneously released bacterial deoxyribonucleic acid in frog auricles. *J Bacteriol.* 1973;114(1):114-20.
123. 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.
124. Cataldi S, Viola-Magni M. Components of the cytosolic and released virtosomes from stimulated and non-stimulated human lymphocytes. *Biochem Biophys Rep.* 2016;6:236-41.
125. Chistiakov DA, Chekhonin VP. Extracellular vesicles shed by glioma cells: pathogenic role and clinical value. *Tumour Biol.* 2014;35(9):8425-38.
126. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89.
127. Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res.* 2019;60(1):9-18.
128. Sharma A, Johnson A. Exosome DNA: Critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):1921-32.
129. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna).* 2010;117(1):1-4.
130. Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhoff C, Tholen E, et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187569.
131. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 2017;8:15287.
132. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014;24(6):766-9.
133. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014;289(7):3869-75.
134. Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp Cell Res.* 2009;315(5):760-8.

135. Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature*. 1963;198:1088-9.
136. Chused TM, Steinberg AD, Talal N. The clearance and localization of nucleic acids by New Zealand and normal mice. *Clin Exp Immunol*. 1972;12(4):465-76.
137. Gosse C, Le Pecq JB, Defrance P, Paoletti C. Initial degradation of deoxyribonucleic acid after injection in mammals. *Cancer Res*. 1965;25(6):877-83.
138. Napirei M, Wulf S, Mannherz HG. Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):1873-83.
139. Napirei M, Wulf S, Eulitz D, Mannherz HG, Kloeckl T. Comparative characterization of rat deoxyribonuclease 1 (Dnase1) and murine deoxyribonuclease 1-like 3 (Dnase1l3). *Biochem J*. 2005;389(Pt 2):355-64.
140. Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 1981;1(2):55-60.
141. Leffler J, Ciacma K, Gullstrand B, Bengtsson AA, Martin M, Blom AM. A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA from multiple clinically relevant sources. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:205.
142. Skiljevic D, Jeremic I, Nikolic M, Andrejevic S, Sefik-Bukilica M, Stojimirovic B, et al. Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(5):1083-91.
143. Bodano A, Amarelo J, Gonzalez A, Gomez-Reino JJ, Conde C. Novel DNASE I mutations related to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(12):4070-1.
144. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2001;28(4):313-4.
145. Frost PG, Lachmann PJ. The relationship of desoxyribonuclease inhibitor levels in human sera to the occurrence of antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1968;3(5):447-55.
146. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(12):4742-6.
147. Gaipf US, Beyer TD, Heyder P, Kuenkele S, Bottcher A, Voll RE, et al. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):640-9.

148. Stephan F, Marsman G, Bakker LM, Bulder I, Stavenuiter F, Aarden LA, et al. Cooperation of factor VII-activating protease and serum DNase I in the release of nucleosomes from necrotic cells. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(3):686-93.
149. Sisirak V, Sally B, D'Agati V, Martinez-Ortiz W, Ozcakar ZB, David J, et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell.* 2016;166(1):88-101.
150. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.
151. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(6):757-67.
152. Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhuth HH, Northoff H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol (1985).* 2000;89(2):704-10.
153. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem.* 2004;50(9):1668-70.
154. 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. *Eur J Appl Physiol.* 2008;104(4):711-7.
155. Goodman C, Henry G, Dawson B, Gillam I, Beilby J, Ching S, et al. Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a twenty-one kilometre run. *Aust J Sci Med Sport.* 1997;29(4):95-8.
156. 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.
157. 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. *Clin Chem.* 2011;57(4):633-6.
158. Helmig S, Fruhbeis C, Kramer-Albers EM, Simon P, Tug S. Release of bulk cell free DNA during physical exercise occurs independent of extracellular vesicles. *Eur J Appl Physiol.* 2015;115(11):2271-80.
159. 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.

160. Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, Tschan H. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2010;110(4):695-701.
161. 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.
162. Margeli A, Skenderi K, Tsironi M, Hantzi E, Matalas AL, Vrettou C, et al. Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):3914-8.
163. Shockett PE, Khanal J, Sitaula A, Oglesby C, Meachum WA, Castracane VD, et al. Plasma cell-free mitochondrial DNA declines in response to prolonged moderate aerobic exercise. *Physiol Rep*. 2016;4(1).
164. Nasi M, Cristani A, Pinti M, Lamberti I, Gibellini L, De Biasi S, et al. Decreased Circulating mtDNA Levels in Professional Male Volleyball Players. *Int J Sports Physiol Perform*. 2016;11(1):116-21.
165. Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Levitas E, Lunenfeld E, Douvdevani A, et al. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Arch Womens Ment Health*. 2014;17(3):251-3.
166. Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E, et al. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(1):36-41.
167. 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.
168. Hellhammer J, Schubert M. The physiological response to Trier Social Stress Test relates to subjective measures of stress during but not before or after the test. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(1):119-24.
169. Kudielka B, Hellhammer D, Kirschbaum C. Ten years of research with the Trier Social Stress Test—revisited. In: Harmon-Jones E, Winkielman P, editors. *Social Neuroscience: Integrating Biological and Psychological Explanations of Social Behavior*: The Guilford Press; 2007. p. 56-83.

170. Laux L, Glanzmann P, Schaffner P, Spielberger CD. Das State-Trait-Angstinventar. Weinheim: Beltz Test GmbH; 1981.
171. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. Palo Alto: Consulting Psychologists Press; 1970.
172. Gaab J. PASA - Primary Appraisal Secondary Appraisal. Verhaltenstherapie. 2009;19(2):114-5.
173. Derogatis LR. Administration, scoring and procedures manual-I for the R(evised) version. Baltimore: Johns Hopkins University School of Medicine: Clinical Psychometric Research; 1977.
174. Franke GH. Symptom-Checkliste von L. R. Derogatis - Deutsche Version - Manual. Göttingen: Beltz; 2002.
175. Frey I, Berg A, Grathwohl D, Keul J. Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität-Entwicklung, Prüfung und Anwendung. Sozial- und Präventivmedizin SPM. 1999;44(2):55-64.
176. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. Arch Gen Psychiatry. 1961;4:561-71.
177. Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. J Health Soc Behav. 1983;24(4):385-96.
178. Schulz P, Schlotz W, Becker P. Trierer Inventar zum chronischen Stress. Göttingen: Hoegrefe; 2004.
179. Reiss S, Peterson RA, Gursky DM, McNally RJ. Anxiety sensitivity, anxiety frequency and the prediction of fearfulness. Behav Res Ther. 1986;24(1):1-8.
180. Smith BW, Dalen J, Wiggins K, Tooley E, Christopher P, Bernard J. The brief resilience scale: assessing the ability to bounce back. Int J Behav Med. 2008;15(3):194-200.
181. Mason JW. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. Psychosom Med. 1968;30(5):Suppl:631-53.
182. Beck AT, Steer RA, Carbin MG. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. Clinical Psychology Review. 1988;8(1):77-100.
183. Wintjen L, Petermann F. Beck-Depressions-Inventar Revision (BDI-II). Zeitschrift für Psychiatrie, Psychologie und Psychotherapie. 2010;58(3):243-5.
184. Klein EM, Brähler E, Dreier M, Reinecke L, Müller KW, Schmutzer G, et al. The German version of the Perceived Stress Scale – psychometric characteristics in a representative German community sample. BMC Psychiatry. 2016;16(1).

185. Kemper CJ, Ziegler M, Taylor S. Überprüfung der psychometrischen Qualität der deutschen Version des Angstsensitivitätsindex-3. *Diagnostica*. 2009;55(4):223-33.
186. Neuberger EW, Brahmer A, Ehlert T, Kluge K, Philipp KFA, Boedecker SC, et al. Validating quantitative PCR assays for cfDNA detection without DNA extraction in exercising SLE patients. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
187. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, Leszinski GS, Siegele B, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*. 2011;412(23-24):2085-8.
188. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the isolation of cell-free DNA from cell culture supernatant. *Tumor Biology*. 2020;42(4):101042832091631.
189. Tarvainen MP, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA. An advanced detrending method with application to HRV analysis. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2002;49(2):172-5.
190. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84.
191. Liu JJW, Ein N, Peck K, Huang V, Pruessner JC, Vickers K. Sex differences in salivary cortisol reactivity to the Trier Social Stress Test (TSST): A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;82:26-37.
192. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol*. 2005;69(1):113-32.
193. Martignano F. Cell-Free DNA: An Overview of Sample Types and Isolation Procedures. *Methods Mol Biol*. 2019;1909:13-27.
194. 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.
195. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1):1028-9.
196. 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. *Clin Chem*. 2006;52(9):1820-4.
197. Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(2):366-70.

198. Mooren FC, Blöming D, Lechtermann A, Lerch MM, Völker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2002;93(1):147-53.
199. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5119-23.
200. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:66-89.
201. Goldstein JC, Kluck RM, Green DR. A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;926:132-41.
202. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2020;85(10):1178-90.
203. 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, Behavior, and Immunity*. 2017;64:208-19.
204. Marshall GD, Jr., Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun*. 1998;12(4):297-307.
205. Pedersen BK, Steensberg A. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6-shared mechanisms? *Med Sci Sports Exerc*. 2002;34(12):2004-13.
206. Malkin EZ, Bratman SV. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death Dis*. 2020;11(7):584.
207. Neuberger EW, Hillen B, Mayr K, Simon P, Krämer-Albers EM, Brahmer A. Kinetics and Topology of DNA Associated with Circulating Extracellular Vesicles Released during Exercise. *Genes (Basel)*. 2021;12(4).
208. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;906:161-8.
209. 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.
210. Filev AD, Shmarina GV, Ershova ES, Veiko NN, Martynov AV, Borzikova MA, et al. Oxidized Cell-Free DNA Role in the Antioxidant Defense Mechanisms under Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:1-13.
211. Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. *Jama*. 2007;298(14):1685-7.

212. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342(12):836-43.
213. Melamud MM, Buneva VN, Ermakov EA. Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(4):3402.
214. Ermakov EA, Melamud MM, Buneva VN, Ivanova SA. Immune System Abnormalities in Schizophrenia: An Integrative View and Translational Perspectives. *Frontiers in Psychiatry.* 2022;13.
215. Karageorgiou V, Milas GP, Michopoulos I. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res.* 2019;206:4-12.
216. Mazza MG, Lucchi S, Rossetti A, Clerici M. Neutrophil-lymphocyte ratio, monocyte-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in non-affective psychosis: A meta-analysis and systematic review. *World J Biol Psychiatry.* 2020;21(5):326-38.
217. Gassó P, Mas S, Molina O, Lafuente A, Bernardo M, Parellada E. Increased susceptibility to apoptosis in cultured fibroblasts from antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia patients. *J Psychiatr Res.* 2014;48(1):94-101.
218. Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *Am J Psychiatry.* 2004;161(1):109-15.
219. Ermakov EA, Dmitrieva EM, Parshukova DA, Kazantseva DV, Vasilieva AR, Smirnova LP. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021;2021(1):1-37.
220. Ershova ES, Shmarina GV, Porokhovnik LN, Zakharova NV, Kostyuk GP, Umriukhin PE, et al. In Vitro Analysis of Biological Activity of Circulating Cell-Free DNA Isolated from Blood Plasma of Schizophrenic Patients and Healthy Controls. *Genes.* 2022;13(3):551.
221. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):95-112.
222. Kumar V. The Trinity of cGAS, TLR9, and ALRs Guardians of the Cellular Galaxy Against Host-Derived Self-DNA. *Front Immunol.* 2020;11:624597.
223. Shmarina GV, Ershova ES, Simashkova NV, Nikitina SG, Chudakova JM, Veiko NN, et al. Oxidized cell-free DNA as a stress-signaling factor activating the chronic

inflammatory process in patients with autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*. 2020;17(1).

224. Deuschle M, Schweiger U, Weber B, Gotthardt U, Körner A, Schmider J, et al. Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):234-8.

225. Ding Y, Dai J. *Advance in Stress for Depressive Disorder*. Springer Singapore; 2019. p. 147-78.

226. Jehn CF, Kühnhardt D, Bartholomae A, Pfeiffer S, Schmid P, Possinger K, et al. Association of IL-6, Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Function, and Depression in Patients With Cancer. *Integrative Cancer Therapies*. 2010;9(3):270-5.

227. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(6):1690-4.

228. Miller AH, Pariante CM, Pearce BD. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. *Adv Exp Med Biol*. 1999;461:107-16.

229. Petrowski K, Herold U, Joraschky P, Wittchen H-U, Kirschbaum C. A striking pattern of cortisol non-responsiveness to psychosocial stress in patients with panic disorder with concurrent normal cortisol awakening responses. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(3):414-21.

230. Petrowski K, Wintermann G, Joraschky P, Siepmann M. HPA axis activity under psychosocial stress in patients with acute and remitted panic disorder. *German Journal of Psychiatry*. 2011;14:72-9.

231. Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM, Kirschbaum C. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2004;55(7):745-51.

232. Petrowski K, Wintermann G-B, Schaarschmidt M, Bornstein SR, Kirschbaum C. Blunted salivary and plasma cortisol response in patients with panic disorder under psychosocial stress. *International Journal of Psychophysiology*. 2013;88(1):35-9.

233. Fries E, Hesse J, Hellhammer J, Hellhammer DH. A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(10):1010-6.

234. Blalock ZN, Wu GWY, Lindqvist D, Trumpff C, Flory JD, Lin J, et al. Circulating cell-free mitochondrial DNA levels and glucocorticoid sensitivity in a cohort of male veterans with and without combat-related PTSD. *Transl Psychiatry*. 2024;14(1):22.

235. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
236. Krishnan J, Hennen EM, Ao M, Kirabo A, Ahmad T, De La Visitación N, et al. NETosis Drives Blood Pressure Elevation and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Circulation Research*. 2024.
237. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(8):2032-40.
238. Capistrant BD, Moon JR, Berkman LF, Glymour MM. Current and long-term spousal caregiving and onset of cardiovascular disease. *J Epidemiol Community Health*. 2012;66(10):951-6.
239. Lee S, Colditz GA, Berkman LF, Kawachi I. Caregiving and risk of coronary heart disease in U.S. women. *American Journal of Preventive Medicine*. 2003;24(2):113-9.
240. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):9090-5.
241. Clark MC, Nicholas JM, Wassira LN, Gutierrez AP. Psychosocial and biological indicators of depression in the caregiving population. *Biol Res Nurs*. 2013;15(1):112-21.
242. Baumeister D, Akhtar R, Ciufolini S, Pariante CM, Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Molecular Psychiatry*. 2016;21(5):642-9.
243. Kiecolt-Glaser JK, Gouin J-P, Weng N-P, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Glaser R. Childhood Adversity Heightens the Impact of Later-Life Caregiving Stress on Telomere Length and Inflammation. *Psychosomatic Medicine*. 2011;73(1):16-22.
244. O'Donnell K, Brydon L, Wright CE, Steptoe A. Self-esteem levels and cardiovascular and inflammatory responses to acute stress. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2008;22(8):1241-7.
245. Brydon L, Strike PC, Bhattacharyya MR, Whitehead DL, McEwan J, Zachary I, et al. Hostility and physiological responses to laboratory stress in acute coronary syndrome patients. *Journal of Psychosomatic Research*. 2010;68(2):109-16.

246. Brydon L, Edwards S, Mohamed-Ali V, Steptoe A. Socioeconomic status and stress-induced increases in interleukin-6. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2004;18(3):281-90.
247. Hamer M, Williams E, Vuonovirta R, Giacobazzi P, Gibson EL, Steptoe A. The effects of effort-reward imbalance on inflammatory and cardiovascular responses to mental stress. *Psychosom Med*. 2006;68(3):408-13.
248. Ranjit N. Psychosocial Factors and Inflammation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Archives of Internal Medicine*. 2007;167(2):174.
249. Black DS, Cole SW, Irwin MR, Breen E, St. Cyr NM, Nazarian N, et al. Yogic meditation reverses NF- $\kappa$ B and IRF-related transcriptome dynamics in leukocytes of family dementia caregivers in a randomized controlled trial. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(3):348-55.
250. Laudenslager ML, Simoneau TL, Philips S, Benitez P, Natvig C, Cole S. A randomized controlled pilot study of inflammatory gene expression in response to a stress management intervention for stem cell transplant caregivers. *Journal of Behavioral Medicine*. 2016;39(2):346-54.
251. Brydon L, Steptoe A. Stress-induced increases in interleukin-6 and fibrinogen predict ambulatory blood pressure at 3-year follow-up. *J Hypertens*. 2005;23(5):1001-7.
252. Ellins E, Halcox J, Donald A, Field B, Brydon L, Deanfield J, et al. Arterial stiffness and inflammatory response to psychophysiological stress. *Brain Behav Immun*. 2008;22(6):941-8.
253. Humardani FM, Mulyanata LT, Dwi Putra SE. Adipose cell-free DNA in diabetes. *Clin Chim Acta*. 2023;539:191-7.
254. Petrowski K, Wintermann GB, Siepmann M. Cortisol response to repeated psychosocial stress. *Appl Psychophysiol Biofeedback*. 2012;37(2):103-7.
255. 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.
256. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.
257. Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*. 2016;590(1):142-8.

258. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(1):218-24.
259. Debono M, Ghobadi C, Rostami-Hodjegan A, Huatan H, Campbell MJ, Newell-Price J, et al. Modified-release hydrocortisone to provide circadian cortisol profiles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1548-54.
260. Krieger DT, Allen W, Rizzo F, Krieger HP. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1971;32(2):266-84.
261. Cannizzaro E, Cirrincione L, Mazzucco W, Scorciapino A, Catalano C, Ramaci T, et al. Night-Time Shift Work and Related Stress Responses: A Study on Security Guards. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(2).
262. 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).

## 8 Danksagung

## 9 Tabellarischer Lebenslauf