

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

**Etablierung einer Grundlage
für den molekularen Nachweis
von Mikroverletzungen des Weichgewebes
durch
zellfreie zirkulierende DNA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katrin Brodbeck
aus Aichach

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Dipl.-Ing. Steffen Peldschus

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Augat

Prof. Dr. Matthias Pietschmann

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Sylvia Schick M.P.H. postgrad.

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2021

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Brodbeck, Katrin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
„Etablierung einer Grundlage für den molekularen Nachweis von Mikroverletzungen des
Weichgewebes durch zellfreie zirkulierende DNA“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht
wurde.

München, 01.04.2021

Ort, Datum

Katrin Brodbeck

Unterschrift Doktorandin

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 4a der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative Dissertation gestaltet.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	1
Publikationsliste	2
1 Zusammenfassung	4
2 Abstract	6
3 Einleitung	8
3.1 Inhalt und Ziel der Arbeit	8
3.2 Bagatellverletzungen der Haut: Hämatome	11
3.2.1 Einflussfaktoren der Hämatom-Entstehung	12
3.2.2 Die Bedeutung von Hämatomen für Forensik und Industrie	13
3.2.3 Herausforderungen bei der Analyse der Hämatom-Entstehung	15
3.3 Zellfreie zirkulierende DNA als Trauma-Biomarker	18
3.3.1 Freisetzung, Funktion und Abbau	18
3.3.2 Basislevel	20
3.3.3 Änderungen des Basislevels als Diagnostikmöglichkeit	21
3.3.4 Die Bedeutung von cfDNA in Verletzungsgeschehen - Stand der Forschung ..	22
3.3.5 Limitierungen der aktuellen cfDNA-Forschung	24
4 Publierte Ergebnisse	26
4.1 Eigener Beitrag an Veröffentlichungen	26
4.2 Originalmanuskripte	27
4.2.1 Veröffentlichung I	27
4.2.2 Veröffentlichung II	28
4.3 Diskussion der Ergebnisse	29
Abbildungsverzeichnis	33
Literaturverzeichnis	33
Danksagung	44

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIS	Abbreviated Injury Scale
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
bp	Basenpaare
cfDNA	zellfreie zirkulierende DNA
DAMP	Danger assoicated molecular pattern
engl.	englisch
GCS	Glasgow Coma Scale
ISS	Injury Severity Score
min	Minuten
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NIPT	Non-invasive Prenatale Testing
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
UV	ultraviolett

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

Brodbeck K, Schick S, Bayer B, Anslinger K, Krüger K, Mayer Z, Holdenrieder S, Peldschus S (2020) Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course. *International Journal of Legal Medicine* 134 (3): 911-919. doi.org/10.1007/s00414-019-02240-9

Brodbeck K, Nuspl E, Ertelt-Delbridge C, Graw M, Peldschus S, Schick S (2019) Post-mortem-Nachweis diffuser Axonschäden durch Immunhistochemie. *Rechtsmedizin* 29 (5): 400-406. doi.org/10.1007/s00194-019-00339-2

Brodbeck K, Nuspl E, Ertelt-Delbridge C, Graw M, Peldschus S, Schick S (2019) Immunhistochemischer Nachweis diffuser Axonschäden in Verkehrsunfalltoten und Sturzopfern. *Zeitschrift für Verkehrssicherheit* 65 (2): 128-129

Brodbeck K, Kern S, Schick S, Steinbrück A, Schwerer M, Bayer B, Anslinger K, Peldschus S (2018) Quantitative analysis of individual cell-free DNA concentration before and after penetrating trauma. *International Journal of Legal Medicine* 133 (2): 385-393. doi.org/10.1007/s00414-018-1945-y

Konferenzbeiträge

Brodbeck K, Schick S, Mayer Z, Peldschus S, Holdenrieder S. Biological and preanalytical variations of cfDNA concentration in individuals. 11th CNAPS International Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, Jerusalem, 2019

Brodbeck K, Schick S, Steinbrück A, Graw M, Peldschus S. Qualitative und quantitative Analyse Zellfreier-DNA vor und nach Trauma mittels Kapillarelektrophorese. 98. Internationale Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Hamburg, 2019

Brodbeck K, Lanzl F, Mühlbauer J, Schick S, Graw M, Peldschus S. Experimentelle Erzeugung von subkutanen Hämatomen in Freiwilligen durch unterschiedliche Impaktorgeometrien. 98. Internationale Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Hamburg, 2019

Brodbeck K, Kern S, Schick S, Steinbrück A, Schwerer M, Bayer B, Anslinger K, Peldschus S. Quantification of individual pre- to post trauma alterations in cell-free DNA concentration. 27. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM, Region Süd), Paris, 2018

Brodbeck K, Nuspl E, Ertelt-Delbridge C, Graw M, Peldschus S, Schick S. Immunhistochemischer Nachweis diffuser Axonschäden in Verkehrsunfalltoten und Sturzopfern. 14. Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin e. V. (DGVM) und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie e. V. (DGVP), Saarbrücken, 2018

1 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenwärtige Forschung im Bereich der Traumabiomechanik beschäftigt sich u. a. mit der Beschreibung kritischer Belastungen des oberflächlichen Weichgewebes sowie mit der daraus resultierenden Definition physikalischer Grenzwerte für die Entstehung von sogenannten Bagatellverletzungen, wie subkutanen Hämatomen. Um in Zukunft im Rahmen von Fallkörperversuchen mit Freiwilligen Toleranzgrenzen des Weichgewebes zu untersuchen und hierbei einen kausalen Zusammenhang zwischen mechanischer Belastung und induzierter Verletzung herstellen zu können, ist ein zuverlässiger Verletzungsnachweis unmittelbar nach dem experimentellen Trauma erforderlich. Da subkutane Hämatome oftmals mit dem Auge nicht erkennbar sind und herkömmliche diagnostische Methoden für ihre Detektion nicht ausreichen, wird ein neuer innovativer Ansatz benötigt. Die molekulare Analyse der cfDNA stellt in diesem Zusammenhang eine potentielle Nachweismethode dar, da sich nach schwerem Trauma im Blut erhöhte Konzentrationen der extrazellulären Nukleinsäure einstellen. Nichtsdestotrotz weist der damit assoziierte Forschungsstand Lücken auf, weshalb zunächst bestimmte Voraussetzungen für eine Anwendung der cfDNA als Biomarker für Bagatellverletzungen geprüft werden müssen. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war es daher, eine Grundlage für den molekularen Nachweis von diskreten Weichgewebeverletzungen durch cfDNA zu etablieren.

Da bisherige Studien erhöhte cfDNA-Level in Schwerverletzten auf Basis von Vergleichswerten mit denen einer gesunden Kontrollgruppe ermittelten, sollte im Rahmen des ersten Teilprojektes zunächst festgestellt werden, inwiefern es überhaupt möglich ist, vor und nach schwerem Trauma intraindividuell Konzentrationsänderungen nachzuweisen. Dafür wurde ein Studiendesign entwickelt, welches es erlaubt, cfDNA im Rahmen eines unter relativ einheitlichen Bedingungen induzierten schweren Traumas zu untersuchen und dabei die Konzentration zu bestimmten Zeitpunkten vor und nach Verletzungseintritt zu messen. Das cfDNA-Level wurde hierfür in zehn Patienten, welche eine Knie- oder Hüftendoprothetik-Operation erhielten, quantitativ durch qPCR am Tag vor der Operation, direkt nach dem Eingriff (Tag 0) sowie am Tag darauf (Tag 1) bestimmt. Obwohl deutliche interindividuelle Unterschiede im präoperativen Basiswert festgestellt wurden, konnte in allen Patienten nach der Operation eine Konzentrationszunahme beobachtet werden. Das cfDNA-Level war an beiden postoperativen Tagen signifikant erhöht (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p = 0,002$), wobei an Tag 0 ein maximaler Anstieg auf das 19-fache des Ausgangswertes verzeichnet wurde. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde vertieftes Wissen über die

Größenordnung von individuellen Konzentrationsanstiegen nach schwerem Trauma erlangt, wodurch ein möglicher Anhaltspunkt für zukünftige Studien mit Fokus auf diskretem Trauma geschaffen wurde.

Zielsetzung des zweiten Teilprojektes war es, die intraindividuelle biologische Variabilität der cfDNA über die Zeit durch qPCR zu analysieren und in Folge den natürlichen Schwankungsbereich des Biomarkers zu definieren, um anhand dessen Konzentrationsanstiege aufgrund eines diskreten Traumas von natürlichen Fluktuationen abgrenzen zu können. Des Weiteren sollte die natürliche cfDNA-Varianz mit der der klinisch etablierten Marker CK und AST verglichen werden. Hierfür wurde eine Freiwilligenstudie mit 14 weiblichen Teilnehmern, welche zwischen 20 und 30 Jahre alt waren, durchgeführt, wodurch interindividuelle Einflüsse aufgrund von demographischen Faktoren begrenzt waren. Den Probanden wurde innerhalb von 75 Minuten zu bestimmten Zeitpunkten Blut über eine Venenverweilkanüle abgenommen. In einem vorangegangenen Nebenprojekt wurde ad hoc der präanalytische Einfluss der Blutentnahme über eine liegende Kanüle ermittelt, weshalb diesbezüglich ein optimiertes Protokoll angewandt werden konnte. Die Ergebnisse der Hauptstudie zeigen eine größere Schwankungsbreite des cfDNA-Levels verglichen mit dem der CK und AST. Der Interdezilbereich ihrer relativen Änderung zum direkt nach der Venenpunktion ermittelten 0min-Wert reicht von 0,5 bis 1,4, wobei ein maximaler Anstieg auf das 1,6-fache bei 10min beobachtet wurde. Kein Zusammenhang konnte zwischen dem cfDNA-Level und individuellen Faktoren wie z. B. Puls oder Blutdruck ermittelt werden.

Die vorliegende Dissertation präsentiert eine umfassende Analyse der individuellen cfDNA-Variabilität über die Zeit sowohl im Kontext eines schweren Traumas als auch in gesunden Freiwilligen in Ruhe. Einheitliche Versuchsbedingungen sowie standardisierte Verfahren hinsichtlich präanalytischer und analytischer Arbeitsmethoden waren dabei die Basis detaillierter Ergebnisse. Die Arbeit stellt somit die Grundlage einer zukünftigen Anwendung der cfDNA für den Nachweis von Bagatellverletzungen in experimentellen Belastungsversuchen mit Freiwilligen dar. Ob sich dabei ein Konzentrationsanstieg aufgrund des experimentellen Traumas von der natürlichen Schwankung abgrenzen lässt und folglich die cfDNA als Biomarker für die Detektion diskreter Weichgewebeverletzungen verwendet werden kann, kann nun in Folgestudien überprüft werden.

2 ABSTRACT

One aim in forensic biomechanical research is the description of mechanical tolerances of superficial soft tissues and the resulting identification of load limits for the development of minor injuries such as subcutaneous hematomas. To analyse tolerance limits of soft tissues, biomechanical experiments with volunteers exposed to low-severity impacts can be applied. However, in order to establish a causal relation between mechanical loadings and induced minor soft tissue injuries during these experiments, a reliable proof of potentially occurred tissue disruptions is required directly after the experiment. Since subcutaneous hematomas often remain apparently invisible and conventional diagnostic methods proved to be insufficient for their detection, a new innovative approach is needed. In this context, the molecular analysis of cfDNA represents a potential minor injury detection method, as increased concentrations of extracellular nucleic acids have been demonstrated in the blood plasma of severely injured persons. Nevertheless, there are gaps in the state of research on cfDNA, wherefore certain requirements for its application as biomarker for minor injuries must first be examined. The aim of the here presented PhD thesis was therefore to establish a basis for the molecular detection of minor soft tissue injuries by cfDNA.

Since previously published cfDNA elevations of severely injured patients refer to comparative values with those of a healthy control group neglecting thereby individual variances in the basic level, the aim of the initial study was thus to examine intra-individual concentration increases before and after severe trauma. A study design was developed which offers the biomarker analysis at defined points before and after a severe penetrating trauma, wherefore cfDNA concentrations were determined quantitatively by qPCR in ten patients obtaining knee or hip endoprosthetic surgery. Blood drawings were performed the day prior to surgery, directly afterwards (day 0) as well as the day after the orthopaedic intervention (day 1). Although significant inter-individual differences were observed for the preoperative basic level, an increase in concentration was detected in all patients on day 0 and day 1. The elevation was significant for both postoperative days (Wilcoxon sign rank test, $p = 0.002$), whereby a maximum fold change of 19 was remarked on day 0. Based on these results, an in-depth knowledge about the magnitude of individual concentration increases after severe trauma was gained, providing thus a reference for future studies focusing also on minor trauma.

The aim of the second project was to analyse the intra-individual biological variability of cfDNA over time using qPCR by means of which concentration increases due to minor trauma should be distinguished from natural fluctuations in future studies. The variability of cfDNA should be moreover compared with those of the clinically established markers CK and AST. For this purpose, a volunteer study was conducted with 14 female participants aged between 20 and 30 years to limit potential inter-individual influences by demographic factors. Serial blood drawings were performed within 75 minutes via an indwelling venous cannula. In a preceding side project, the pre-analytical influence of blood collection with the help of a permanent catheter was determined ad hoc, wherefore an optimized protocol could be applied in the main study. Results demonstrated a greater variation of the cfDNA level compared to CK and AST. The interdecile range of cfDNA-changes, evaluated in relation to the 0min value directly after the venipuncture, was from 0.5 to 1.4 with a maximum fold change of 1.6 measured at 10 min. No correlation was found between the cfDNA level and individual factors such as pulse or blood pressure.

This work presents a comprehensive analysis of the individual cfDNA variability over time both in the context of severe trauma and in healthy volunteers at rest. Controlled experiment conditions as well as standardized preanalytical and analytical procedures built the framework for the detailed results. The work thus provides the basis for a future application of cfDNA for the detection of minor injuries in experimental impact testing with volunteers. Whether a concentration increase due to an induced low-severity trauma can finally be distinguished from the natural fluctuation, and thus the cfDNA can be used as a biomarker for the diagnosis of minor soft tissue injury, can now be examined in follow-up studies.

3 EINLEITUNG

3.1 INHALT UND ZIEL DER ARBEIT

Die Verletzungs- oder Traumabiomechanik, stellt einen Forschungsschwerpunkt dar, welcher die Verletzungsentstehung durch mechanische Einwirkung fokussiert. Im Rahmen dieses interdisziplinären Fachbereichs beschäftigen sich Experten unter anderem aus der Mechanik, Biologie, Ergonomie und Medizin mit der Betrachtung und Analyse von verschiedenen Verletzungsmechanismen, kritischen Belastungen des menschlichen Körpers sowie mit Verletzungsmustern auf makroskopischer und zellulärer Ebene.

An der LMU München ist die Abteilung für Biomechanik und Unfallforschung am Institut für Rechtsmedizin angesiedelt. Die wissenschaftliche Forschung der Arbeitsgruppe beschäftigt sich u. a. mit dem Materialverhalten anatomischer Strukturen unter mechanischer Belastung, wie Zug, Druck oder Torsion. Das daraus resultierende Ziel ist die Ableitung und Definition von Grenzwerten für den Verletzungseintritt in unterschiedlichen Lastfällen. Die Kenntnis der Toleranzgrenzen stellt dabei die Grundlage für die Herleitung von Verletzungsgeschehen dar, wobei es sich im rechtsmedizinischen Bereich vor allem um die Rekonstruktion von Straßenverkehrsunfällen und Gewaltdelikten handelt.

Um Grenzwerte für den Verletzungseintritt quantitativ beschreiben zu können, ist es unerlässlich, verletztes Gewebe zu detektieren und zuverlässig von intakten Strukturen abzugrenzen. Während diese Anforderung beispielsweise in Post-mortem-Belastungsversuchen zur Ermittlung von Frakturkräften sowohl durch die Möglichkeit der augenscheinlichen wie auch der röntgenstrahlenbasierten Untersuchung des Knochens (oder Knochenpräparates) umfassend erfüllt ist, stellt die Detektion oberflächlicher, diskreter Weichgewebeverletzungen in vivo eine Herausforderung an die Wissenschaft dar. Insbesondere bei Fallkörperversuchen an Probanden, bei denen ein leichtes Trauma experimentell erzeugt wird, ist der Nachweis kleiner Gefäßrupturen unmittelbar nach Verletzungseintritt problematisch, da die Bildung eines subkutanen Hämatoms als Folge der Blutleckage mit der Zeit erfolgt und somit seine augenscheinliche Sichtbarkeit verzögert sein kann.

Die blutbasierte molekulare Analyse des Biomarkers „zellfreie zirkulierende DNA“ (cfDNA) könnte potenziell eine Nachweismöglichkeit diskreter Weichgewebeverletzungen darstellen. Bevor jedoch die diagnostische Eigenschaft der cfDNA in diesem Kontext ermittelt werden kann, muss zunächst überprüft werden, ob sie gewisse Voraussetzungen für die Detektion von Bagatellverletzungen unmittelbar nach Trauma erfüllt. Dabei muss zunächst die Nachweisbarkeit von intraindividuellen Konzentrationsänderungen im Rahmen eines schweren Traumas gegeben sein (1). Weiterführend sollte die cfDNA eine geringe biologische Varianz aufweisen, damit auch minimale Konzentrationsänderungen aufgrund eines leichten Traumas von denen einer natürlichen Schwankung abgegrenzt werden können (2). Die vorliegende Dissertation hat somit das **Ziel, anhand prospektiv erhobener Daten eine Grundlage für den molekularen Nachweis von diskreten Weichgewebeverletzungen durch cfDNA zu etablieren**. Die Promotion basiert dabei auf zwei Fachartikeln, welche im Rahmen eines peer-review Verfahrens im *International Journal of Legal Medicine* veröffentlicht wurden:

- (1) Zielsetzung des ersten Teilprojektes war es, erstmals intraindividuelle cfDNA-Konzentrationsänderungen vor und nach schwerem Trauma nachzuweisen. Hierfür sollte in Kooperation mit dem Orthopäden Dr. med. Arnd Steinbrück ein Studien-Setup entwickelt werden, das es ermöglicht, cfDNA im Rahmen eines definierten schweren Traumas zu untersuchen und dabei individuelle Konzentrationsänderungen in einer Person vor und nach Verletzungseintritt zu messen. Auf Basis dessen sollte Erkenntnis über die Größenordnung von Konzentrationsanstiegen nach schwerem Trauma unter möglichst einheitlichen und definierten Verletzungsbedingungen sowie unter Anwendung einer standardisierten Methodik erlangt werden. Die Studienergebnisse wurden im Jahr 2019 unter dem Titel „Quantitative analysis of individual cell-free DNA concentration before and after penetrating trauma“ veröffentlicht.
- (2) Das Ziel des zweiten Teilprojektes, welches unter dem Titel „Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course“ im Jahr 2020 publiziert wurde, war es, die biologische Variabilität der cfDNA über eine kurze Zeitspanne im Ruhezustand von Gesunden zu ermitteln. Hierfür wurde ein Blutentnahmeprotokoll angewandt, welches bereits vorab von Brodbeck et al. hinsichtlich des präanalytischen Einflusses der Blutabnahme mittels Venenverweilkanüle auf die Konzentration der cfDNA optimiert wurde [1]. Es sollte der natürliche Schwankungsbereich des Biomarkers definiert werden, um in zukünftigen Studien

Konzentrationsanstiege aufgrund einer Bagatellverletzung von normalen Fluktuationen abgrenzen zu können. Ergänzend sollte der potentielle Einfluss individueller Faktoren, wie z. B. des Blutdrucks oder der Angst vor der Venenpunktion, auf die zellfreie zirkulierende DNA untersucht werden. Die natürliche cfDNA-Variabilität sollte abschließend mit der klinisch etablierten Biomarker Kreatinkinase und Aspartat-Aminotransferase verglichen werden, wobei die zugrundeliegenden Analysen in Kooperation mit Prof. Dr. med. Stefan Holdenrieder am Deutschen Herzzentrum München durchgeführt wurden.

3.2 BAGATELLVERLETZUNGEN DER HAUT: HÄMATOME

Bei einem Hämatom oder Bluterguss handelt es sich um eine extravaskuläre Blutansammlung, welche als bläulich-violette, druckempfindliche Stelle auf der Hautoberfläche wahrgenommen und daher umgangssprachlich als „*Blauer Fleck*“ bezeichnet wird.

Grundsätzlich können Hämatome fast überall im Körper auftreten, weshalb sie ihrer Lage entsprechend bezeichnet werden (z. B. subkutanes, subperiostales oder retroperitoneales Hämatom). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stehen oberflächliche Blutergüsse im Bereich der Kutis im Fokus (siehe Abbildung 1), die zu den sogenannten „Bagatellverletzungen“ zählen, da sie als wenig schwerwiegend gelten und in der Regel keine medizinische Behandlung erfordern [2].

Der zugrundeliegende Verletzungsmechanismus ist im Allgemeinen eine stumpfe, häufig in orthogonaler Richtung zur Haut einwirkende Kraft, wie etwa durch einen Schlag, Sturz, Stoß oder Tritt [3]. Im Gegensatz zum scharfen Trauma wird bei stumpfer Gewalt die auftretende Kraft über eine größere Fläche verteilt. Trotz Deformation der Körperoberfläche bleibt die Haut intakt, weshalb Hämatome auch bei den „geschlossenen“ Verletzungen eingeordnet werden. Intern können jedoch Druck-, Zug- und/oder Scherkräfte auftreten, in deren Folge es zur Ruptur kleinerer Gefäße und einer damit einhergehenden Blutleckage in das umliegende Gewebe kommen kann [4].



Abbildung 1 Subkutanes Hämatom erzeugt durch experimentelles stumpfes Trauma

Neben traumatisch bedingten Blutergüssen sind auch spontan auftretende Hämatome bekannt, welche beispielsweise als Nebenwirkung gerinnungshemmender Arzneimittel oder bei Erkrankungen wie Leukämie oder Hämophilie auftreten können [4, 5]. Des Weiteren kann auch durch mechanische Venenpunktion im Rahmen von Injektionen, Infusionen oder Blutentnahmen ein Hämatom entstehen.

Je nach Lage des entstandenen Blutergusses können im Bereich der Haut intrakutane und subkutane Hämatome unterschieden werden, wobei sich die umgangssprachliche Bezeichnung „Blauer Fleck“ auf letztere bezieht. Infolge einer Verletzung der Venen,

Venolen oder kleinen Arterien im Unterhautfettgewebe erscheinen subkutane Hämatome an der Körperoberfläche bläulich und unscharf abgegrenzt. Kapilläre Blutungen sind dahingegen nur unter dem Mikroskop erkennbar [6]. Obwohl der Bluterguss ursprünglich in der Subkutis, also über den tiefen Muskelfaszien, entsteht, kann er sich in Richtung der Epidermis ausdehnen. Daher werden blaue Flecken oftmals erst nach 24 bis 48 Stunden sichtbar [7].

Subkutane Hämatome können sich aber auch in die oberflächlichen Muskelschichten ausweiten, weshalb selbst eine großflächige Blutung äußerlich unsichtbar bleiben oder als schmerzhafte Schwellung ohne Farbveränderung beobachtet werden kann [8]. Des Weiteren ist es ebenfalls möglich, dass der blaue Fleck an einer vom Anprall entfernt liegenden Stelle sichtbar wird. Zum einen können Faszien oder anderen kompakte Gewebestränge die Blutausdehnung umleiten, zum anderen können sich Hämatome unter dem Einfluss der Schwerkraft bewegen. So kann beispielsweise ein Bluterguss im Bereich der Stirn nach wenigen Stunden als „Veilchen“ sichtbar werden, ohne dass dem Auge direkt Gewalt zugefügt wurde [6].

3.2.1 Einflussfaktoren der Hämatom-Entstehung

Die Entstehung eines Hämatoms sowie sein Ausprägungsgrad sind abhängig von verschiedenen ineinandergreifenden Parametern, die zum einen externer Natur sind, zum anderen auf individuelle Faktoren der betroffenen Person zurückgeführt werden können.

Das Hämatom-Volumen ist dabei zunächst in gewissem Maß abhängig von der auf den Körper einwirkenden Kraft, wobei Richtung und Intensität die vektorielle Größe definieren. Des Weiteren können Geometrie und Beschaffenheit des auftreffenden Gegenstandes sowie die Bekleidung des Opfers den Verletzungsgrad beeinflussen [2–4].

Bei der Frage, ob intraindividuell ein Hämatom entsteht, ist vor allem der Anprallort sowie die damit verbundene Beschaffenheit der betroffenen Körperpartie entscheidend. Zunächst ist die Wahrscheinlichkeit einer Blutleckage erhöht, wenn Gewebe mit einer hohen Gefäßdichte und somit guten Durchblutung der Gewalteinwirkung ausgesetzt ist [2, 6]. Knöchernen Strukturen können dabei als Widerlager fungieren [6]. Des Weiteren ist die Hämatom-Entstehung in lockerem Bindegewebe wahrscheinlicher als in kompaktem Stützgewebe, welches der Blutausbreitung Widerstand entgegensetzt (z. B. Haut über der Augenbraue versus Fußsohle) [2, 5, 6].

Interindividuell sind Lebensalter, Geschlecht sowie Körpermaße der betroffenen Person von Relevanz: Frauen sowie übergewichtige Personen entwickeln schneller blaue Flecken, was

auf einen höheren Anteil an subkutanem Fett zurückgeführt werden kann. Außerdem kann sowohl bei alten als auch bei jungen Menschen eine verstärkte Disposition zu Hämatomen beobachtet werden. Während bei letzteren eine zarte Haut und somit das Fehlen von widerstandsfähigem Gewebe ursächlich ist, kann es mit zunehmendem Alter zu fragilen Gefäßen kommen [6, 9]. Im Zusammenhang mit einer Bindegewebsschwäche oder beeinträchtigten Blutgerinnung können außerdem schon bei geringer Krafteinwirkung exzessive Blutungen auftreten [2, 5]. Als weitere Einflussfaktoren seien außerdem der Muskeltonus im Bereich der Anprallstelle [10], die Körpertemperatur, der Blutdruck sowie bereits vorhandene Verletzungen genannt [7].

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die dargelegten Parameter einen gewissen Einfluss auf die Hämatom-Entstehung haben und somit auch die Größe des Blutergusses nicht zwingend mit der Trauma-Schwere korreliert. Insgesamt existieren sehr wenig weiterführende Daten dazu, welche Kraft unter bestimmten Gegebenheiten aufgebracht werden muss, damit ein Hämatom (bestimmter Größe) entsteht.

3.2.2 Die Bedeutung von Hämatomen für Forensik und Industrie

Im Gegensatz zu schweren Verletzungen begründet sich die Bedeutung von Bagatellverletzungen weniger durch folgenschwere oder lebensbedrohliche Auswirkungen, sondern viel mehr durch ihr häufiges Auftreten, ihre Beweiskraft in medizinisch-rechtlichen Belangen, oder hinsichtlich den steigenden Anforderungen im Bereich der Arbeitssicherheit:

Im forensischen Kontext haben Hämatome gutachterlich-rekonstruktive Relevanz, weshalb ihre Dokumentation und Beurteilung zur gängigen Praxis bei gerichtlichen Sektionen und körperlichen Untersuchungen im Rahmen der klinischen Rechtsmedizin gehört [8]. Das Auftreten von blauen Flecken insbesondere an den Extremitäten, zum Beispiel in Form von Griffspuren, stellt ein frühes physisches Anzeichen für häusliche Gewalt und Kindesmisshandlung dar [11, 12]. Im Zusammenhang mit Straftaten oder Verkehrsunfällen können Hämatome ein wichtiges Indiz für die Rekonstruktion des Tat- bzw. Unfallhergangs liefern [2, 5]. Rechtsmediziner werden vor diesem Hintergrund bei Gericht häufig dazu befragt, wie groß die Krafteinwirkung gewesen sein muss, damit eine bestimmte Verletzung entsteht. Die Einschätzung erfolgt dabei oftmals anhand der Kategorien „mild“, „moderat“ und „schwer“. Dieser Einteilung fehlen jedoch meist empirische Grundlagen, weshalb umfassende Untersuchungen der Verletzungsentstehung benötigt werden, um fundierte Aussagen vor Gericht liefern zu können [13].

Diskrete Weichgewebeverletzungen sind jedoch nicht nur im forensischen Bereich von Bedeutung, sondern haben auch im industriellen Bereich äußerste Relevanz. In Industriearbeitsplätzen kollaborieren Menschen und Roboter zunehmend zeitgleich und ohne räumliche Trennung, wobei es zum physischen Kontakt zwischen Arbeiter und Roboter kommen kann. Neben dem Einsatz in der Industrie setzt sich eine Automatisierung auch im privaten Umfeld immer mehr durch und Pflegeroboter sind dabei nur ein Beispiel für enge Mensch-Maschine-Kooperationen. Die Einhaltung biomechanischer Belastungsgrenzen im Kontaktfall stellt somit eine neue Herausforderung für die Entwicklung von Sicherheitsnormen und Richtlinien dar. Aktuelle Forschung in diesem Bereich beschäftigt sich dabei nicht nur mit dem gesteigerten Risiko schwerer und lebensbedrohlicher Verletzungen, sondern auch zunehmend mit der Vermeidung von Bagatellverletzungen. Die ISO/TS 15066, welche eine Richtlinie zur Risikobewertung von kollaborativen Roboteranlagen darstellt, legt in diesem Kontext den Verletzungseintritt als Toleranzgrenze für den Fall eines Mensch-Roboter Kontaktes fest [14].

Digitale Menschmodelle stellen hierbei einen vielversprechenden Ansatz zur Untersuchung sicherheitsrelevanter Parameter dar. Simulationen mit computerbasierten Menschmodellen

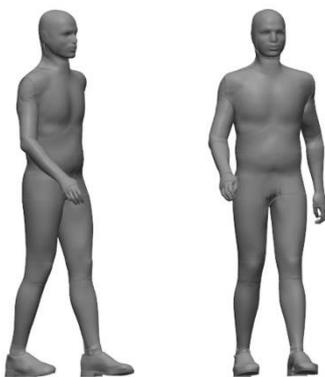


Abbildung 2 Exemplarisches Menschmodell GHBMC M50 v.1.6 aus unterschiedlichen Perspektiven

(siehe Abbildung 2) bieten die Möglichkeit, Unfallhergänge nachzustellen und zu visualisieren sowie eine Vorhersage über potenziell entstehende Verletzungen zu treffen. Um mit derartigen Simulationen belastbare Ergebnisse zu erhalten, sind jedoch Materialmodelle nötig, die die Eigenschaften von Humangewebe realistisch abbilden. Um dies zu garantieren, müssen die Simulationsergebnisse zunächst mit fundierten experimentellen Daten verglichen und somit

validiert werden. Bisher existieren jedoch nur wenige In-vivo-Studien, welche geringfügige mechanische Einwirkungen auf den menschlichen Körper quantitativ beschreiben [15]. Somit ist die Validierungsgrundlage für eine Risikovorhersage hinsichtlich der Entstehung von Bagatellverletzungen bislang unzureichend.

3.2.3 Herausforderungen bei der Analyse der Hämatom-Entstehung

Problemstellung bei der systematischen Hämatom-Erzeugung

Um die Umstände für das Entstehen von diskreten Weichgewebeverletzungen systematisch zu untersuchen und numerisch abzubilden, ergibt sich die Notwendigkeit, Hämatome unter definierten Bedingungen im Experiment zu erzeugen. Bei bereits vorhandenen blauen Flecken, welche akzidentiell durch ein reales Trauma entstanden sind, ist es meist unmöglich, die kausalen Umstände für deren Auftreten explizit zu beschreiben. Da es sich bei einer Blutleckage um eine physiologische Reaktion handelt, ist es außerdem nicht möglich, diese post-mortem zu erzeugen [16].

Aus diesem Grund fokussierten sich wenige Studien auf die experimentelle Hämatom-Erzeugung in Hausschweinen in vivo [12, 17, 18]. Mechanische Belastungsversuche an dem Paarhufer sind in diesem Zusammenhang jedoch nur bedingt aussagekräftig, da sein Unterhautfettgewebe, verglichen mit der humanen Subkutis, deutlich dicker und kompakter ist [19]. Außerdem erfordern gesetzliche Vorgaben im Kontext mit Tierversuchen oftmals die Anästhesie während des Eingriffs sowie die anschließende Euthanasie. Randeberg et al. untersuchten 2007 die Auswirkung von Paintball-Schüssen auf Hausschweine. Sie schlussfolgerten, dass die Narkose neben dem Muskeltonus auch die Hautdurchblutung und somit die physiologische Reaktion auf das Trauma beeinflusst. Des Weiteren konnte aufgrund der Euthanasie der Tiere eine potentiell zeitlich verzögerte Hämatom-Entwicklung nicht beobachtet werden [12].

Für eine Analyse von Toleranzgrenzen des Weichgewebes müssen konsequenterweise Bagatellverletzungen experimentell in Freiwilligen erzeugt werden. Um hierfür ein ethisch vertretbares Studienkonzept zu entwickeln, ist ein Versuchsaufbau erforderlich, der einen so definierten Energieeintrag ermöglicht, dass infolge ein subkutanes Hämatom entsteht, eine schwerwiegende Verletzung jedoch ausgeschlossen werden kann.

Fallkörperversuche, bei denen ein zylindrischer Impaktor aus variabler Höhe auf die obere Extremität von Probanden fallengelassen wird, stellen einen solchen Versuchsaufbau dar. Wie es in Brodbeck et al. beschrieben wurde [20], erlaubt diese Art von Experiment das kontrollierte Aufbringen einer dynamischen Kompressionsbelastung, wodurch punktgenaue Traumata unterschiedlicher Schwere auf das darunterliegende Gewebe ausgeübt werden. Mit Hilfe eines Sensors kann die Beschleunigung des Fallkörpers beim Kontakt mit dem Gewebe erfasst und somit die einwirkende Kraft berechnet werden. Auf diese Weise können Belastungsgrenzen des Weichgewebes unter dem Einfluss physikalischer und individueller

Faktoren systematisch untersucht werden. Der zuverlässige Nachweis der potenziell erzeugten Verletzung ist dabei die grundlegende Voraussetzung für ein erfolgreiches Experiment. Die unmittelbare Detektion der diskreten Weichgewebeverletzung stellt jedoch eine weitere Herausforderung an die Wissenschaft dar.

Problemstellung beim Nachweis von Bagatellverletzungen

Da kleine subkutane Hämatome direkt nach Trauma oftmals mit dem Auge nicht erkennbar sind (vgl. Absatz 3.2, S.12), ergibt sich die Notwendigkeit einer Methode für den Nachweis von Bagatellverletzungen. Diese muss einerseits eine hohe Sensitivität aufweisen und andererseits wenig invasiv sein, damit diese ohne ethisch-rechtliche Bedenken an gesunden Freiwilligen angewandt werden kann. Des Weiteren sollte das Nachweisverfahren im Organisations- und Kostenrahmen von Freiwilligenversuchen in hoher Zahl und kurzer Abfolge durchführbar sein, weshalb generell die Anwendung von komplexen bildgebenden Verfahren aus der klinischen Diagnostik (z. B. Magnetresonanztomographie) unverhältnismäßig erscheint.

Eine kostengünstige, nicht invasive Nachweismethodik stellt in diesem Zusammenhang beispielsweise die Untersuchung mit Ultraschall dar. Abhängig vom Erythrozytenanteil und Organisationsgrad können Hämatome verschiedene Echomuster im Sonogramm erzeugen [21]. Somit ist diese Methode zwar grundsätzlich geeignet um Hämatome zu lokalisieren, der Nachweis von kleinen subkutanen Blutergüssen stellt sich jedoch als herausfordernd dar. In einer Studie von Helm et al. konnten von 22 augenscheinlich sichtbaren Hämatomen letztendlich nur zwölf durch Sonographie detektiert werden [22].

Bei körperlichen Untersuchungen im Bereich der klinischen Rechtsmedizin werden Verletzungen, welche im Zusammenhang mit Gewaltdelikten stehen, zur Dokumentation fotografiert. Um dabei deren Sichtbarkeit zu verbessern, wurde die Anwendung von Licht unterschiedlicher Wellenlängen in mehreren wissenschaftlichen Studien getestet. Lombardi et al. untersuchten Hämatome u. a. mit UV-Licht, wobei sie zeigten, dass sichtbare blaue Flecken unter dem Einsatz alternativer Lichtquellen besser darstellbar sind als unter normalem Tageslicht. Sie postulierten jedoch auch, dass diese Methode für einen zuverlässigen Nachweis von nicht-sichtbaren Hämatomen wenig spezifisch ist [11]. Rowan et al. testeten 2010 die Anwendung von infrarotlicht-gestützter Fotografie für die Detektion von verblassten Hämatomen. Bei neun von zehn Probanden konnte jedoch mit dieser Methode kein Nachweis eines blauen Flecks erbracht werden [23].

Zusammenfassend lässt sich folglich postulieren, dass die Detektion der Bagatellverletzung eine Herausforderung darstellt, welche mit den herkömmlichen klinischen bzw. rechtsmedizinischen Methoden kaum zu bewältigen ist. Demnach wird ein neues, innovatives Verfahren für einen zuverlässigen und unmittelbaren Nachweis einer diskreten Weichgewebeverletzung benötigt.

Im klinischen Bereich werden seit einigen Jahren spezifische Biomarker im Blut oder Urin von Patienten analysiert, die es ermöglichen, bestimmte Erkrankungen minimalinvasiv nachzuweisen. Seit der Entdeckung von freien Nukleinsäuren im Blutplasma durch Mandel und Métais im Jahr 1948 hat die zellfreie zirkulierende DNA einen besonderen Stellenwert unter den Biomarkern erlangt. Verschiedene Studien beschreiben ihre erfolgreiche Anwendung in der Tumordiagnostik oder in Pränatal-Screenings. Die zellfreie zirkulierende DNA hat aber auch in Bezug auf Traumata wissenschaftliches Interesse gefunden, da unmittelbar nach einer schweren Verletzung erhöhte Werte im Blut des Patienten nachgewiesen werden können. Demnach ist es durchaus vorstellbar, dass die blutbasierte Analyse des Biomarkers einen innovativen Ansatz zur Detektion von Bagatellverletzungen nach experimentellem Trauma in Probanden darstellen könnte.

3.3 ZELLFREIE ZIRKULIERENDE DNA ALS TRAUMA-BIOMARKER

Bei der zellfreien zirkulierenden DNA (engl. *cfDNA = circulating cell-free DNA*) handelt es sich um eine doppelsträngige, extrazelluläre Nukleinsäure, die sich nicht nur im Blut, sondern auch in weiteren Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Schweiß, Liquor oder Urin, befindet. Sie ist stark fragmentiert, wobei die kurzen DNA-Stücke frei und ungebunden auftreten können, assoziiert mit weiteren Molekülen oder eingeschlossen in extrazelluläre Vesikel.

Während im Blutplasma von Gesunden ein gewisser Basislevel der cfDNA vorhanden ist, steigt dieser nach Trauma sowie infolge verschiedener Erkrankungen rapide an. Je nach ihrer ursprünglichen Lage in der Zelle handelt es sich dabei entweder um genomische oder um mitochondriale DNA, welche aus der Zelle freigesetzt wurde und infolgedessen in die Blutbahn gelangte. Obwohl die mitochondriale DNA ebenfalls Relevanz als Trauma-Biomarker aufweist (vgl. zum Beispiel [24]), war die genomische DNA in einem Großteil der derzeit vorliegenden Literatur Gegenstand der Forschung und steht daher auch im Fokus dieser Dissertation.

In den nachfolgenden Kapiteln wird zunächst die Biologie der zellfreien DNA thematisiert, wobei Freisetzung, Funktion und Abbau sowie ihr Basislevel unter dem Einfluss individueller Faktoren fokussiert werden. Anschließend werden ihre Anwendungsmöglichkeiten als Biomarker beschrieben, wobei der aktuelle Stand der Forschung im Trauma-Bereich näher beleuchtet wird. Im letzten Kapitel stehen Limitationen und Wissenslücken der gegenwärtigen cfDNA-Forschung im Fokus.

3.3.1 Freisetzung, Funktion und Abbau

Die Mechanismen der DNA-Freisetzung in den Blutkreislauf sowie die dafür zugrundeliegenden Stimuli sind bis heute noch nicht vollständig verstanden [25]. Im Wesentlichen wird die passive Freisetzung durch Zelltod sowie eine aktive Sekretion aus vitalen Zellen diskutiert, wobei je nachdem das Fragmentlängenprofil der cfDNA variieren kann.

Unter physiologischen Bedingungen geht man bisher davon aus, dass freie DNA hauptsächlich aufgrund von Apoptose hämatopoetischer Zelllinien in die Blutbahn gelangt [26, 27]. Verschiedene Studien demonstrierten mit Hilfe von Elektrophorese oder Sequenzierung, dass ein Großteil der DNA-Fragmente in Gesunden ein für den apoptotischen Zelltod typisches Längenmuster von ~ 180 Basenpaaren (bp) oder eines Vielfachen davon

aufweist [28, 29]. Diese Eigenschaft kann auf die charakteristische Spaltung von Chromatin in nukleosomale Einheiten (Mono- oder Oligonukleosomen) während der Apoptose zurückgeführt werden [30].

Bei erhöhten Plasma-Konzentrationen wird dahingegen angenommen, dass die DNA-Freisetzung weitere bzw. zusätzliche Ursachen hat. Rasche Konzentrationsanstiege, wie sie beispielsweise nach einer Verletzung auftreten, lassen sich nicht mit den lang andauernden apoptotischen Prozessen vereinbaren [31]. Im Zusammenhang mit Traumata wird eine Freisetzung durch nekrotischen Zelltod vermutet, welcher aufgrund der exogenen mechanischen Zellschädigung eintritt [25, 32]. Verglichen mit der apoptotischen Freisetzung können infolge des nekrotischen Zelltods längere DNA-Fragmente von mehreren 10.000 bp nachgewiesen werden [30].

Neben Apoptose und Nekrose wird des Weiteren eine aktive DNA-Freisetzung durch lebende Leukozyten in Form von sogenannten „*Neutrophil Extracellular Traps*“ (NETs) diskutiert, wobei der Mechanismus selbst als „vitale NETose“ bezeichnet wird. NETs sind Netzwerke aus langkettigen DNA-Strängen assoziiert mit Proteinen, die antibakterielle Eigenschaften besitzen (z. B. neutrophile Elastase, Myeloperoxidase) [33]. Die vitale NETose kann innerhalb von Minuten erfolgen und stellt somit eine schnelle und effektive Immunantwort zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen dar [34]. Inwiefern die NETose auch bei Trauma Bedeutung hat, wurde kürzlich von Jackson Chornenki et al. untersucht, indem sie, neben zellfreier DNA, zusätzlich Marker für Nekrose, Apoptose und NETose in Trauma- und Sepsis-Patienten analysierten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen zeigte sich nur bei dem NETose-Marker, wobei höhere Konzentrationen in Sepsis-Patienten nachgewiesen wurden. Demzufolge schlussfolgerten die Autoren, dass eine DNA-Sekretion durch NETose zwar im Zusammenhang mit Sepsis Relevanz hat, jedoch bei Trauma die Freisetzung von DNA durch verletzte, nekrotische Zellen wahrscheinlicher ist [32]. Nichtsdestotrotz ist es auf Basis der derzeitigen Datenlage wahrscheinlich, dass die cfDNA aufgrund einer Kombination verschiedener Mechanismen in die Zirkulation gelangt, welche wiederum von individuellen sowie pathophysiologischen Faktoren abhängt [25, 32].

Die Halbwertszeit der cfDNA im Blutplasma wird auf wenige Minuten [35, 36] bis ungefähr zwei Stunden geschätzt [37, 38]. Die Abbaugeschwindigkeit hängt dabei u. a. von der Komplexierung der DNA mit weiteren Molekülen ab, welche die freie Nukleinsäure vor enzymatischem Verdau schützen. Die fragmentierten DNA-Stücke werden in Folge durch Phagozytose neutrophiler Granulozyten aus der Blutbahn eliminiert und über die Leber und

Nieren ausgeschieden [38–40]. Neben einer vermehrten DNA-Freisetzung kann eine verminderte Eliminierung aus der Zirkulation ebenfalls ursächlich für anhaltend erhöhte Konzentrationen sein. Letzteres kann beispielsweise aufgrund einer eingeschränkten Organfunktion infolge eines Traumas eintreten [31, 41].

Bezüglich der Funktion der zellfreien DNA ist es bis heute noch nicht vollständig geklärt, ob die extrazelluläre Nukleinsäure biologische Effekte hat und welche diese im Detail sind. Es manifestiert sich jedoch zunehmend die Auffassung, dass sie eine aktive Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen spielt und daher nicht nur als „Abfall-Molekül“ angesehen werden kann. Beispielsweise wird die cfDNA von Immunzellen als „*Danger associated molecular pattern*“ (DAMP) wahrgenommen, wodurch infolge einer Gewebeverletzung Entzündungsreaktionen ausgelöst werden können [33]. Außerdem kann sie unter Umständen die Blutgerinnung fördern und regulatorische Effekte auf die Fibrinolyse ausüben [42].

3.3.2 Basislevel

Im Blut von gesunden Personen kann die cfDNA in geringen Mengen nachgewiesen werden, wobei die meisten Studien Konzentrationswerte zwischen einem und fünfzig Nanogramm pro Milliliter Blutplasma rapportieren [28, 43–46].

Individuelle Faktoren können das cfDNA-Basislevel sowohl kurz- als auch langfristig beeinflussen, wobei aufgrund des derzeitigen Forschungsstands unter anderem der Einfluss demographischer Parameter nicht ausgeschlossen werden kann:

Jylhävä et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass neunzigjährige Frauen ein wesentlich höheres cfDNA-Level haben, als Frauen mittleren Alters [47]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie demonstrierten Meddeb et al. zudem signifikant höhere Konzentrationen in Männern und in Personen älter als 47 Jahre [46]. Nishimoto et al. stellten weiterführend höhere Werte in Übergewichtigen fest, wobei sie eine positive Relation zwischen der Plasma-DNA-Konzentration und dem viszeralen Fettanteil nachweisen konnten [48]. Nichtsdestotrotz wurden in diesem Kontext auch dem entgegenstehende Studienresultate veröffentlicht, welche vor allem den Einfluss der Faktoren Alter, Geschlecht und Gewicht auf die cfDNA entkräften [36, 49].

Intra-individuell kann potenziell die Nahrungsaufnahme sowie körperliche Betätigung kurzzeitig Einfluss nehmen [50], weshalb sich eine gewisse Varianz über den Tagesverlauf zeigt. Es wird angenommen, dass sich maximale Konzentrationen zur Mittagszeit einstellen, gefolgt von einem Absinken in den Nachmittagsstunden [51, 52]. Keinen Effekt auf die zellfreie DNA scheint hingegen der weibliche Menstruationszyklus zu haben [53].

3.3.3 Änderungen des Basislevels als Diagnostikmöglichkeit

Unter bestimmten pathologischen Zuständen kann im Blutplasma ein unmittelbarer Anstieg der cfDNA-Konzentration auf ein Vielfaches des Basiswertes beobachtet werden. Aufgrund dieser Eigenschaft erlangte die zellfreie DNA nicht nur Bedeutung im Bereich der Trauma-Forschung, sondern auch als sogenannte „*Liquid Biopsy*“ für den Nachweis von:

- verschiedenen Krebsarten, u. a. Darm-, Brust-, Lungen-, Prostatakrebs [54]
- Kollagenosen, wie Systemischer Lupus erythematodes [55], oder das Sjögren-Syndrom [56]
- Störungen des Stoffwechselsystems, wie Diabetes mellitus [57]
- chronisch-entzündliche Erkrankungen, wie Pankreatitis [58], rheumatoide Arthritis [59]
- Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, z. B. Herzinfarkt [60], Schlaganfall [61] oder thrombotische Mikroangiopathie [62]
- psychische und neurodegenerative Erkrankungen, wie Schizophrenie [63] oder Morbus Alzheimer [64]

Die zellfreie DNA steht jedoch nicht nur aufgrund ihres Diagnose-Potenzials im Studienfokus, sondern auch hinsichtlich der Beurteilung von Krankheits- oder Therapieverläufen (z. B. cfDNA-Level vor und nach Tumorresektion, Koronarintervention oder Medikamentengabe [65–67]). Der Biomarker wird hierfür nicht nur quantitativ auf seine Konzentration hin untersucht, sondern auch qualitativ hinsichtlich der DNA-Sequenz, DNA-Integrität sowie epigenetischer Modifikationen. Während sich die Anwendung für die meisten Krankheiten noch in der Forschung befindet, ist die zellfreie DNA als blutbasiertes Screening-Tool für die Darmkrebsfrüherkennung seit einigen Jahren im Rahmen des „Septin9-Methylierungstests“ klinisch zugelassen [68].

Nichtsdestoweniger können auch in nicht-pathologischen Zuständen deutliche Änderungen des Basislevels verzeichnet werden. So haben beispielsweise schwangere Frauen ein erhöhtes Plasma-DNA-Level. Da die fetale cfDNA plazentagängig ist, reichert sich diese über den

Schwangerschaftsverlauf im Blut der Mutter an, wobei sie dort ab der siebten Woche nachweisbar ist [69]. Diese Eigenschaft ermöglicht eine minimalinvasive Diagnosemöglichkeit von fetalen Genommutationen, verglichen mit den herkömmlichen Methoden, wie Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie [70]. Daher erfährt das „*Non-invasive Prenatale Testing*“ (NIPT) durch zellfreie DNA weltweit zunehmend an Nachfrage. Seit 2012 sind in Deutschland NIPT-Tests kommerziell erhältlich und werden voraussichtlich ab Herbst 2020 von den Krankenkassen finanziert [71, 72].

Des Weiteren wurden Konzentrationsanstiege unmittelbar nach Belastungssport, wie nach Kraft- oder Ausdauertraining, nachgewiesen [43, 44, 73], wodurch eine Anwendung der cfDNA als Belastungsmarker zum Monitoring von Trainingseffekten postuliert wird [73]. Neben physischem Stress wurde vor Kurzem auch psychosozialer Stress als Auslöser für cfDNA-Anstiege identifiziert [74].

3.3.4 Die Bedeutung von cfDNA in Verletzungsgeschehen - Stand der Forschung

Dennis Lo und weitere Wissenschaftler aus Hongkong waren die Vorreiter in der cfDNA-Analyse im Zusammenhang mit Verletzungen, wobei sie die Hypothese aufstellten, dass Zellen aufgrund einer traumatischen Schädigung ihre DNA in die Blutbahn freisetzen [75].

In der im Jahr 2000 veröffentlichten Pilotstudie konnten sie erstmals signifikant erhöhte Plasma-DNA-Konzentrationen in Schwerverletzten, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, nachweisen. Basierend auf Einzelmessungen unmittelbar nach stumpfem Trauma, postulierten Lo et al. einen direkten Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration und der Verletzungsschwere, bewertet anhand des *Injury Severity Scores* (ISS) oder der *Abbreviated Injury Scale* (AIS). Lediglich zum AIS-Schweregrad der Extremitäten konnte kein Bezug hergestellt werden. Des Weiteren wurde in dieser Studie von einer positiven Korrelation zwischen dem posttraumatischen cfDNA-Level und einem konsekutiv auftretenden Lungenversagen sowie dem Todeseintritt berichtet [75].

Auf Basis dieser Pilotstudie wurde die Bedeutung der zellfreien DNA mehrfach hinsichtlich der Risikostratifizierung posttraumatischer Komplikationen sowie als Prognoseparameter für die Überlebenswahrscheinlichkeit im Rahmen verschiedener Verletzungsmechanismen, wie stumpfem [76–78], scharfem [24, 78, 79] oder thermischem [80–82] Trauma, untersucht. Als explizite Beispiele seien an dieser Stelle Kopfverletzungen aufgrund von Schädelhirn-Traumata [83–85], Rückenmarksverletzungen durch stumpfes Trauma [77] sowie penetrierende Verletzungen durch orthopädische Operation [24, 66] genannt. Obwohl bislang

noch kein systematischer Vergleich der Verletzungsmechanismen vorliegt, deuten die Ergebnisse von Ren et al. ein höheres cfDNA-Level nach scharfem Trauma an, verglichen mit stumpfer Krafteinwirkung [78].

Im Zuge der Beurteilung der prognostischen Eigenschaften der cfDNA rückten mehrwöchige Messreihen zur Analyse des posttraumatischen Verlaufs in den Studienfokus. Dabei wurden, unabhängig von der Verletzungsart, maximale Konzentrationswerte direkt nach dem Unfallgeschehen verzeichnet. Der Analysezeitpunkt „unmittelbar nach Trauma“ bezieht sich dabei in den meisten Studien auf eine Blutabnahme im Rahmen der Krankenhausaufnahme (siehe zum Beispiel [86]). Zwei Veröffentlichungen berichten dahingegen von einer zusätzlichen Probenentnahme am Unfallort [41, 49], wodurch der Nachweis einer erhöhten Konzentration bereits 14 Minuten nach Trauma erbracht werden konnte [41].

Bis heute vertritt der wissenschaftliche Konsens die Vermutung eines direkten Zusammenhangs zwischen dem posttraumatischen cfDNA-Level und der individuellen Verletzungsschwere [31, 41, 49, 75, 76, 83]. In Lam et al. wurde beispielsweise von einer dreimal höheren Konzentration in Patienten nach massivem Trauma (ISS > 25) berichtet, verglichen mit weniger schwer Verletzten. Im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe war die Konzentration sogar 200-fach erhöht [49].

Dem initialen Maximalwert direkt nach Trauma folgt in der Regel eine Konzentrationsabnahme, die in Leichtverletzten innerhalb von wenigen Stunden Referenzwerte erreicht [31]. Nach schwerem Trauma wird in verschiedenen Publikationen ein Zusammenhang zwischen der Biomarker-Kinetik und der Prognose des Patienten postuliert: Macher et al. berichteten in diesem Zusammenhang beispielsweise von der Eigenschaft der cfDNA, die Überlebenswahrscheinlichkeit vorherzusagen. Je nach Ausmaß der Konzentrationsabnahme in den ersten 24 Stunden nach Trauma könne demnach ein tödlicher Ausgang vorhergesagt werden. Des Weiteren kann in Anlehnung an Lam et al. das cfDNA-Niveau in Patienten, welche im posttraumatischen Verlauf Komplikationen entwickeln (z. B. multiples Organversagen) bis zu mehreren Wochen erhöht bleiben [31]. Bei Auftreten einer Sepsis wird in Margraf et al. sogar von einem sekundären Konzentrationsanstieg mehrere Tage nach Trauma berichtet [86].

Vor diesem Hintergrund wurde die Korrelation der Plasma-DNA-Konzentration mit intensivmedizinischen Prognose-Scores (z. B. *SOFA*, *APACHE*, *GCS* [83, 84, 87]) sowie mit klinisch relevanten Biomarkern für beispielsweise Skelettmuskelschäden [24, 77], Endothelverletzungen [41] oder systemische Entzündungsreaktionen [49, 76] analysiert.

Dabei sind in der Literatur oftmals widersprüchliche Ergebnisse präsentiert, weshalb die prognostische Aussagekraft der zellfreien DNA im Trauma-Kontext derzeit noch umstritten ist (siehe dazu [32]).

3.3.5 Limitierungen der aktuellen cfDNA-Forschung

Ein häufig diskutierter Schwachpunkt der Forschung mit Fokus auf zellfreie DNA stellt das Fehlen von standardisierten Vorgehensweisen dar. Vor allem die Präanalytik kann enormen Einfluss auf das cfDNA-Level haben, da schon die Probengewinnung und -aufbereitung von Relevanz für die anschließende Quantifizierung ist. Beispielsweise kann es durch zeitliche Verzögerung zwischen Blutentnahme und Plasmaaufbereitung zur Ex-vivo-Hämolyse von Leukozyten und somit zu einer Verunreinigung der Probe durch genomische DNA kommen. Aus dem gleichen Grund muss absolut zellfreies Plasma durch mehrmaliges Zentrifugieren gewonnen werden [88]. Unterschiede in der präanalytischen, aber auch analytischen Vorgehensweise führten in der Vergangenheit dazu, dass stark abweichende Basiswerte in der Literatur publiziert sind, welche teilweise von wenigen Nanogramm bis mehreren hundert Nanogramm pro Milliliter Blutplasma reichen (vgl. [46, 89]). Des Weiteren erschweren unterschiedliche Einheiten publizierter Konzentrationen, wie Nanogramm pro Milliliter oder Genomeinheiten pro Liter, zusätzlich die Vergleichbarkeit absoluter Werte [90].

Der Einfluss der Präanalytik auf die anschließende Quantifizierung sowie auf die qualitative Untersuchung der Fragmentlänge ist in den letzten Jahren immerhin zunehmend ins Bewusstsein gerückt. Verschiedene Publikationen schlagen einheitliche Richtlinien hinsichtlich der einzelnen Schritte zur Probengewinnung und -verarbeitung vor, wobei unter anderen folgende präanalytische Variablen untersucht wurden [88, 91, 92]:

- die zu untersuchende Matrix (z. B. Serum, Plasma),
- Blutentnahmeröhrchen sowie Anti-Koagulantien,
- der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Zentrifugation
- Bedingungen der Zentrifugation für die Plasmaaufbereitung
- Probenlagerungsbedingungen
- sowie die DNA-Extraktionsmethode

Dagegen hat man dem Effekt der Blutentnahme selbst auf die Konzentration der cfDNA noch keine Beachtung geschenkt. Vor dem Hintergrund, dass die Venenpunktion eine Gewebeerletzung der Haut und Gefäßwand verursacht, kann angenommen werden, dass aufgrund dessen die cfDNA-Konzentration in geringem Umfang ansteigt. Im Hinblick auf

zukünftige Untersuchungen des Biomarkers im Bereich der Trauma-Forschung ist die Berücksichtigung der präanalytischen Einflüsse insbesondere von Bedeutung, um Basiswerte sowie Abweichungen von diesen korrekt zu bestimmen und um somit den Verletzungsgrad einschätzen zu können.

Nichtsdestoweniger spielt neben der methodischen Variabilität auch die biologische Varianz der zellfreien DNA in diesem Zusammenhang eine übergeordnete Rolle, wobei jedoch die Datenlage diesbezüglich unzureichend ist. Nach dem Bekanntwerden der potenziellen diagnostischen und prognostischen Eigenschaft der cfDNA fokussierte sich die Forschung auf die Untersuchung verschiedener Anwendungsmöglichkeiten für einen zielgerichteten Einsatz im klinischen Bereich. Die systematische Analyse ihrer inter- und intraindividuellen Varianz blieb dabei im Hintergrund, weshalb bis heute insbesondere die natürliche Schwankung der cfDNA wenig untersucht ist. Nach dem derzeitigen Wissensstand wurden nur zwei Studien veröffentlicht, die die zirkadiane Rhythmik der freien Nukleinsäure untersuchten [51, 52]. Weiterführend existieren keine Daten, welche die Variabilität in kurzen Zeitspannen berücksichtigen.

Allerdings ist die Kenntnis der Basiswerte und der damit assoziierten Schwankungen für die stichhaltige Beurteilung von Konzentrationsanstiegen durchaus von Bedeutung. Ohne genaue Kenntnis der natürlichen Varianz kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um einen tatsächlichen Konzentrationsanstieg oder nur um eine Fluktuation handelt, was insbesondere bei kleinen Änderungen des cfDNA-Levels Relevanz haben kann.

Im Bereich der Trauma-Forschung wurden jedoch ohnehin kaum individuelle Anstiege fokussiert. In einem Großteil der Studien wurden Posttrauma-Werte in Schwerverletzten ermittelt, welche wiederum mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wurden [24, 31, 49, 75, 78]. Vor diesem Hintergrund wurden demzufolge weder intra- noch interindividuelle Schwankungen des Basislevels berücksichtigt, und systematische Untersuchungen der Konzentrationsänderung vor und unmittelbar nach Trauma innerhalb einer Person fehlen.

4 PUBLIZIERTE ERGEBNISSE

4.1 EIGENER BEITRAG AN VERÖFFENTLICHUNGEN

Im Hinblick auf veröffentlichte Ergebnisse umfasste der von mir geleistete Beitrag die Mitentwicklung des Gesamt-Studienkonzeptes, das selbstständige Verfassen der einzelnen Studienprotokolle sowie die selbstständige inhaltliche Gestaltung der Anträge zum Einholen der Ethikvoten (17-146; 18-208). Des Weiteren fungierte ich als erster und hauptsächlicher Ansprechpartner für Studienteilnehmer, Kooperationspartner, alle beteiligten Co.-Autoren sowie Editoren.

Der von mir durchgeführte labortechnische Anteil an dem Teilprojekt „Quantitative analysis of individual cell-free DNA concentration before and after penetrating trauma“ beinhaltete das Probenmanagement und die Aufbereitung des Blutplasmas vor Ort sowie die DNA-Präparation und Probenvorbereitung für die anschließende automatisierte qPCR.

Für das Teilprojekt „Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course“ umfasste mein Beitrag das Einwerben der Fördermittel beim Verein zur Förderung von Wissenschaft und Forschung an der Medizinischen Fakultät der LMU München e.V., die Verwaltung des zugehörigen Drittmittelkontos sowie die Planung und Organisation der Freiwilligenversuche hinsichtlich Probandenrekrutierung, Terminvereinbarung und Aufklärung. Des Weiteren beinhaltete der von mir geleistete Anteil die Durchführung der Versuche einschließlich Probandenbefragung, anthropometrischer Vermessung und Betreuung während der Blutentnahmen sowie das Probenmanagement, die Aufbereitung der Plasmaproben, die DNA-Präparation und die Probenvorbereitung für die automatisierte qPCR.

Im Rahmen beider Teilprojekte wurde die Datenerfassung und -evaluierung inklusive graphischer Aufbereitung und statistischer Auswertung selbstständig von mir vorgenommen. Des Weiteren habe ich beide Manuskripte verfasst, Änderungsvorschläge der Co.-Autoren und Reviewer eingearbeitet und war in Folge für die Abwicklung der Einreich- und Review-Prozesse zuständig.

4.2 ORIGINALMANUSKRIPTE

4.2.1 Veröffentlichung I

Quantitative analysis of individual cell-free DNA concentration before and after penetrating trauma.

Brodbeck K, Kern S, Schick S, Steinbrück A, Schwerer M, Bayer B, Anslinger K, Peldschus S

Int J Legal Med 2018; 133 (2): 385-393.

doi.org/10.1007/s00414-018-1945-y

4.2.2 Veröffentlichung II

Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course.

Brodbeck K, Schick S, Bayer B, Anslinger K, Krüger K, Mayer Z, Holdenrieder S, Peldschus S

Int J Legal Med 2020; 134 (3): 911-919.

doi.org/10.1007/s00414-019-02240-9

4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Dissertation präsentiert eine umfassende Analyse von individuellen cfDNA-Änderungen und die Qualifikation der Vorgehensweise für zukünftige Versuchsreihen zur Entstehung oberflächlicher Verletzungen geringer Schwere. Beide Studien, welche im Fokus dieser Arbeit stehen, vereint der gemeinsame Nenner eines definierten Versuchsablaufs mit möglichst einheitlichen Bedingungen für Patienten und Probanden, um individuelle Konzentrationsänderungen zu analysieren. Des Weiteren wurde die cfDNA in beiden Projekten unter Anwendung der gleichen (prä-)analytischen Verfahren quantifiziert. Dadurch konnten Informationen über die Größenordnung von cfDNA-Änderungen in zwei verschiedenen Setups gewonnen werden, welche nun zueinander in Relation gesetzt werden können.

„Quantitative analysis of individual cell-free DNA concentration before and after penetrating trauma“ repräsentiert ein Projektkonzept, in welchem erstmalig zu bestimmten Zeitpunkten vor und direkt nach schwerem Trauma individuelle Konzentrationsänderungen analysiert wurden. Der Fokus auf eine induzierte Verletzung durch orthopädische Operation eröffnet dabei die Möglichkeit, ein relativ definiertes Trauma zu untersuchen, wodurch im Hinblick auf bisherige Trauma-Studien eine verbesserte Vergleichbarkeit interindividueller Anstiege gegeben ist.

Nichtsdestotrotz kann ohne Kenntnis der Basisfluktuation keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um tatsächliche cfDNA-Anstiege aufgrund des Traumas handelt, oder ob diese Konzentrationsänderungen in den Bereich der natürlichen Schwankung fallen. Deshalb wurde in „Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course“ die natürliche Varianz der zellfreien DNA in weiblichen Probanden ermittelt, wobei die intraindividuellen cfDNA-Änderungen ebenfalls im Rahmen eines kontrollierten Versuchssettings unter einheitlichen Studienbedingungen für die Probanden (z.B. liegende Ruheposition während der kompletten Versuchsdurchführung) erhoben wurden. Es wurde eine homogene Studienpopulation gewählt, da auf Basis der derzeitigen Datenlage nicht ausgeschlossen werden kann, dass demographische Faktoren einen Einfluss auf die cfDNA haben (vgl. zum Beispiel [46]). Im Zusammenhang mit dem angestrebten innovativen Nachweis von Bagatellverletzungen durch cfDNA werden in Zukunft ebenfalls weibliche Freiwillige präferiert rekrutiert, da Frauen leichter Hämatome entwickeln. Für eine umfassende Analyse von interindividuellen Varianzen werden jedoch weitere Studien benötigt.

Die vorgelegten Resultate verdeutlichen initial die Relevanz, tatsächliche relative Anstiege aufgrund eines Traumas durch Kenntnis des individuellen Basislevels zu beurteilen und weniger erhöhte absolute Konzentrationen zu bewerten. Die präoperativ gemessenen cfDNA-Werte schwankten nämlich deutlich zwischen den Orthopädie-Patienten. Dies führte in Folge dazu, dass beispielsweise in einem der Patienten direkt nach der Operation der dritthöchste absolute Wert nachgewiesen wurde, dieser jedoch nur der sechstgrößten relativen Änderung entsprach.

Das postoperative Level war sowohl direkt nach dem Eingriff (Tag0) als auch am Tag darauf (Tag1) signifikant erhöht. Der maximale Anstieg wurde direkt nach der Operation verzeichnet und betrug das 19-fache des Basislevels. An Tag1 wurde eine maximale Erhöhung auf das 4,7-fache festgestellt. Auf dieser Grundlage werden vorherige Studien untermauert, welche maximale cfDNA-Konzentrationen direkt nach Trauma postulierten [41, 49, 86]. Des Weiteren stehen die anhaltenden Konzentrationserhöhungen an Tag1 ebenfalls mit früheren Publikationen in Einklang: Szpechcinski et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass das Plasma-DNA-Level auch noch am siebten Tag nach Operation erhöht sein kann [66]. Die Ergebnisse demonstrieren somit die Schwierigkeit, den Basiswert einer Person im Nachhinein, also nach einem abgeklungenen Trauma bzw. nach einer geheilten Verletzung, zu erfassen.

Betrachtet man die cfDNA-Änderungen des ersten Teilprojektes auf individueller Ebene im Detail, so konnte in allen Patienten an Tag0 eine Zunahme der cfDNA beobachtet werden, wobei in neun von zehn Studienteilnehmern das Level mindestens verdoppelt war. In einem Patienten wurde jedoch nur das 1,8-Fache des Ausgangswertes festgestellt. Obwohl in dieser Studie kein Bezug zwischen dem cfDNA-Level und der Verletzungsschwere durch den Eingriff hergestellt werden konnte (Knie- versus Hüft-OP), liegt es in Anlehnung an frühere Studien (vgl. [41, 49, 76]) dennoch nahe, dass bei einer Bagatellverletzung noch geringere Anstiege zu verzeichnen sind.

Insbesondere bei einer leichten Konzentrationsänderung ist die Zuordnung dieser zu einer natürlichen Basiswertschwankung oder zu einem tatsächlichen Anstieg aufgrund des Traumas entscheidend. Die Ergebnisse der nachfolgenden Studie zeigen in diesem Zusammenhang eine recht geringe Schwankungsbreite der cfDNA im Ruhezustand, wobei die relativen Änderungen einen Interdezilbereich von 0,5 bis 1,4 umfassten. Unter Berücksichtigung der angewandten (prä-) analytischen Verfahren sowie der untersuchten weiblichen

Studienpopulation kann dieser Schwankungsbereich als Basisfluktuation betrachtet werden. Nichtsdestotrotz muss im Einzelfall auch mit einem Konzentrationsanstieg bis auf das 1,6-fache im Rahmen einer natürlichen Variation gerechnet werden. Obwohl auch männliche Patienten im ersten Teilprojekt untersucht wurden, geht die Autorin dennoch davon aus, dass die verzeichneten Konzentrationsanstiege direkt nach der Operation auf den Eingriff zurückzuführen sind und nicht auf eine Basiswertschwankung.

Die größte Schwankung in Relation zum 0min-Wert wurde in der zweiten Studie am Anfang der Zeitreihe bei 10min beobachtet. Hummel et al. zeigten, dass physische wie auch psychosoziale Belastungen eine erhöhte cfDNA-Freisetzung verursachen können [74]. Da die Venenpunktion aufgrund des penetrierenden Traumas und des damit verbundenen Schmerzes einen gewissen Stressfaktor darstellt, erscheint es denkbar, dass die erhöhte Konzentration zu diesem Zeitpunkt durch die Positionierung der Venenverweilkanüle verursacht wurde. Diese Tatsache sollte bei der Planung des Trauma-Zeitpunktes in Fallkörperversuchen zur experimentellen Erzeugung von subkutanen Hämatomen und dem angestrebten Verletzungsnachweis durch cfDNA berücksichtigt werden. Der Zeitpunkt sollte folglich so gewählt werden, dass sich potentielle Konzentrationsanstiege aufgrund des stumpfen Traumas nicht mit denen überschneiden, welche ggf. durch die Venenpunktion verursacht werden.

Nichtsdestotrotz war die beobachtete biologische Variabilität der cfDNA letztlich zu gering, um sie zuverlässig von der analytischen Varianz zu unterscheiden. Es konnte somit nicht festgestellt werden, ob sich das cfDNA-Level zu den verschiedenen Zeitpunkten tatsächlich in Form einer natürlichen Schwankung ändert, oder ob es sich um Messungenauigkeiten handelt. Die ermittelte Schwankungsbreite über 75 Minuten (CV von 21 %) ist jedoch ähnlich dem Wert, welcher von Tranberg Madsen et al. rapportiert wurde (CV von 25 %), indem sie die intraindividuelle Variabilität über den Tag im Abstand von drei Stunden analysierten [52]. Die natürliche Varianz der Enzyme CK und AST war ebenfalls sehr gering, wobei der gesamte Schwankungsbereich nur relative Änderungen von 0,7 bis 1,1 für die Kreatinkinase und von 0,6 bis 1,2 für die Aspartat-Aminotransferase umfasste. Die Resultate der CK decken sich mit den Ergebnissen von Gutenbrunner, der die zirkadiane Fluktuation des Enzyms in Freiwilligen untersuchte und dabei im Ruhezustand fast keine Änderungen feststellen konnte [93]. Darüber hinaus könnte der hoch standardisierte Quantifizierungsprozess der CK und AST, ohne vorherige Extraktion aus Blutplasma, ein weiterer Grund für die geringe Schwankungsbreite der Enzyme sein.

Durch die umfassende Analyse individueller Konzentrationsänderungen im Rahmen der vorgelegten Studien wurde die Zielsetzung der Dissertation erreicht und eine Datengrundlage für den molekularen Nachweis von Bagatellverletzungen durch cfDNA geschaffen. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis eines Konzentrationsanstiegs in einer Person vor und nach Verletzungseintritt mit den angewandten Methoden erbracht werden kann, wobei sich das maximale Level unmittelbar nach Verletzungseintritt einstellt. Die Größenordnung der Konzentrationsanstiege nach schwerem Trauma dient als möglicher Anhaltspunkt für zukünftige Studien. Konzentrationsänderungen aufgrund der natürlichen Schwankung sind recht gering und fallen unter Berücksichtigung der verwendeten Verfahren in den Bereich der analytischen Varianz. Da gezeigt werden konnte, dass im Einzelfall auch nach schwerem Trauma nur geringe Konzentrationsanstiege möglich sind, bleibt es zu klären, ob sich eine Änderung der cfDNA aufgrund eines experimentellen diskreten Traumas von der biologischen und analytischen Variabilität abgrenzen lässt. Dies kann auf Basis der dargelegten Grundlagen nun in Folgestudien überprüft werden.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Subkutanes Hämatom erzeugt durch experimentelles stumpfes Trauma.	11
Abbildung 2 Exemplarisches Menschmodell GHBMC M50 v.1.6 aus unterschiedlichen Perspektiven.	14

LITERATURVERZEICHNIS

1. Brodbeck K, Schick S, Mayer Z, Peldschus S, Holdenrieder S (2019) Biological and preanalytical variations of cfDNA concentration in individuals. 11th CNAPS International Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, 23. – 25. September in Jerusalem.
2. Grassberger M, Yen K (2013) Allgemeine klinisch-forensische Traumatologie. In: Grassberger M, Yen K, Türk E eds *Klinisch-forensische Medizin*. Vienna, Springer Vienna. pp 179–226.
3. Dettmeyer RB, Verhoff MA (2011) Forensische Traumatologie. In: Dettmeyer RB, Verhoff MA eds *Rechtsmedizin*, 1. Auflage. Heidelberg, Springer Medizin Verlag. pp 38–100.
4. Wegener R, Wehner H-D, Madea B, Tsokos M, Bratzke H, Oehmichen M, Pollak S, Maxeinert H, Keil W, Kettner M, Schmidt P, Lignitz E, Thierauf A, Banaschak S, Bajanowski T, Geserick G, Lessig R, Henn V, Buschmann C, Kleber C (2015) Traumatologie und gewaltsamer Tod. In: Madea B ed *Rechtsmedizin*, 3. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 171–418.
5. Camps FE (1952) Interpretation of wounds. *The BMJ* 2 770–772. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4787.770>
6. Saukko PJ, Bernard K (2004) The pathology of wounds. In: Saukko PJ ed *Knight's forensic pathology*, 3. Auflage. London, Edward Arnold Ltd. pp 136–173.
7. Langlois NEI, Gresham GA (1991) The ageing of bruises: A review and study of the colour changes with time. *Forensic Science International* 50 (2): 227–238. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(91\)90154-B](https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90154-B)
8. Bohnert M, Baumgartner R, Pollak S (2000) Spectrophotometric evaluation of the colour of intra- and subcutaneous bruises. *International Journal of Legal Medicine* 113 (6): 343–348. <https://doi.org/10.1007/s004149900107>

9. Vanezis P (2001) Interpreting bruises at necropsy. *Journal of Clinical Pathology* 54 (5): 348–355. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.54.5.348>
10. Mühlbauer JA (2016) In Vivo Kollisionsuntersuchungen an den Oberen Extremitäten zur Ermittlung von Schmerz- und Belastungsgrenzen von Weichgewebe vor dem Hintergrund der Mensch-Roboter-Kollaboration. Master Thesis, Technische Universität München.
11. Lombardi M, Canter J, Patrick PA, Altman R (2015) Is fluorescence under an alternate light source sufficient to accurately diagnose subclinical bruising? *Journal of Forensic Sciences* 60 (2): 444–449. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12698>
12. Randeberg LL, Winnem AM, Langlois NE, Larsen ELP, Haaverstad R, Skallerud B, Haugen OA, Svaasand LO (2007) Skin changes following minor trauma. *Lasers in Surgery and Medicine* 39 (5): 403–413. <https://doi.org/10.1002/lsm.20494>
13. Dempsey N, Blau S (2020) Evaluating the evidentiary value of the analysis of skeletal trauma in forensic research: A review of research and practice. *Forensic Science International* 307 110140. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110140>
14. International Organization for Standardization (2016) Robots and robotic devices - Collaborative robots. ISO/TS 15066: 2016(E). Schweiz.
15. Matthias B, Ding H (2013) Die Zukunft der Mensch-Roboter Kollaboration in der industriellen Montage. In Van de Venn HW, Tagungsband Internationales Forum Mechatronik, 30. - 31. Oktober, in Winterthur. Winterthur: Internationales Forum Mechatronik. <https://digitalcollection.zhaw.ch/handle/11475/7322>
16. Bir C, Viano DC (2004) Design and injury assessment criteria for blunt ballistic impacts. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 57 (6): 1218–1224.
17. Barington K, Skovgaard K, Henriksen NL, Johansen ASB, Jensen HE (2018) The intensity of the inflammatory response in experimental porcine bruises depends on time, anatomical location and sampling site. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 58 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.06.005>
18. Barington K, Jensen HE, Skovgaard K (2017) Forensic aspects of gene expression signatures for age determination in bruises as evaluated in an experimental porcine model. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 13 (2): 151–160.

<https://doi.org/10.1007/s12024-017-9869-2>

19. Meyer W (1996) Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Der Hautarzt* 47 (3): 178–182. <https://doi.org/10.1007/s001050050399>
20. Brodbeck K, Lanzl F, Mühlbauer JA, Schick S, Graw M, Peldschus S (2019) Experimentelle Erzeugung von subkutanen Hämatomen in Freiwilligen durch unterschiedliche Impaktorgeometrien. In: 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin Hamburg, 17. – 21. September 2019; *Rechtsmedizin*. pp 346–347.
21. Prosch H (2016) Sonographie der Thoraxwand. In: Mathis G ed *Bildatlas der Lungensonographie*, 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 11–22.
22. Helm T, Bir C, Chilstrom M, Claudius I (2016) Ultrasound characteristics of bruises and their correlation to cutaneous appearance. *Forensic Science International* 266 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.05.022>
23. Rowan P, Hill M, Gresham GA, Goodall E, Moore T (2010) The use of infrared aided photography in identification of sites of bruises after evidence of the bruise is absent to the naked eye. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 17 (6): 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2010.04.007>
24. McIlroy DJ, Bigland M, White AE, Hardy BM, Lott N, Smith DW, Balogh ZJ (2015) Cell necrosis-independent sustained mitochondrial and nuclear DNA release following trauma surgery. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 78 (2): 282–288. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000000519>
25. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ (2018) The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: A critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews* 93 (3): 1649–1683. <https://doi.org/10.1111/brv.12413>
26. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J (2016) Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 164 (1–2): 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>
27. Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD (2002) Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry* 48 (3): 421–427. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.3.421>

28. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y (2008) Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica Chimica Acta* 387 (1–2): 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.09.001>
29. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD (1998) Cell-free DNA in human blood plasma. *Pancreas* 17 (1): 89–97. <https://doi.org/10.1097/00006676-199807000-00012>
30. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* 61 (4): 1659–65.
31. Lam NYL, Rainer TH, Chan LYS, Joynt GM, Lo YMD (2003) Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clinical Chemistry* 49 (8): 1286–1291. <https://doi.org/10.1373/49.8.1286>
32. Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, Dwivedi DJ, Xu MK, McDonald E, Marshall JC, Fox-Robichaud AE, Charbonney E, Liaw PC (2019) Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental* 7 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0251-4>
33. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A (2019) Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy* 20 (8): 1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
34. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P (2010) A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* 185 (12): 7413–7425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>
35. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics* 64 (1): 218–224. <https://doi.org/10.1086/302205>
36. Breiter T, Fragasso A, Hudemann J, Nieß AM, Simon P (2011) Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical Chemistry* 57 (4): 633–636. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.158030>

37. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine* 14 (9): 985–990. <https://doi.org/10.1038/nm.1789>
38. Yu SCY, Lee SWY, Jiang P, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK, Lo YMD (2013) High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical Chemistry* 59 (8): 1228–1237. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203679>
39. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Von Pawel J, Schalhorn A, Nagel D, Seidel D (2006) Circulating nucleosomes in serum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 945 (1): 93–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03869.x>
40. Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M (1996) Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *The Journal of Immunology* 156 (3): 1151–6.
41. Naumann DN, Hazeldine J, Dinsdale RJ, Bishop JR, Midwinter MJ, Harrison P, Hutchings SD, Lord JM (2017) Endotheliopathy is associated with higher levels of cell-free DNA following major trauma: A prospective observational study. *PLOS ONE* 12 (12): e0189870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189870>
42. Liaw PC, Ito T, Iba T, Thachil J, Zeerleder S (2016) DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Reviews* 30 (4): 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.12.004>
43. Tug S, Tross A-K, Hegen P, Neuberger EWI, Helmig S, Schöllhorn W, Simon P (2017) Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma. *PLOS ONE* 12 (9): e0184668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184668>
44. Stawski R, Walczak K, Kosielski P, Meissner P, Budlewski T, Padula G, Nowak D (2017) Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PLOS ONE* 12 (5): e0178216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178216>
45. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, Gori T, Ehlert T, Beiter T, Simon P (2014) Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLOS ONE* 9 (3): e87838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087838>

46. Meddeb R, Dache ZAA, Thezenas S, Otandault A, Tanos R, Pastor B, Sanchez C, Azzi J, Tousch G, Azan S, Mollevi C, Adenis A, El Messaoudi S, Blache P, Thierry AR (2019) Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports* 9 (1): 5220. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41593-4>
47. Jylhävä J, Kotipelto T, Raitala A, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M (2011) Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: The vitality 90+ study. *Mechanisms of Ageing and Development* 132 (1–2): 20–26.
48. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama J, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M (2016) Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Science Advances* 2 (3): e1501332.
49. Timmermans K, Kox M, Vaneker M, Van den Berg M, John A, Van Laarhoven A, Van der Hoeven H, Scheffer GJ, Pickkers P (2016) Plasma levels of danger-associated molecular patterns are associated with immune suppression in trauma patients. *Intensive Care Medicine* 42 (4): 551–561. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-4205-3>
50. Vieira de Sousa M, Madsen K, Fukui R, Santos A, Rossi da Silva ME (2012) Carbohydrate supplementation delays DNA damage in elite runners during intensive microcycle training. *European Journal of Applied Physiology* 112 (2): 493–500. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2000-6>
51. Korabecna M, Horinek A, Bila N, Opatrna S (2011) Circadian rhythmicity and clearance of cell-free DNA in human plasma. In Gahan PB, *Tagungsband 6th CNAPS International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*, 9. - 11. November 2009 in Hongkong. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9382-0>
52. Tranberg Madsen A, Andersen Hojbjerg J, Sandahl Sorensen B, Winther-Larsen A (2019) Day-to-day and within-day biological variation of cell-free DNA. *EBioMedicine* 49 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.008>
53. Pölcher M, Ellinger J, Willems S, El-Maarri O, Höller T, Amann C, Wolfgarten M, Rudlowski C, Kuhn W, Braun M (2010) Impact of the menstrual cycle on circulating cell-free DNA. *Anticancer Research* 30 (6): 2235–2240.
54. Gahan PB (2010) *Circulating nucleic acids in plasma and serum: Diagnosis and*

- prognosis in cancer. *EPMA Journal* 1 (3): 503–512. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0021-6>
55. Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, Marcolongo R (2003) Dosage and characterization of circulating DNA: Present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews* 2 (1): 50–55. [https://doi.org/10.1016/S1568-9972\(02\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9972(02)00101-5)
 56. Fragoulis GE, Vakrakou AG, Papadopoulou A, Germenis A, Kanavakis E, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN (2015) Impaired degradation and aberrant phagocytosis of necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity* 56 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.08.004>
 57. Jeong DW, Moon J-Y, Choi Y-W, Moon H, Kim K, Lee Y-H, Kim S-Y, Kim Y-G, Jeong K-H, Lee S-H (2015) Effect of blood pressure and glycemic control on the plasma cell-free DNA in hemodialysis patients. *Kidney Research and Clinical Practice* 34 (4): 201–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.krcp.2015.09.002>
 58. Sikora K, Bedin C, Vicentini C, Malpeli G, D'Angelo E, Sperandio N, Lawlor RT, Bassi C, Tortora G, Nitti D, Agostini M, Fassan M, Scarpa A (2015) Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies. *The International Journal of Biological Markers* 30 (1): 136–141. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000088>
 59. Rykova E, Sizikov A, Roggenbuck D, Malpeli G, D'Angelo E, Sperandio N, Lawlor RT, Bassi C, Tortora G, Nitti D, Agostini M, Fassan M, Scarpa A (2017) Circulating DNA in rheumatoid arthritis: Pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Research & Therapy* 19 (1): 85. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1295-z>
 60. Fujihara J, Takinami Y, Ueki M, Kimura- Kataoka K, Yasuda T, Takeshita H (2019) Circulating cell-free DNA fragment analysis by microchip electrophoresis and its relationship with DNase I in cardiac diseases. *Clinica Chimica Acta* 497 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.014>
 61. Bustamante A, Mancha F, Macher HC, García-Berrocso T, Giralt D, Ribó M, Guerrero JM, Montaner J (2016) Circulating cell-free DNA is a predictor of short-term neurological outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *Journal of Circulating Biomarkers* 5 (1). <https://doi.org/10.1177/1849454416668791>

62. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B (2012) Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* 120 (6): 1157–1164. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-412197>
63. Jiang J, Chen X, Sun L, Qing Y, Yang X, Hu X, Yang C, Xu T, Wang J, Wang P, He L, Dong C, Wan C (2018) Analysis of the concentrations and size distributions of cell-free DNA in schizophrenia using fluorescence correlation spectroscopy. *Translational Psychiatry* 8 (1): 104. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0153-3>
64. Pai M-C, Kuo Y-M, Wang I-F, Chiang P-M, Tsai K-J (2019) The role of methylated circulating nucleic acids as a potential biomarker in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 56 (4): 2440–2449. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1229-z>
65. Wang L, Xie L, Zhang Q, Cai X, Tang Y, Wang L, Hang T, Liu J, Gong J (2015) Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coronary Artery Disease* 26 (4): 296–300.
66. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W, Maszkowska-Kopij K, Dancewicz M, Kowalewski J, Orlowski T (2012) Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12 (Suppl. 1): S3–S9. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.668519>
67. Cepika AM, Soldo Jureša D, Morović Vergles J, Malenica B, Šantak M, Kapitanović S, Mayer M, Anić B, Sentić M, Gagro A (2012) Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. *Cellular Immunology* 276 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.009>
68. Chen M, Zhao H (2019) Next-generation sequencing in liquid biopsy: Cancer screening and early detection. *Human Genomics* 13 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>
69. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM (1998) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics* 62 (4): 768–775. <https://doi.org/10.1086/301800>
70. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, Clarke A,

- Quenby S, Clarke A (2016) Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 6 (1): e010002. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010002>
71. Zerres K, Koppermann S (2019) Tests auf Trisomien - Wie sollen wir mit pränatalen Bluttests umgehen? *Pädiatrie* 31 (6): 52–53. <https://doi.org/10.1007/s15014-019-1818-y>
72. Kagan K, Eiben B, Kozlowski P (2014) Combined first trimester screening and cell-free fetal DNA – “Next Generation Screening”. *Ultraschall in der Medizin - European Journal of Ultrasound* 35 (03): 229–236.
73. Breitbach S, Tug S, Simon P (2012) Circulating cell-free DNA. *Sports Medicine* 42 (7): 565–586. <https://doi.org/10.2165/11631380-000000000-00000>
74. Hummel EM, Hesses E, Müller S, Breiter T, Fisch M, Eibl A, Wolf OT, Giebel B, Platen P, Kumsta R, Moser DA (2018) Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational Psychiatry* 8 (1): 236. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0264-x>
75. Lo YMD, Rainer TH, Chan LYS, Hjelm NM, Cocks RA (2000) Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical Chemistry* 46 (3): 319–323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18480-2_17
76. Stortz JA, Hawkins RB, Holden DC, Raymond SL, Wang Z, Brakenridge SC, Cuschieri J, Moore FA, Maier RV, Moldawer LL, Efron PA (2019) Cell-free nuclear, but not mitochondrial, DNA concentrations correlate with the early host inflammatory response after severe trauma. *Scientific Reports* 9 (1): 13648. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50044-z>
77. Wang H-C, Lin Y-T, Hsu S-Y, Tsai N-W, Lai Y-R, Su Y-J, Kung C-T, Lu C-H (2019) Serial plasma DNA levels as predictors of outcome in patients with acute traumatic cervical spinal cord injury. *Journal of Translational Medicine* 17 (1): 329. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2084-z>
78. Ren B, Liu F, Xu F, He J, Zhu H, Zou G (2013) Is plasma cell-free DNA really a useful marker for diagnosis and treatment of trauma patients? *Clinica Chimica Acta* 424 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.015>

79. Ahmed A, Soliman R, Samir S (2016) Cell free DNA and procalcitonin as early markers of complications in ICU patients with multiple trauma and major surgery. *Clinical Laboratory* 62 (12): 2395–2404.
80. Fox A, Gal S, Fisher N, Smythe J, Wainscoat J, Tyler MPH, Watt SM, Harris AL (2008) Quantification of circulating cell-free plasma DNA and endothelial gene RNA in patients with burns and relation to acute thermal injury. *Burns* 34 (6): 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.10.003>
81. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, Sagi A, Douvdevani A (2014) Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: Quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. *BioMed Research International* 2014.
82. Altrichter J, Zedler S, Kraft R, Faist E, Mitzner SR, Sauer M, Windolf J, Scholz M, Lögters T (2010) Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* 36 (6): 551–557. <https://doi.org/10.1007/s00068-010-0013-1>
83. Macher H, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Gordillo-Escobar E, Enamorado-Enamorado J, Boza A, Rodriguez A, Molinero P, Guerrero JM, Dominguez-Roldán JM, Murillo-Cabezas F, Rubio A (2012) Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. *Clinica Chimica Acta* 414 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.001>
84. Filho EMR, Simon D, Ikuta N, Klován C, Dannebrock FA, Oliveira de Oliveira C, Regner A (2014) Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 31 (19): 1639–1646. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3178>
85. Shaked G, Douvdevani A, Yair S, Zlotnik A, Czeiger D (2014) The role of cell-free DNA measured by a fluorescent test in the management of isolated traumatic head injuries. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 22 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-22-21>
86. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J (2008) Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs). *Shock* 30 (4): 352–358.
87. Wijeratne S, Butt A, Burns S, Sherwood K, Boyd O, Swaminathan R (2004) Cell-free

- plasma DNA as a prognostic marker in intensive treatment unit patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1022 (1): 232–238. <https://doi.org/10.1196/annals.1318.036>
88. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta* 424 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>
 89. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, Georgiadis A, Phallen J, Brahmer J, Azad N, Browner I, Laheru D, Velculescu VE, Sausen Mark, Diaz LA (2017) The effect of preservative and temperature on the analysis of circulating tumor DNA. *Clinical Cancer Research* 23 (10): 2471–2477. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1691>
 90. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, Huggett JF (2014) Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (26): 6499–6512. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7835-3>
 91. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ (2015) Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta* 450 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.028>
 92. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DMI, Leszinski GS, Siegele B, Stötzer OJ, Nagel D, Holdenrieder S (2011) Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clinica Chimica Acta* 412 (23–24): 2085–2088. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.011>
 93. Gutenbrunner C (2000) Circadian variations of the serum creatine kinase level - A masking effect? *Chronobiology International* 17 (4): 583–590. <https://doi.org/10.1081/CBI-100101065>

DANKSAGUNG

Bereits seit meinem Studium haben sehr viele Menschen, insbesondere am Institut für Rechtsmedizin, einen unschätzbaren Anteil an meinem Werdegang geleistet, wofür ich an dieser Stelle allen herzlich danken möchte.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Steffen Peldschus, der seit vielen Jahren hinter mir steht und bei dem ich mich immer gut betreut gefühlt habe. Ich möchte mich insbesondere dafür bedanken, dass er neuen, innovativen Themen gegenüber aufgeschlossen war und somit diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Matthias Graw für die Möglichkeit einer Promotion am Institut für Rechtsmedizin bedanken sowie für die vielen lehrreichen Einblicke im Rahmen der Obduktion.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Sylvia Schick, die mir wirklich immer beratend zur Seite gestanden und mich durch konstruktives Feedback stets motiviert hat. Durch ihre Bereitschaft bei den Freiwilligenversuchen mitzuwirken sowie durch ihre Hilfestellung bei jeglichen statistischen Belangen hat sie einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Kollegen und Freunden Felicitas Lanzl und Eva Nuspl, die auch außerhalb der Arbeit für Rückhalt und moralische Unterstützung gesorgt haben. Außerdem möchte ich Felicitas Lanzl für ihre Geduld bei allen IT-Problemen danken. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die angeregten fachlichen Diskussionen.

Ich möchte mich außerdem bei allen Studenten bedanken, die mich bei den Freiwilligenversuchen sowie im Labor kompetent unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Stefanie Kern, die in der initialen Phase wertvolle Arbeit unter erschwerten Bedingungen geleistet hat, sowie Sophie Kreißig, Magdalena Matzke und Lara Fetzer, die alle eine große Hilfe für die Umsetzung meiner Doktorarbeit waren.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen internen sowie externen Kooperationspartnern, insbesondere Dr. Katja Anslinger, Birgit Bayer und Dr. Arnd Steinbrück sowie den Kollegen vom Deutschen Herzzentrum München Prof. Dr. Stefan Holdenrieder, Dr. Zsuzsanna Mayer und Kimberly Krüger, bei denen ich mich immer willkommen gefühlt habe.

Abschließend möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem privaten Umfeld danken, ohne die ich den langen Weg niemals geschafft hätte. Allen voran möchte ich mich

bei meiner Mama für ihren unerschütterlichen Glauben an mich danken. Ein weiteres Dankeschön gilt Anita, die mir während schwierigen Zeiten ein stabiles Umfeld ermöglicht hat. Und zu guter Letzt gilt mein größter Dank meinem Fels in der Brandung, der mir tagtäglich mit seiner liebevollen und ausdauernden Geduld den Rücken freihält.