

TARTU ÜLIKOOL
Sporditeaduste ja füsioteraapia instituut

Marianne Haug

Rakuvaba DNA spordis
Cell-free DNA in sport

Bakalaureusetöö

Kehalise kasvatuse ja spordi õppekava

Juhendaja:
Lektor M. Mooses (PhD)

Tartu, 2017

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. MIS ON cf-DNA?	5
2. cf-DNA MARKERINA SPORDIFÜSIOLOOGIAS	6
3. cf-DNA MÕÕTMINE.....	9
4. cf-DNA TEKKIMINE.....	11
4.1. Apoptoos ja nekroos	14
4.2. ROS – reaktiivsed hapnikuühendid	14
4.3. cf-DNA ja laktaat.....	15
4.4. NEToos – neutrofiilide ekstratsellulaarsed lõksud	16
4.5. Aktiivne cf-DNA vabastamine ja leukotsüütide oksüdatiivne lõhkemine.....	18
5. cf-DNA EEMALDAMINE.....	19
6. AKUUTSE KEHALISE KOORMUSE MÕJU cf-DNA'LE.....	20
7. KROONILISE KEHALISE KOORMUSE MÕJU cf-DNA'LE.....	23
KOKKUVÕTE.....	26
KASUTATUD KIRJANDUS	27
SUMMARY	33
LISA 1	34
LISA 2	36
AUTORI LIHTLITSENTS	37

KASUTATUD LÜHENDID

ADP (*adenosine diphosphate*) – adensiindifosfaat

ALU – kordus-DNA-järjestus, mis sisaldab restriiktaas Alu saiti

AMP (*adenosine monophosphate*) – adensiinmonofosfaat

AnT (*anaerobic threshold*) – anaeroobne lävi

ATP (*adenosine triphosphate*) – adensiintrifosfaat

Ca²⁺ - kaltsiumioon

cf-DNA (*cell-free DNA*) – rakuvaba DNA

cf-mtDNA (*cell-free mitochondrial DNA*) – mitokondriaalne rakuvaba DNA

cf-nDNA (*cell-free nuclear DNA*) – tuuma rakuvaba DNA

CK (*creatine kinase*) – kreatiinkinaas

CRP (*C-reactive protein*) – süsinikreaktiivne proteiin

DNA – desoksüribonukleiinhape

DNaas – üksikahelalist DNA'd lagundav ensüüm

HMGB1 (*high mobility group box 1*) – proteiin

IL-6 (*interleukin 6*) – tsütokiin

K⁺ – kaaliumioon

KM – kordusmaksimum

LIPA2 – genoomjärjestus

Na⁺ – naatriumioon

Na⁺/K⁺ ATPaas – rakumembraani transporter

nDNA (*nuclear DNA*) – rakutuuma DNA

NET (*neutrophil extracellular traps*) – neutrofiili ekstratsellulaarsed lõksud

nm – nanomeeter

PCI (*phenol-chloroform isolation*) – cf-DNA mõõtmise meetod

PCR (*polymerase chain reaction*) – polümeraasi ahelreaktsioon

QIA – cf-DNA mõõtmise meetod

qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

ROS (*reactive oxygen species*) – reaktiivsed hapnikuühendid

UA (*urid acid*) – urea

VO_{2max} – maksimaalne hapnikutarbimine

SISSEJUHATUS

Käesoleva uurimisteema bakalaureusetöö kirjutamiseks valisin seepärast, et ma olen juba väiksest peale olnud spordihuviline ning eelmisel õppeaastal geenitehnoloogiat kõrvalerialana õppides kuulsin väga üldiselt rakuvaba DNA-st (*cell free DNA* ehk cf-DNA). Teema hakkas mind huvitama ning parimaks väljundiks selle uurimisele nägin lõputöö kirjutamist antud valdkonnas. cf-DNA on varasemalt peamist kajastust leidnud meditsiinis, millest järk-järgult on vastavad teadmised leidnud tee sporditeadustesse. Eelnevast lähtuvalt on teadusuuringud cf-DNA rollist treeningkoormuse markerina tagasihoidlikud, kuid samas paljulubavad. Bakalaureusetöös annan ülevaate seni teaduslikult tõestatud seostest cf-DNA ja spordi vahel.

Cf-DNA on kaheaheelaline vereplasmas või –seerumis asuv DNA fragment, mis on rakust väljunud raku vigastuse või surma korral (Breitbach et al., 2012). Suurimaks väljakutseks antud teema puhul on hetkel küsimus, millest ja kuidas cf-DNA tekib, sest tema kontsentratsiooni tase veres suureneb väga järsult kehalise koormuse tõttu ning käitub sarnaselt laktaadi kontsentratsioonile. Uuringute põhjal on ebatõenäoline, et cf-DNA vabastamine akuutsete harjutuste korral toimub tüüpilise raku nekroosi ja apoptoosi puhul. Hiljuti kirjeldati DNA vabastamise mehhanism NEToos, mis on patogeeni(de) poolt indutseeritud raku surm. Just kroonilised haigused ning järjepidevad kõrge intensiivsusega vastupidavustreeningud kutsuvad organismis esile kroonilise põletiku ning põhjustavad püsivat cf-DNA kontsentratsiooni tõusu (Breitbach et al., 2012).

On arvatud, et kõrgem cf-DNA tase võib olla ületreeningu sündroomi markeriks ning potentsiaalselt seotud immuunsüsteemi muutustega, mis on tingitud kehalisest koormusest, kuid hetkel ei ole veel kõik seda kinnitanud. Seega on cf-DNA olulisus ületreeningu, sooritustaseme ja füüsilise kurnatuse taseme suhtes ebaselge. Spordimeditsiini uuring keskendub treeningute põhjal akuutsele cf-DNA kontsentratsiooni tõusule. Põletikulised reaktsioonid organismis ei ole ainult seotud haigustega, vaid viitavad ka füüsilisele kurnatusele. On teada, et kõrge kehaline aktiivsus on seotud oksüdatiivse stressiga ehk leukotsüütide põletikuliste vastuste, mehaanilise ja metaboolse lihaskahjustuse ja DNA kahjustusega ning see põhjustab cf-DNA kontsentratsiooni tõusu (Breitbach et al., 2012). Praeguseks läbiviidud uuringute (lisa 1; lisa 2) põhjal on teada, et cf-DNA tase suureneb järsult kehalise koormuse tõttu, kuid pole teada tema vabastamise mehhanismid ning kindlad seosed ületreeningu, sooritustaseme ja füüsilise kurnatusega.

Märksõnad: rakuvaba DNA (cf-DNA), kehaline koormus, cf-DNA vabastamise mehhanismid
Keywords: cell free DNA (cf-DNA), physical exercise, cf-DNA release mechanisms

1. MIS ON cf-DNA?

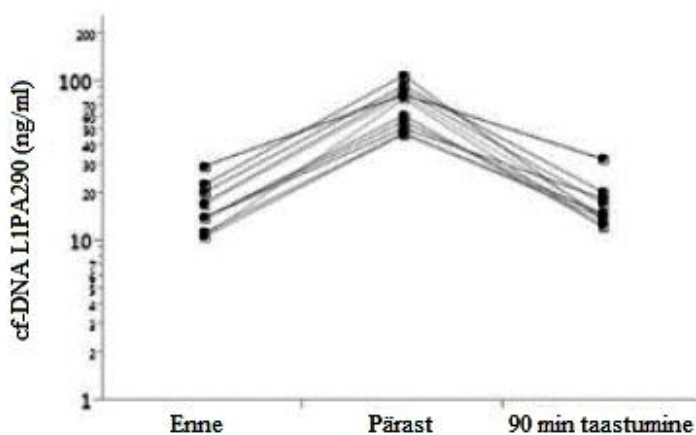
Cf-DNA on kaheaheelaline vereplasmas või –seerumis leitav DNA fragment, mis on rakust väljunud arvatavalt raku vigastuse või surma korral. Väike osa cf-DNA'st esineb vereringes mononukleosoomidena (Breitbach et al., 2012). Kõige efektiivsem on cf-DNA kontsentratsiooni määrata venoosse ja/või kapillaarse vere plasmast (Albus et al., 2015).

Mitmed uuringud (Leon et al., 1977; Margraf et al., 2008) on seostanud cf-DNA kontsentratsiooni kui potentsiaalset biomarkerit haiguslike seisundite diagnoosimises. cf-DNA kontsentratsiooni muutusi on peetud oluliseks erinevate patoloogiliste seisundite korral, nagu vähktõved, autoimmuunhaigused, trauma, sepsis, insult ja müokardinaalne infarkt (Breitbach et al., 2012; Swarup & Rajeswari 2007). Need haigused on osaliselt seotud põletikega, mis tõstavad cf-DNA taset (Haller et al., 2016).

Lisaks patofüsioloogiale erinevates kliinilise meditsiini valdkondades on cf-DNA kontsentratsiooni uurimismudelit hakatud üha rohkem rakendama ka spordifüsioloogias (Breitbach et al., 2012). Venoosse vere plasmast määratud cf-DNA kontsentratsioon peegeldab erinevaid kliinilisi parameetreid nii patoloogiliste haiguste korral kui ka tervetel indiviididel. Seda näitavad korrelatsioonid erinevate valitud parameetritega nagu kehamassiindeks, urea, suure tundlikkusega C-reaktiivne valk (CRP), maksa ensüüm glutamiinhape oksaloatsetaadi transaminaas (Albus et al., 2015). Kõrgenenud cf-DNA tase võib olla ületreeningu sündroomi tunnuseks ning seotud kehalisest koormusest tingitud immuunsüsteemi seisundi muutustega (Breitbach et al., 2014). Tugevad ja kurnavad treeningud kutsuvad esile cf-DNA taseme tõusu ning see on seostatud treeningu tagajärjel tekkivate põletikega (Tug et al., 2016). Mitmed eelnevad uuringud (Atamaniuk et al., 2004; Atamaniuk et al., 2008; Beiter et al., 2011) on leidnud olulise cf-DNA kontsentratsiooni tõusu koheselt peale treeningu lõpetamist, pöördudes tagasi algtasemele 2 h jooksul, mis viitavad kiirele cf-DNA eemaldamisele (Tug et al., 2016).

2. cf-DNA MARKERINA SPORDIFÜSIOLOOGIAS

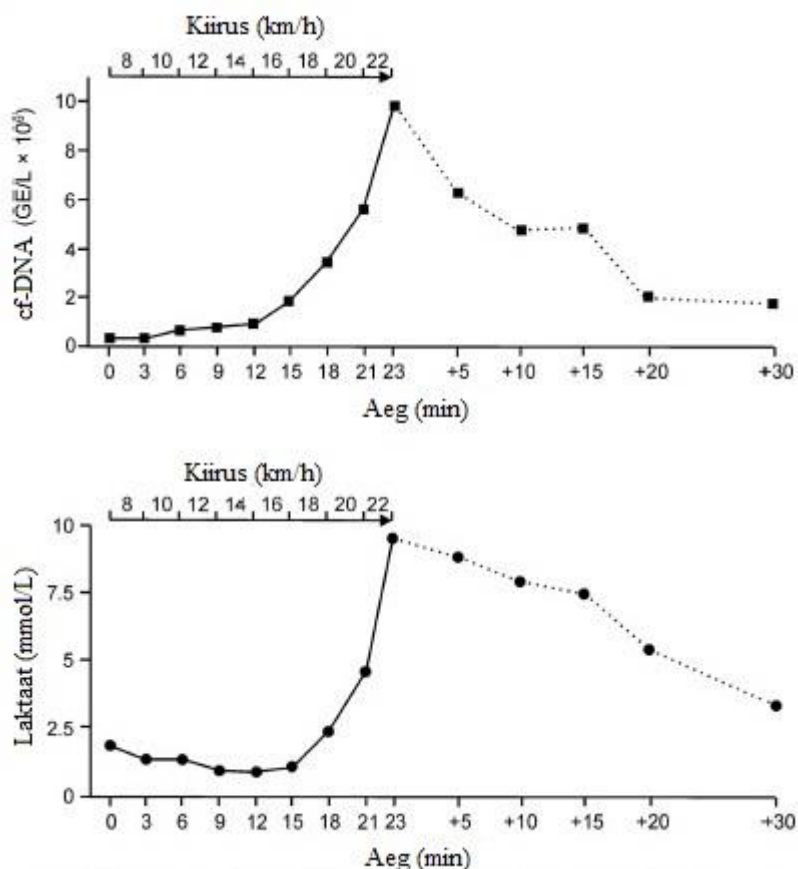
Akuutne ja krooniline kehaline koormus korreleerub positiivselt cf-DNA kontsentratsiooniga (joonis 1) (Breitbach et al., 2012). Mitmed uuringud on näidanud cf-DNA taseme tõusu vastupidavusaladel (Atamaniuk et al., 2004; Atamaniuk et al., 2008; Beiter et al., 2011; Velders et al., 2014) ja jõualadel (Atamaniuk et al., 2010). Tehtud uuringud (lisa 1; lisa 2) on seostanud cf-DNA erinevate füsioloogiliste parameetritega. Atamaniuk et al. (2004) poolmaratoni ja Atamaniuk et al. (2008) 6 h ultramaratoni uuringutes leiti cf-DNA, vere müoglobiini ja uurea kontsentratsioonide tõusud. Mõlemas uuringus märgiti põhjuseks oksüdatiivsest stressist tulenenud rakulised, molekulaarsed ja koelised kahjustused. Poolmaratoni uuringus langes cf-DNA kontsentratsioon algtasemele 2 h jooksul peale jooksu lõpetamist, 6 h ultramaratoni uuringus aga 24 h jooksul peale jooksu lõpetamist. Erinevus tulenes sellest, et ultramaraton tekitas suuremat kehalist stressi. Energeetilisest stressist ja treeninguga esile kutsutud rakukahjustustest põhjustatud cf-DNA kontsentratsiooni tõus leiti ka Atamaniuk et al. (2010) jõutõstmise harjutuste korral. Energeetiliste protsesside ning hüpoksiliste ja membraani kahjustuste määramiseks kasutati oksüpurini hüpoksantiini ja ksantiini. Cf-DNA kontsentratsioon langes algtasemele 2 h jooksul peale jõutreeningu lõpetamist.



Joonis 1. cf-DNA kontsentratsiooni muutus enne, koheselt peale jalgrattatesti ja peale 90 min taastumist. (Tug et al., 2016 järgi).

Mitmetes uuringutes on cf-DNA kontsentratsiooni tõusu seostatud laktaadi kontsentratsiooni tõusuga. Haller et al. (2016) uuringus 13 tervisesportlasega näidati cf-DNA ja laktaadi kontsentratsioonide tõusu efekti sama absoluutse treeningintensiivsuse, aga erineva aeroobse mahuga testide korral. Tõusva koormusega testi tulemusena leiti cf-DNA ja laktaadi

kontsentratsioonide tõusu sarnane kineetika, mis on kooskõlas eelnevate uuringutega. Aeroobse vastupidavusjooksu tulemusena leiti aga cf-DNA ja laktaadi kontsentratsioonide erinev kineetika. Beiter et al. (2011) poolt välja pakutud hapniku- ja laktaadi mehhanism võib selgitada cf-DNA kontsentratsiooni muutusi erinevate treeningute korral, kui laktaadi kontsentratsioon, stressihormoonide tase või keha süvatemperatuur tõusevad järk-järgult (joonis 2) (Breitbach et al., 2012). Hapniku- ja laktaadi mehhanism ei suuda aga selgitada cf-DNA tõusu madala kuni mõõduka intensiivsusega aeroobsel tööl, kus cf-DNA vabastamine tundub olevat laktaadi kuhjumisest eraldiseisev süsteem (Haller et al., 2016).



Joonis 2. cf-DNA (ülemine) ja laktaadi (alumine) kineetikad kurnatuseni kestva jooksulinditesti ajal (pidevjoon) ja selle järgselt (punktirjoon). (Beiter et al., 2011 järgi).

Beiter et al. (2011) uuringus näidati cf-DNA, laktaadi ja HMGB1 kontsentratsioonide tõusu koheselt peale kurnatuseni kestvat jooksutesti. Uuringu tulemusena leiti kõigi kolme produkti sarnane kuhjumine. Lisaks tehti oluline avastus, et cf-DNA kontsentratsiooni oluline tõus algas 70% AnT-st ning see tõusis tugevalt vaid 3-6 min vältel 15 min pärast treeningu algust. Põhjuseks märgiti akuutsest stressist tulenev genoomse cf-DNA kuhjumine, mil hapnikuvaegusest ja hüperlakteemiast tulenevalt toodetakse reaktiivseid hapnikuühendeid

(ROS) ning algatatakse kaspasooltumatute neutrofiilide, mis viib nende genoomse DNA vabastamiseni neutrofiilide ekstratsellulaarsete lõksude (NET'de) kaudu.

Cf-DNA kontsentratsiooni tõus on seostatud DNAasi aktiivsuse kohanemisega Velders et al. (2014) uuringus, kus 10 võistlussportlast tegi kurnatuseni kestva sõudeergomeetri testi. Põhjusena märgiti, et akuutne treening võib olla mittefarmakoloogiline stiimul, mis mõjutab DNAasi aktiivsust.

On arvatud, et cf-DNA kontsentratsiooni tõus võib olla seotud ületreeningu sündroomiga. Fatouros et al. (2006) ja Fatouros et al. (2010) jooksutestide uuringutes näidati cf-DNA kontsentratsiooni tõusu jooksu ajal ja selle langemist algtasemele 1 h jooksul peale testi lõpetamist. Lisaks näidati CRP, kreatiinkinaasi (CK) ja kusihappe (UA) kontsentratsioonide ühtlast tõusu 24 h jooksul peale teste, mis näitavad ületreeningu tingimustega kaasnevat kehalist kroonilist stressi. Uuringu tulemustena märgiti cf-DNA vabastamismehhanism, mis on erinev põletikulikest markeritest nagu leukotsüütide oksüdatiivne lõhkumine, leukotsüütide või lihasrakkude apoptoos. Leiti, et cf-DNA võib olla põletike ja ületreeningu marker, kuid käesolevaks hetkeks on teadmised cf-DNA kuhjumisest akuutse või kroonilise treeningkoormuse korral ebapiisavad.

Beiter et al. (2011) uuringus kasutati cf-DNA kontsentratsiooni tõusu määramiseks 10x1000 m intervalljooksu. Uuringus osales 53 tervisesportlast ning selle tulemusena ei leitud cf-DNA kontsentratsiooni statistilist korrelatsiooni soo, vanuse või kehamassiindeksiga.

3. cf-DNA MÕÕTMINE

Seoses erinevate kehalise aktiivsuse uuringutega määratakse cf-DNA venoosse ja/või kapillaarse vere plasmast enne kehalist koormust, koheselt koormuse järgselt ning kuni 24 h taastumisperioodi vältel. Cf-DNA analüüsi kapillaarse vere plasmast saab kasutada vähem invasiivse meetodina, mis sobib näiteks korduvate vereproovide võtmisel lühikese ajaperioodi vältel. Kapillaarse vere plasmast määratud väärtused on tihedas korrelatsioonis venoosse vere plasmast määratud cf-DNA tasemega, kuid korreleerub vaid osaliselt metaboolsete ja immunoloogiliste parameetrite ning maksa ensüümi väärtustega. Lisaks on võimalik cf-DNA kontsentratsiooni määrata venoosse vere seerumist, kuid seda mõjutavad tugevalt vere näitajad (Albus et al., 2015).

Cf-DNA tase määratakse kvantitatiivse reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooniga (qPCRga). Oma päritolu järgi jaguneb cf-DNA tuuma DNA'ks (nDNA) ja mitokondriaalseks DNA'ks (mtDNA). Uuringutes määratakse aga üldist cf-DNA taset (Beiter et al., 2011). Vereproovid tsentrifuugitakse alguses 2 min jooksul 4 °C ja 1600 g juures ning seejärel 5 min jooksul 4 °C ja 16000 g juures, et eemaldada plasmast rakujäänused. Allesjäänud plasma lahjendatakse veega suhtes 1:40, et vähendada võimalikke inhibiitoreid. 2.2 µl lahjendatud proovist segatakse 14.3 µl master- ja praimerseguga, et analüüsida kolmekordselt 5 µl igast proovist 384-kaevuga-plaadil. cf-nDNA määramine põhineb mittekodeeriva pika vahelduva tuumaelemendi (LINE) L1PA2 90 aluspaari järjestuse võimendumisel, kasutades primereid. qPCR protokoll sisaldab esialgset denaturatsiooni 2 min jooksul 98 °C juures, millele järgneb 35 tsüklit sulatamist 10 sek kaupa 94 °C juures, lõõmutamine (jahutamine pärast kuumutamist sisepingete kaotamiseks) 40 sek 64 °C juures ja lisaks 10 sek 75 °C juures (Haller et al., 2016). Seejärel külmutatakse cf-DNA koheselt -20 °C juures. Cf-DNA värvitakse Vistra Green värviga ja mõõdetakse selle kogust plasmas LightCycler reaalaja PCR süsteemiga (Roche) fluorestseeruva signaali tuvastamise kaudu (Atamaniuk et al., 2004).

Üks meetod cf-DNA mõõtmist piiravate aspektide ületamiseks on cf-DNA koguse määramine otse plasmas või seerumis (Schwarzenbach et al., 2011). Selleks on cf-DNA mõõtmise meetod ilma eelneva DNA eraldamiseta (Umetani et al., 2006). Enne qPCR mõõtmist töödeldakse plasma või seerumi proove puhvris ja proteaas K-ga, et eemaldada proteiinid. Cf-DNA absoluutset mõõtmist teostatab kahekordse pikkusega ALU järjestuste amplifikatsioon (koopjaarvu tõus) (Deligezer et al., 2008; Feng et al., 2013).

Kuna cf-DNA on keeruline molekul kvalitatiivse informatsiooniga nagu DNA järjestus ja fragmendi pikkus, mis on seotud erinevate aspektidega, siis on oluline tõlgendada, mõista ja võrrelda cf-DNA mõõtmise tehnikaid spordiga seotud kontekstides. Breitbach et al. 2014 uuringus analüüsiti erinevusi praimerpaaride puhul, mida kasutati väikeste ja suurte fragmentide juures otse, QIA ja PCI meetodite korral ning leiti, et cf-DNA tulemused erinesid erinevate meetodite kasutamisel oluliselt.

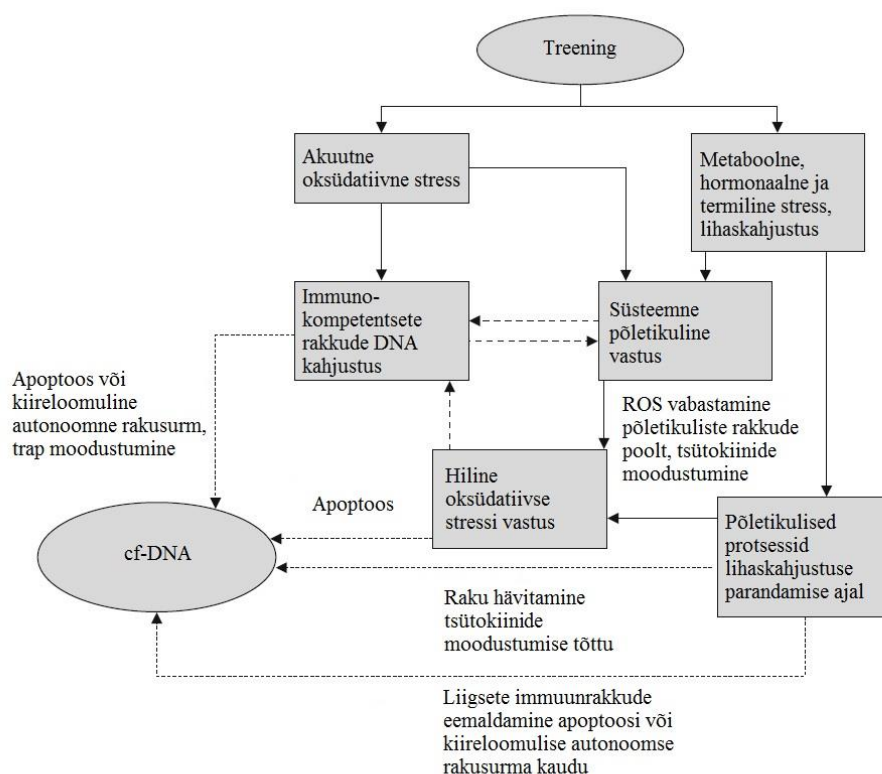
4. cf-DNA TEKKIMINE

Cf-DNA'd leidub organismis kogu aeg madalal kontsentratsioonil (Breitbach et al., 2012). Tõusnud cf-DNA kontsentratsiooni on pikka aega seostatud erinevate akuutsete ja krooniliste põletikuliste seisunditega (Swarup & Rajeswari, 2007). Hoolimata viimaste kümnendite jooksul tehtud intensiivsetest cf-DNA uuringutest, ei ole jõutud konsensussele cf-DNA päritolus, vabastamise mehhanismides ja bioloogilises tähtsuses (Swarup & Rajeswari, 2007).

Ringleva DNA mõõtmist on kasutatud näiteks traumaga patsientide ravijärgses monitooringus. On leitud, et traumaga patsientidel on ringleva plasma DNA kontsentratsioon perifeerses veres oluliselt tõusnud 15 min kuni 3 h jooksul peale suurt kehalist vigastust (Rainer et al., 2001). Sarnane näitaja on leitud ka erinevate akuutsete ja krooniliste treeningute korral (lisa 1; lisa 2).

Cf-DNA on kvalitatiivset laadi, kuna aitab kirjeldada erinevaid haigusi, koe ja rakuspetsiifilisi DNA järjestusi ning epigeneetilisi modifikatsioone. Kirjeldavad uuringud, mis proovivad vastata cf-DNA tekkimise küsimustele kliiniliste seisunditega seoses, on limiteeritud ühe suure takistusega: cf-DNA vabastamise monitooring ei ole võimalik haiguse avaldumise alguses, vaid cf-DNA kontsentratsiooni saab määrata peale seda, kui kliinilised sümptomid on juba avaldunud. Haiguse ilmnemisel esinevad cf-DNA kontsentratsioonide erinevused indiviidide vahel, mille tõttu on usaldusväärsete statistiliste tulemuste jaoks vaja suurt arvu uuringus osalejaid ja kontrollgruppe. Kehaline aktiivsus annab unikaalse võimaluse mõjutada tahtlikult cf-DNA kontsentratsiooni tõusu organismis. Lisaks võimaldab see hinnata cf-DNA kontsentratsiooni tõusu intraindividuaalseid erinevusi erinevatel aegadel võetud vereproovide kaudu (Beiter et al., 2011).

On leitud, et pingutust nõudev treening kutsub esile kohese ja mööduva ringleva cf-DNA kontsentratsiooni tõusu vereplasmas ja -seerumis (Atamaniuk et al., 2004; Beiter et al., 2011; Fatouros et al., 2010). Juba madal aeroobne treening stimuleerib kaasasündinud immuunsüsteemi aktivatsiooni kahe kriitilise faktori – intensiivsuse ja kestuse mõjul (Nehlsen-Cannarella et al., 1991). Kaasasündinud immuunvastuse aktivatsiooni, mille põhjustajateks on treening ja NET moodustumine, põhjal püstitati esmakordselt hüpotees, et cf-DNA on potentsiaalne marker aeroobse treeningu intensiivsuse ja kestuse monitooringus (Haller et al., 2016). Treeningutel tõuseb cf-DNA kontsentratsioon sõltuvalt rakulisest, molekulaarsest ja koelisest kahjustusest, mis on põhjustatud oksüdatiivsest stressist pikaajase vastupidavustreeningu ajal ja järgselt (joonis 3). Seega võib cf-DNA'd määratleda kui treeningute põhjustatud rakukahjustuse näitajat (Atamaniuk et al., 2004).



Joonis 3. cf-DNA vabastamismehhanismid immuunkompetentsetest rakkudest, mis on esile kutsutud treeninguga põhjustatud immuunvastuse ja põletikuliste protsesside poolt. **cf-DNA** = rakuvaba DNA; **ROS** = reaktiivsed hapnikuühendid. (Neubauer et al., 2008 järgi).

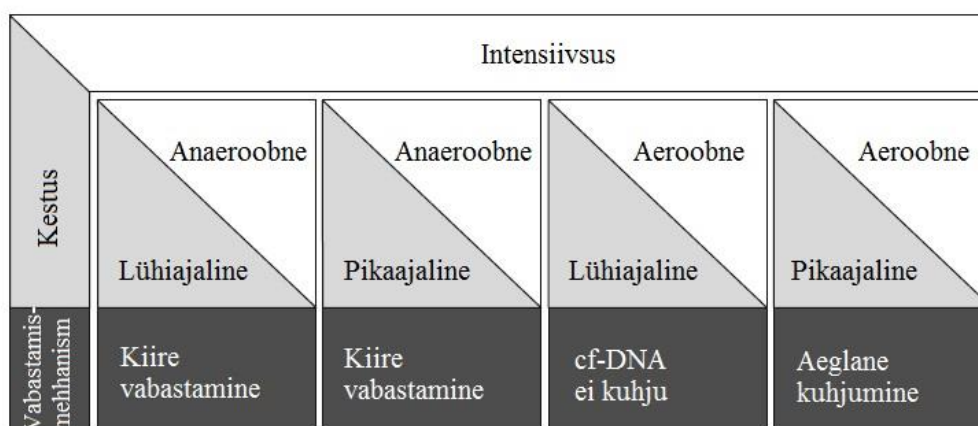
Liigne stress võib põhjustada DNA kahjustust oksüdeerunud nukleotiidide, ahela katkemiste või DNA ristsidemete katkemiste kaudu. DNA kahjustuse võimalikud tagajärjed on defektne parandus, apoptoos ja nekroos (Chevion et al., 2003). Defektne parandamine võib viia DNA järjestuse muutmiseni, võimaliku vähktõve arenguni või metaboolse häireni (Fehrenbach & Northoff 2001). Mittespetsiifilised DNA parandamise ensüümid kasutavad kahjustatud DNA koldeid, et vabastada deoksünukleotiide (Mars et al., 1998). Deoksünukleotiidid on ensümaatiliselt hüdrolyüsitud, et stabiliseerida deoksünukleosiide ning nende produktid transporditakse läbi vere ja eritatakse uriiniga (Atamaniuk et al., 2004).

Cf-DNA taset organismis võivad mõjutada erinevad spordialaspetsiifilised treeningud, mis kajastavad pideva kehalise koormuse kroonilisi mõjusid. Cf-DNA taseme määramisel mängivad olulist rolli ka rakendatavad mõõtmismeetodid (Breitbach et al., 2012). Beiter et al. (2011) jooksulindi testil leiti, et cf-DNA kontsentratsioon kasvas tugevalt vaid 3-6 min vältel 15 min pärast treeningu algust, mis näitas, et oluline cf-DNA kuhjumine algas intensiivsusel 70% AnT ja jõudis maksimaalse kontsentratsioonini koheselt või lühikest aega peale jooksu lõppu. Plasmas määrati cf-nDNA ja cf-mtDNA ning leiti, et treeningu käigus tõusis vaid cf-

nDNA kontsentratsioon. Plasma cf-nDNA kontsentratsioon vähenes 30 min jooksul peale treeningu lõpetamist, viidates kiirele liigse cf-nDNA eemaldamisele (keskmine poolestusaeg 16 min). Cf-mtDNA tase jooksutesti käigus ei tõusnud, kuid cf-mtDNA kontsentratsiooni muutusi on täheldatud trauma (Lam et al., 2003) ja vähktõve (Mehra et al., 2007) korral. Need erinevused võivad olla seotud erinevate proovide analüüsimise protokollidega või viitavad alternatiivsetele cf-DNA vabastamise mehhanismidele (Beiter et al., 2011).

Võrreldes cf-DNA kontsentratsiooni tõusu rattatreeningu (Tug et al., 2016), jooksutreeningu (Atamaniuk et al., 2004, 2008; Beiter et al., 2011; Haller et al., 2016) ja jõutõstmistreeningu (Atamaniuk et al., 2010) vahel, eeldati seost cf-DNA taseme tõusu ja treeningu intensiivsuse ja/või kestuse vahel (Tug et al., 2016). Treeningu parameetrid (intensiivsus, kestus ja keskmine energiakulu) eraldiseisvalt ei selgita aga cf-DNA taseme tõusu ulatust peale kehalist treeningut (Breitbach et al., 2012), vaid see on seotud kogu tajutud koormusega (joonis 4). Tug et al. (2016) uuringus võrreldi rattasõidu testi (Tug et al., 2016) ja jooksutesti (Breitbach et al., 2014) ning leiti, et rattasõidu test kurnatuseni kestis 4 min kauem, kuid cf-DNA taseme tõus oli 2 korda madalam. See näitab, et mitte kestus ja intensiivsus ei ole eraldi olulised faktorid cf-DNA vabastamise korral, vaid treeninguviis koos kogu koormusega (Tug et al., 2016). Sama seos leiti ka võrreldes jõutõstmise treeningharjutusi (Atamaniuk et al., 2010) ja jooksutesti (Breitbach et al., 2014), mil jooksutesti käigus tõusis cf-DNA tase 3 korda kõrgemale võrreldes jõustõstmise treeninguga.

Praeguseks ei ole piisavalt asjakohast markerit treeningkoormuse hindamiseks, osaliselt aeroobse treeningu jaoks, mis aitaks määrata optimaalset treeningintensiivsust ja ennetada ületreeningut (Haller et al., 2016).



Joonis 4. Intensiivsusest ja ajast sõltuv cf-DNA vabastamine. Anaeroobse treeningu vabastismehhanism on ajast sõltumatu, mis viitab kiirele cf-DNA vabastamisele. Aeroobse treeningu vabastismehhanism on ajast sõltuv. Lühiajalise aeroobse treeningu tulemusel cf-DNA ei kuhju. Peale pikaajalist aeroobset treeningut on cf-DNA kontsentratsioon kõrgem ja see hakkab aeglaselt langema. **cf-DNA** = rakuvaba DNA. (Breitbach et al., 2012 järgi).

4.1. Apoptoos ja nekroos

Plasma cf-DNA päritolu on endiselt ebaselge, kuid on leitud mitmed juhtumid, kuhu on kaasatud apoptoos või nekroos ning võib eeldada, et sellised sündmused on cf-DNA tekke peamisteks allikateks (Atamaniuk et al., 2004). Apoptoos on programmeeritud rakusurm, mille käigus DNA fragmenteerub, väheneb raku maht, kaovad mitokondriaalsed funktsioonid ning rakk lagundatakse (Kerr, 2002). Nekroos on erinevate kahjustavate tegurite (mehaanilised, füüsikalised, keemilised, bioloogilised jt) toimel tekkinud programmeerimata rakkude, koe või elundi surm (Lafforgue, 2006).

Akuutsed harjutused, kroonilised haigused kui ka järjepidevad kõrge intensiivsusega vastupidavustreeningud põhjustavad püsivat tõusu cf-DNA tasemes. Pidevad suure koormusega treeningud nagu pika kestusega vastupidavustreeningud või regulaarsed kõrge intensiivsusega treeningud kutsuvad esile kroonilist põletikku, mis viib aeglase, konstantse DNA vabastamiseni (Breitbach et al., 2012). Rakusurm võib olla cf-DNA kontsentratsiooni tõusu kõige levinumaks selgituseks. Eelkõige cf-DNA vabanemine nekrootilistest ja apoptootilistest rakkudest, või kaudne vabanemine surnud raku neelanud makrofaagidest (Swarup & Rajeswari, 2007).

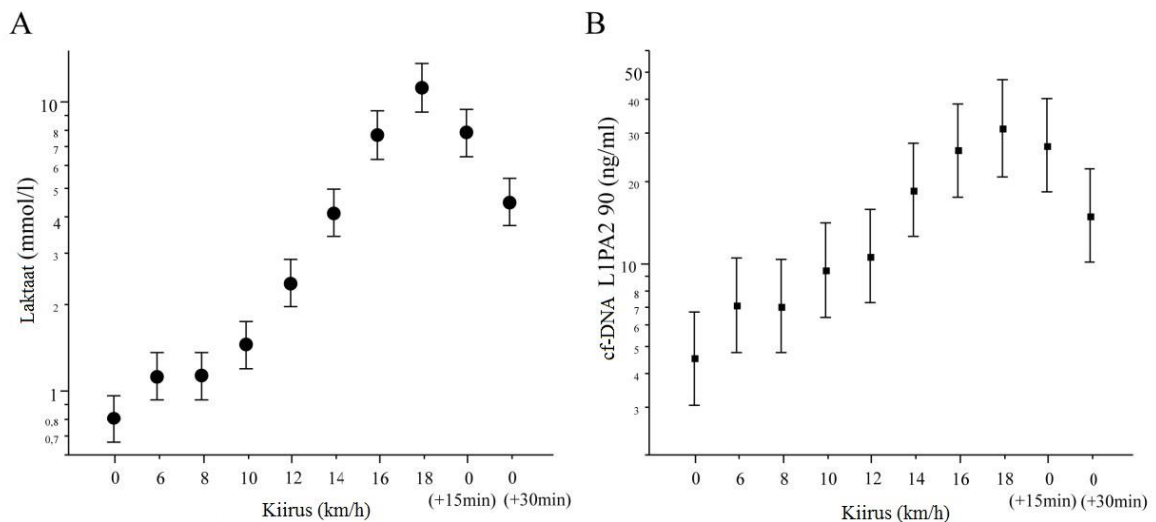
Mitmetes uuringutes on küll eeldatud, et cf-DNA taseme tõus on seotud vere ja koerakkude nekroosi ja apoptoosiga (Atamaniuk et al., 2004; Atamaniuk et al., 2008; Jahr et al., 2001), kuid tüüpilise raku surma mehhanismi puhul toimub cf-DNA vabastamine mitme tunni või päeva pärast. Seega on ebausutav, et need mehhanismid on seotud akuutse treeningu järgse cf-DNA tõusuga (Breitbach et al., 2012).

4.2. ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

On arvatud, et cf-DNA vabastamine võib pigem olla seotud endogeensete pürogeenide tõusuga, mis muutub juba madalal intensiivsusel (Smith et al., 1990). ROS'd (Mooren et al., 2002), põletikueelsed tsütokiinid (Neubauer et al., 2008) ja teised pürogeenid (Scott et al., 2013) kutsuvad esile cf-DNA vabastamise erinevates rakkudes ja on leitud nende taseme tõus treeningutel. ROS tekitab DNA kahjustusi ristsidemete lõhkumisena ja ahelakatkestustena (Hemnani & Parihar, 1998; Mooren et al., 2002). Need mehhanismid on tõenäoliselt cf-DNA algtaseme muutuse põhjuseks kui ka cf-DNA taseme tõusu selgitamiseks treeningute ajal.

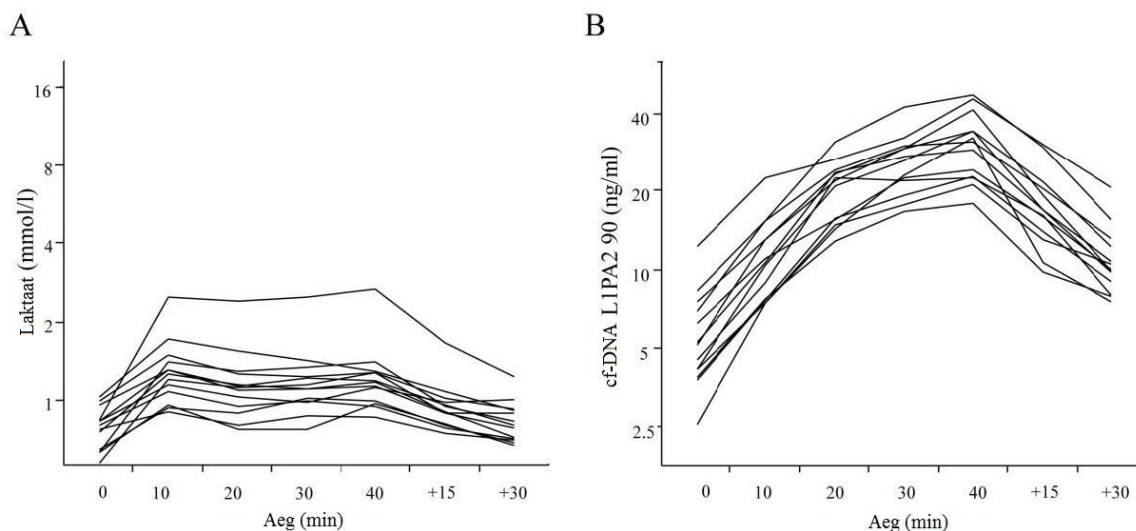
4.3. cf-DNA ja laktaat

Cf-DNA ja laktaadi kontsentratsioonid muutuseid on intensiivselt uuritud (Beiter et al., 2011; Breitbach et al., 2014; Haller et al., 2016). Haller et al. (2016) uuringus võrreldi cf-DNA ja laktaadi taseme muutuste kineetikat kahe jooksutesti kaudu. Esimese testi ajal, kus algkiiruseks oli $6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ ja iga 3 min tagant suurendati kiirust $2 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ võrra, tõusid laktaadi ja cf-DNA kontsentratsioonid järk-järgult testi ajal ja langesid 30 min taastumise jooksul (joonis 5). Testi tulemusel muutunud laktaadi ja cf-DNA tasemed (Haller et al., 2016) kinnitasid eelnevate uuringute (Beiter et al., 2011; Breitbach et al., 2014) andmeid, kus leiti laktaadi ja cf-DNA sarnased kineetikad. Uuringu tulemuste põhjal eeldati, et laktaat võib olla cf-DNA taseme tõusu põhjuseks (Haller et al., 2016).



Joonis 5. Laktaadi (A) ja cf-DNA (B) kontsentratsioonid enne testi (0 km/h), testi ajal ja testi lõpus (6-18 km/h). Samuti 15 ja 30 min peale kasvavate kiirustega jooksutesti (iga 3 min järel tõsteti kiirust $2 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$) lõpetamist. Näidatud on keskmised kontsentratsioonid ja 95% usaldusvahemik logaritmilisel skaalal. (Haller et al., 2016 järgi).

Teise testi, 40 min jooksu kiirusel $9.6 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$, käigus tõusis laktaadi kontsentratsioon testi alguses esimese 10 min jooksul ühtlasel jooksukiirusel, püsis jooksu ajal sama ja langes 30 min taastumise jooksul. Erinevalt laktaadist tõusis cf-DNA kontsentratsioon ühtlaselt kogu jooksu aja ja langes peale jooksu lõpetamist (joonis 6) (Haller et al., 2016). Testi tulemused olid vastuolus varasemate uuringutega (Beiter et al., 2011; Breitbach et al., 2014), mis näitasid, et vähemalt madalal kuni mõõdukal intensiivsusel on cf-DNA vabastamine laktaadi kuhjumisest eraldiseisev süsteem (Haller et al., 2016).

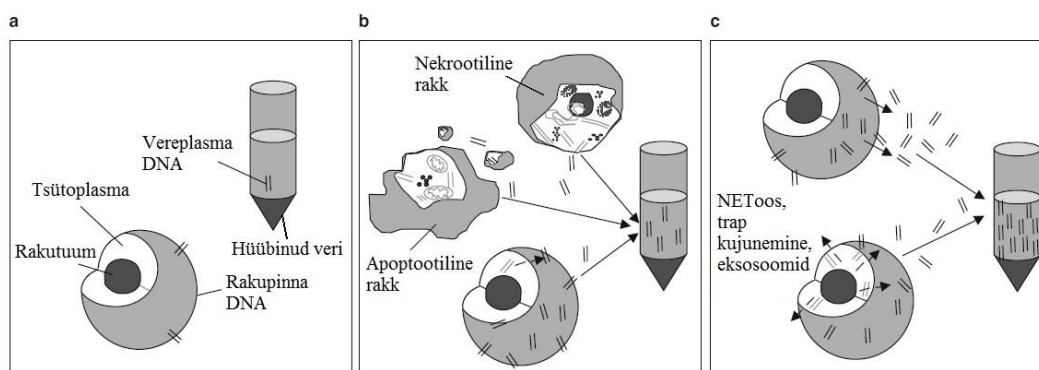


Joonis 6. Laktaadi (A) ja cf-DNA (B) kontsentratsioonide ajalsed muutused testi alguses, testi ajal (10, 20 ja 30 min) ja koheselt peale jooksutesti (40 min) kiirusel $9.6 \text{ km} \cdot \text{h}^{-1}$ ning taastumisel (+15 ja +30 min). cf-DNA kontsentratsioon tõusis ühtlaselt kogu jooksu ajal ning langes peale testi, kuid laktaadi kontsentratsioon tõusis vaid esimese 10 min jooksul ja püsis ülejäänud testi ajal sama. (Haller et al., 2016 järgi).

Cf-DNA ja laktaadi eemaldamise mehhanismid võivad selgitada, et cf-DNA ja laktaadi kineetikad on vastanduvad. Potentsiaalselt võib cf-DNA kuhjuda aeroobsel treeningul maksa piiratud võimekuse tõttu seda ümber töödelda (Haller et al., 2016). Laktaat võib kuhjuda aga anaeroobsel treeningul lihaste piiratud võimekuse tõttu seda eemaldada.

4.4. NEToos – neutrofiilide ekstratsellulaarsed lõksud

Cf-DNA kontsentratsioon on suuresti mõjutatud vere parameetritest nagu näiteks leukotsüütide, erütrotsüütide ja trombotsüütide arv ja keskmine maht (Albus et al., 2015). Üheks kirjeldatud cf-DNA vabastamise mehhanismiks on NEToos ehk järsk NET'de vabastamine kaasasündinud immuunvastuse aktivatsiooni korral. See kujutab endast patogeeni poolt indutseeritud raku surma, millega vabastatakse NET'd, mis võib selgitada cf-DNA kuhjumist (joonis 7) (Beiter et al., 2011).



Joonis 7. cf-DNA kontsentratsiooni tõus võib sõltuda kahest erinevast mehhanismist. (a) Terve puhunud indiviidi DNA algaseme tasakaal rakus, rakupinnal ja vereplasma. (b) Krooniline stress viib konstantse DNA vabastamiseni apoptoosi ja nekroosi kaudu (DNA tasakaal on nihkunud). cf-DNA fragmendid sisenevad ringlusesse vähemalt 12 tundi peale raku surma. (c) Akuutne stress kutsus esile DNA aktiivse vabastamise sekundite jooksul raku sisemusest või rakupinnalt. **cf-DNA** = rakuvaba DNA; **NEToos** = rakusurm, mis hõlmab NET' de vabastamise. (Breitbach et al., 2012 järgi).

Tug et al. (2015) uuringus analüüsiti cf-DNA vabastamise algallikat. Uuringus kasutati maksa ja luuüdi siirdamise läbi teinud patsiente ning leiti, et treeningust sõltuv cf-DNA vabastamine võib olla piiratud rakkude vereloome tüvega (Tug et al., 2015). See tähendab, et neutrofiilid, eosinofiilid ja basofiilid on võimelised järsult vabastama DNA'd NET' de moodustumise kaudu ning on seega potentsiaalsed cf-DNA vabastamise allikad treeningu ajal (Morshed et al., 2014).

Pingutust nõudvad treeningud on otseselt seotud ROS (Beiter et al., 2011; Hashimoto et al., 2007), põletikueelsete tsütokiinide (Neubauer et al., 2008) ja teiste pürogeenide (Camus et al., 1997) produktsiooni tõusuga. Lisaks on need põletiku, rakkude pooldumise ja koekahjustuse kaudu seotud oksüdatiivse stressiga. Kõik eelmainitud näitajad on ühiseks tunnuseks cf-nDNA kontsentratsiooni tõusule. ROS tõus treeningu ajal võib olla seotud laktaadi kuhjumisega ning seeläbi esile kutsuda cf-DNA taseme tõusu NET' de kaudu (Beiter et al., 2011). Hapniku defitsiidi ja hüperlakteemia korral saavad eksogeensed ROS' d mõjutada neutrofiile, et vabastada nende nDNA' d kaspas-sõltumatu tee kaudu (Beiter et al., 2011; Hashimoto et al., 2007). Vormitakse antimikroobne nDNA võrgustik, histoonid ja antibakteriaalsed proteiinid ning seda nimetatakse NET' ks, mille kaudu toimub cf-DNA vabastamine (Fuchs et al., 2007).

Kuigi NET' d aitavad kaasa organismi kaasasündinud kaitsereaktsioonile, on NET' e leitud ka mittenakkavate põletikuliste haiguste korral (Kessenbrock et al., 2009). Lisaks on leitud, et veresoonte trombotsüütide ja neutrofiilide interaktsioon põhjustab järsku NET' de vabastamise ja järgnevate trombide tekke (Fuchs et al., 2010). Selleks, et terviklikult kasutada cf-nDNA

diagnostilist potentsiaali on vaja saada parem ülevaade rakulistest ja molekulaarsetest mehhanismidest, mis on cf-nDNA vabastamise ja eemaldamise aluseks (Beiter et al., 2011).

4.5. Aktiivne cf-DNA vabastamine ja leukotsüütide oksüdatiivne lõhkemine

Üheks võimalikuks cf-DNA kuhjumise mehhanismiks võib olla aktiivne või passiivne cf-DNA vabastamine ekstratsellulaarsest või intratsellulaarsest DNA'st. See võib olla põhjustatud treeninguga kaasnevast akuutsest stressist. Aktiivse või passiivse cf-DNA vabastamismehhanism on veel ebaselge (Breitbach et al., 2012; Tamkovich et al., 2006).

Lisaks on võimalikuks mehhanismiks cf-DNA kuhjumise selgitamisel leukotsüütide oksüdatiivne lõhkemine (Fatouros et al., 2010). DNA degradatsioon ja cf-DNA vabanemine võib olla tingitud treeninguga põhjustatud hüpoksiast ja radikaalide produktsioonist. Leukotsüütide oksüdatiivset lõhkemist on leitud treeningjärgse taastumise perioodil, kuid mehhanism on veel selgitamata (Atamaniuk et al., 2008).

Praeguseks on cf-DNA füsioloogiline päritolu siiski ebaselge ning ükski mainitud molekulaarsetest mudelitest ja mehhanismidest ei selgita täielikult cf-DNA vabastamist (Breitbach et al., 2012; Haller et al., 2016).

5. cf-DNA EEMALDAMINE

Tervetes indiviidides eemaldatakse peale treeningu lõppu liigne cf-nDNA kiirelt ringlusest. Hiline või aeglane cf-nDNA eemaldamine on seotud patogeensete haigustega autoimmuunsüsteemis või kroonilise väsimussündroomiga (Reid et al., 2004). Kuigi cf-DNA täpne päritolu, vallandamine ja regulatsioonimustrid kõrge koormusega treenivatel sportlastel on endiselt arutelu ja jätkuvate uuringute teema, siis näidati esmakordselt (Velders et al., 2014), et märgatavalt kõrgenenud cf-DNA tase hästi treenitud sportlastel on tõhusalt vähendatud endogeenselt väljendunud DNAasi aktiivsuse kohanemisega, et uuesti saavutada homöostaas. DNAasi aktiivsus kudedes ja kehavedelikes puhastab süsteemi apoptootiliste ja nekrootiliste rakkude endogeenselt DNAst koos võõra DNAGA, mis pärineb toidu seedimisest ja võimalikest patogeenidest. Veres ringlev cf-DNA on hüdrolüüsitud DNAasi poolt ja eemaldatud enamjaolt maksas ja vähesel määral (<2%) neerudes (Saukkonen et al., 2008). Vastupidiselt kehalisele koormusele lasevad patogeensete haiguste uuringud eeldada, et endogeense cf-DNA eemaldamise ja vähendamise mehhanismid on kahjustatud või puudulikult toime tulevad patoloogilise cf-DNA tasemega, mil DNAasi aktiivsus väheneb (Cherepanova et al., 2008).

On loodetud, et keha kudedes ja vedelikes olevate cf-DNA fragmentide kvantitatiivsed ja kvalitatiivsed tunnused võivad luua prognostilisi või diagnostilisi markereid meditsiinis (Breitbach et al., 2014). Praegused kvantitatiivsed cf-DNA analüüsi protseduurid viitavad DNA puhastamisele koos erinevate DNA järjestustega kvantitatiivse reaalaajal PCR poolt. Kahjuks kaasnevad DNA eraldamisega mitmed piirangud: (i) DNA isolatsioonimeetodid nõuavad suuri koguseid vereproove (Loparev et al., 1991); (ii) DNA isolatsioon on ajamahukas ning hõlmab suhteliselt kõrget riski proovi saastumisele. Puhastamisel kasutatavad koostisosad võivad sisaldada PCR inhibiitoreid, minimeerides testi tulemusi või viies valede kvantitatiivsete või kvalitatiivsete tulemusteni (Huggett et al., 2008); (iii) DNA saak on vähendatud ebamäärasel hulgal, mis sõltub isolatsioonimeetodi valikust ja uuritava DNA fragmendi suurusest (Clausen et al., 2007; Fong et al., 2009). See vastutasuks võib muuta DNA terviklikke väärtusi. Erinevate uuringute absoluutse cf-DNA väärtuste võrreldavus on siiski piiratud (Breitbach et al., 2014).

6. AKUUTSE KEHALISE KOORMUSE MÕJU cf-DNA'LE

Spordimeditiini uuring keskendub akuutsele cf-DNA kontsentratsiooni tõusule treeningute põhjal. Põletikulised reaktsioonid ei ole ainult seotud haigustega, vaid viitavad ka kehalisele väsimusele. Suure koormusega treeningud põhjustavad energetilist ja oksüdatiivset stressi, mis viivad leukotsüütide põletikuliste vastuste (Fehrenbach et al., 2000), mehaanilise ja metaboolse lihaskahjustuse (Brancaccio et al., 2010) ning DNA kahjustuseni (Chevion et al., 2003). See põhjustab cf-DNA kontsentratsiooni tõusu (Breitbach et al., 2012). Traumade ja akuutsete kehaliste koormuste põhjustatud immuunvastuste ja põletikuliste protsesside sarnasus viitab, et suure koormusega treeningud põhjustavad samuti cf-DNA kontsentratsiooni taseme tõusu, kuid ei ole teada selle kvaliteet (Breitbach et al., 2012; Fehrenbach & Schneider, 2006).

Sõltuvalt intensiivsusest ja kestusest kujutab akuutne kehaline treening mitme stressoriga situatsiooni, hõlmates oksüdatiivseid, metaboolseid, mehaanilisi, termilisi ja neurohormonaalsed stressoreid. Selle kaudu vallandatakse leukotsüütide mobilisatsioon ja aktivatsioon, akuutses faasis proteiinide ja trombotsüütide aktivatsioon ning trombootiliste ja fibrinolüütiliste radade muutus (Walsh et al., 2011). Kehaline treening viib ajutise isheemiani lihases, millele järgneb taastumise ajal hapniku tarne suurenemine reperfusiooni (verevarustuse taastamine pärast selle katkemist) tulemusena. On arvatud, et ootamatu hapniku juurdevool põhjustab rakkudes Ca^{2+} liigse kuhjumise, mis viib põletikuliste rakkude sissevooluni koe reperfusiooni. See omakorda viib ROS genereerumisele ja hilisemale DNA, proteiinide ja lipiidide oksüdatiivsele kahjustusele. On teada, et isheemia reperfusiooni ja ROS moodustumise tulemusena toimub DNA ahela katkemine ja organismis tõuseb cf-DNA kontsentratsiooni tase (Atamaniuk et al., 2004). Phaneuf & Leeuwenburgh (2001) uuringus põhjustas akuutne treening mitokondrites oksüdandi produktsiooni tõusu ja sellele järgnenud hapnikuga varustamise ning kutsus sellega esile rakukahjustused. Tulemusena tõusis uuringus osalejate organismides cf-DNA tase.

Cf-DNA kontsentratsiooni tõusu on leitud nii akuutsete (Atamaniuk et al., 2004; Beiter et al.; 2011; Breitbach et al., 2014) kui ka pikaajaliste vastupidavustreeningute (Atamaniuk et al., 2008; Fatouros et al., 2006) tulemusena. Lisaks võib treening põhjustada mööduvaid lihaskahjustusi, mida iseloomustab lihasvalu, lihaskiudude korrapäratus, lihasvalkude vabanemine plasmasse, akuutne immuunvastus ja vähenenud lihasvõimekus (Park et al., 1992).

Metabolismist või väliskeskkonnast tulenevad vabad radikaalid mõjutavad vahetpidamata bioloogilisi süsteeme. Oksüdandid ja antioksidandid tuleb hoida tasakaalus, et minimaliseerida molekulaarset, rakulist ja koelist kahjustust. On leitud tõendeid, et vabad radikaalid omavad olulisi funktsioone rakkude signaalülekannetes, sisaldades kasvamise ja apoptoosi induktsiooni ning hävitades immunokompetentseid rakke, tõstes selle kaudu cf-DNA taset (Fehrenbach & Northoff 2001). Treeningu ajal tõuseb kogu kehas oluliselt hapnikuga varustamine. Näiteks lihaste hapnikukasutus jõutreeningu ajal võib tõusta puhkeseisundiga võrreldes 100-200 korda (Chevion et al., 2003). Lisaks töötavates lihastes ja kudedes, mis läbivad isheemia reperfusiooni, võivad tekkida liigsed ROS'd nii kehalise treeningu ajal kui ka järgselt (Chevion et al., 2003). Lokaalne ATP ammendumine reperfusiooni ajal, kaltsiumi homöostaasi häired ja vabade hapnikuradikaalide olemasolu osalevad lihaskiude kahjustuse ja nekroosi tekkepõhjustes, mis vabastavad cf-DNA'd (Atamaniuk et al., 2004). Mõned uuringud (Atamaniuk et al., 2004; Atamaniuk et al., 2008) on leidnud treeninguga põhjustatud DNA kahjustuse leukotsüütides ja leidnud võimaliku seose apoptoosiga. Arvatakse, et see efekt on põhjustatud ROS'dest, mis on vabastatud perifeersetest monotsüütidest (Mars et al., 1998).

Akuutse treeningu ajal suureneb mitokondrites oksüdantide produktsioon, millele järgneb uuesti hapnikuga varustamine, põhjustab rakukahjustusi ning see võib peegeldada müoglobiini kontsentratsiooni tõusu seerumis (Goodman et al., 1997). Mitokondrist pärinenud aeroobsed rakud on pidevalt varustatud vabade hapnikuradikaalidega, mis on vältimatult loodud protsessis, kus kasutatakse hapnikku, et resünteerida ATP. Järelikult tõusnud elektronide tagasivool läbi kiiresti hingava mitokondri aktiivses lihases võib viia suurema elektronide lekke ja ROS produktsioonini (Chevion et al., 2003). Liigsed vabad hapnikuradikaalid põhjustavad rakkude membraankahjustusi, mille tulemusena vabaneb cf-DNA (Atamaniuk et al., 2008). Vabade radikaalide vastu on meie organismis kusihaape. Kusihaape kontsentratsiooni tõus on seotud antioksidantide mahu tõusu ja vähenenud oksüdatiivse stressiga, mida on täheldatud akuutse kehalise treeningu ajal (Waring et al., 2001).

Müoglobiini roll hapnikukandjana sõltub pöörduvast hapniku sidumisest, mis omakorda sõltub hapniku partsiaalrõhust. Mitokondriaalse hapnikuvaeguse vältimiseks ja hapniku difusiooni tasakaalustamiseks säilitatakse hapnikku lihasrakkudes (Conley et al., 2000). Hapnikuvaestes tingimustes, näiteks akuutse treeningu ajal, tõuseb hulktuumsetes skeetilihastes müoglobiini sisaldus. Kui müoglobiin ei suuda lihasrakke piisavalt hapnikuga

varustada, on skeletilihased võimelised läbi tegema individuaalse apoptoosi kui täieliku rakusurma, millega vabastatakse cf-DNA (Primeau et al., 2002).

Cf-DNA päritolu potentsiaalseks mehhanismiks on peetud apoptoosi või nekroosi (Atamaniuk et al., 2004; Haller et al., 2016; Mooren et al., 2002). Klassikalise rakusurma mehhanismi korral võtaks DNA kontsentratsiooni tõus aega aga paarist tunnist mitme päevani. Seetõttu on kaalutud teisi DNA-fragmentide vabastamise mehhanisme (Breitbach et al., 2012; Haller et al., 2016). Kuigi cf-DNA vabastamist on selgitatud mitmete mehhanismide kaudu, on selle päritolu endiselt ebaselge ning kehalise koormusega seotud treeningu intensiivsus ja kestus, mis on olulised cf-DNA kontsentratsiooni tõusu esilekutsumiseks, on väga aktuaalsed teemad (Breitbach et al., 2012). Beiter et al. (2011) näitas oma uuringus genoomse cf-DNA kuhjumist. Cf-DNA'ga sarnased kineetikad on leitud laktaadi ja HMGB1 kontsentratsioonides, mis viitavad põletikueelsetele protsessidele (Breitbach et al., 2012). Teisest küljest on näidatud, et skeletilihaste kahjustuste markeritel on erinev kineetika võrreldes cf-DNA markeritega. See on põhjus, miks on väidetud, et cf-DNA vabastamismehhanism on eraldiseisev süsteem põletikulistest markeritest nagu leukotsüütide oksüdatiivne lõhkemine, leukotsüütide või lihasrakkude apoptoos (Breitbach et al., 2012).

7. KROONILISE KEHALISE KOORMUSE MÕJU cf-DNA'LE

Regulaarne pikaajaline treening kõrgel intensiivsusel kutsub esile olulised muutused metaboolses, endokrinoloogilises, antropomeetrilises ja hormonaalses keskkonnas (Branth et al., 2009), mis võivad põhjustada metaboolse stressi situatsiooni. See vastutasuks mõjutab mitmeid füsioloogilisi süsteeme (Newcomer et al., 2005). Kroonilise treeningu ja kehalise stressi lõpptulemuseks on organismi energiakasutamise tõhustumine. Selle kaudu muudetakse toitained väliseks tööks ning välditakse negatiivset metaboolset stressi, mis on põhjustatud kõrge energiakäibest ja ammendunud energiavarudest. Metaboolne stress võib esile tulla just kõrge intensiivsusega treeningu ajal, kui substraadi vajadused ei ole täidetud ning metaboolne regulatsioon hõlmab näiteks olulisi hormonaalseid ja immunoloogilisi vastuseid (Coyle, 2000). Selline seisund sisaldab märke insuliini resistentsusest ja halvenenud rakusisesest glükoosi kättesaadavusest, mis arvatavasti tekitab ionopumpade energia varustamise halvenemist ja kulmineerub raku osmoregulatsiooni häirumisega. Seega tähendab pikaajaline tugev kehaline aktiivsus energia metabolismi, mis hõlmab paljusid teisi mehhanisme. Nende alla kuuluvad oksüdatiivse stressi tõus, soojuse produktsioon, põletikureaktsioonide aktivatsioon ja ebapiisavast ATP varust tulenevad rakahäire tagajärjed (Cuisinier et al., 2001). Cf-DNA kroonilist tõusu on täheldatud mitmete uuringute (Branth et al., 2009; Fatouros et al., 2006) korral, kus cf-DNA kontsentratsioon muutus sõltuvalt treeningmahust ja intensiivsusest mitme nädala jooksul.

Pikaajalised intensiivsed treeningud põhjustavad skeletilihaste glükogeeni ja triglütseriidide ammendumist (Jansson & Kaijser, 1987), põhjustades sellega metaboolset stressi (van Loon, 2004). Energiavarude ammendumise tulemusena kuhjuvad organismis ebatavalised ioonid ja jääkained. Need põhjustavad lihastöö võimekuse langust ja rakukahjustusi. DNA ja rakukahjustuse tulemusena vabaneb organismi cf-DNA. Selle vastu võib olla meie lihastes tauriin, mis võib omada olulist rolli lihaste metabolismis ja funktsioonis, kuid mille olulisus on veel ebaselge (Branth et al., 2009; Cuisinier et al., 2001).

Rakkude metaboolsele stressile võib viidata insuliini resistentsus. See tähendab, et vastupidavustreeningu ajal püsib vere glükoosi tase stabiilsena või väheneb vähesel määral. See viitab rasvade oksüdatsiooni tõusule, mille tulemusena peaks insuliini tase vähenema (Millard-Stafford et al., 1992). Branth et al. (2009) 7 h jalgrattatesti uuringus leiti aga ringleva glükoosi taseme tõus, samal ajal kui insuliini tase püsis muutumatuna. See võib peegeldada insuliini resistentsust. Insuliini resistentsuse tulemusena halveneb ionopumpade energiaga varustamine ja häirub raku osmoregulatsioon, mis põhjustab raku hukkumise ja cf-DNA

vabanemise (Cuisinier et al., 2001). Insuliini resistentsus on leitud tugeva metaboolse stressiga sportlaste uurimisel (Branth et al., 2007), mille põhjustajaks on erütrotsüütide väga spetsiifiliste siduvate omadustega insuliini retseptorid. Ringleva insuliini taseme tõus võib põhjustada selle retseptorite allareguleerimist (Sanchez-Margalet et al., 1994), mille tõttu võib erütrotsüütide ATP täitmine Na^+/K^+ ATPaasiga olla defitsiidis. See viib elektrokeemilise potentsiaali vähenemiseni ning põhjustab Na^+ , Ca^{2+} ja vee taseme tasakaalu muutusi raku sees ja väljas. See põhjustab raku dehüdratsiooni, mis kajastub selgelt vähenenud erütrotsüütide keskmises mahus ja samaaegselt märgatavalt tõusnud hemokontsentratsioon. Kogu protsess põhjustab metaboolset stressi ja cf-DNA vabanemist (Ronquist et al., 2001).

Metaboolset stressisituatsiooni näitab ka vereplasma maloondialdehüüdi kontsentratsiooni kõrge tase peale treeningut. Maloondialdehüüdi tase on korrelatsioonis glükogeeni kasutamisega ja seega kaudselt energia käibe ja/või substraadi defitsiidiga. Lisaks on metaboolse stressi viiteks leitud mitmekordne tõus tsütokiini IL-6 tasemes treeningu järgselt. Pikaajaline treening põhjustab glükogeeni vähenemist, mis on seotud kindlate tsütokiinide taseme tõusuga ning kõrge tase võib viidata suuremale metaboolsele stressile (Nehlsen-Cannarella et al., 1997). Metaboolne stress mõjutab mitmeid füsioloogilisi süsteeme, millest tulenevad rakuhäire tagajärjed ja cf-DNA vabanemine (Cuisinier et al., 2001; Newcomer et al., 2005).

Metaboolne kurnatus tähendab raku tasandil tasakaalu puudumist ATP ning ADP, AMP ja adenülaat kataboliitide vahel. See vähendab ATP hulka ionopumpade energiana, eriti Na^+/K^+ ATPaasi. Vähenenud elektrokeemiline potentsiaal viib Na^+ , Ca^{2+} ja vee taseme tõusuni raku ning põhjustab sellega rakuturset. Rakuturset on mingil määral leevendanud tauriin, mida teatakse osmoregulaatorina paljudes rakkudes. Aminohappe tauriini imendumine raku on Na^+ -sõltuv ja rakusisene tauriin väljendab raku energiataset (osmootne töö on tehtud Na^+ gradiendi arvelt). Ükskõik millise raku energia metabolismi häire korral saab tauriin gradiendi suunas väljavoolu muuta Na^+ gradiendi vastassuunda. Rakuvälist Na^+ saab omakorda kasutada $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transpordis, vähendades rakusisest Ca^{2+} hulka ja samuti saab rakusisene Na^+ koos tauriiniga teha läbi ühistranspordi rakust välja nagu eelpool kirjeldatud. Lõpptulemuseks on rakuvälise tauriini kuhjumine, et soodustada raku ellujäämist. Tasakaalu puudumise ebaefektiivne parandamine põhjustab pikaajalist rakuturset, millele rakud vastu ei pea. Selle tulemusena toimub rakkude hävimine ja cf-DNA kontsentratsiooni tõus (Branth et al., 2009).

Pikaajaliste kõrge intensiivsusega treeningutega esile kutsutud metaboolse stressi situatsioon põhjustab füsioloogiliste süsteemide muutused (Branth et al., 2009; Newcomer et al., 2005).

Kehaline koormus tingib immuunsüsteemi muutused ja kõrgeenenud cf-DNA kontsentratsiooni. Krooniline cf-DNA taseme tõus võib olla ületreeningu sündroomi tunnuseks, kuid praeguseks ei ole veel selle seost ületreeningu markerina tõestatud. Seetõttu on cf-DNA olulisus ületreeningu, sooritustaseme ja füüsilise kurnatuse taseme suhtes ebaselge (Breitbach et al., 2012). Ületreeningu sündroomi tõendeid ei saa võtta hetkel piisava kindlusega, kuid tõusud CK, UA ja CRP tasemes viitavad hilisele raku või DNA kahjustusele lihaskoe parandamisel treeningu järgselt (Breitbach et al., 2012). Arvatakse, et cf-DNA'd saab võtta ületreeningu sündroomi markerina, kui kontsentratsioonid langeksid algtasemele ühe päeva jooksul peale kroonilist edukat treeningkoormust, mis ei ole põhjustanud väsimuse sündroomi (Fatouros et al., 2006). Tõus krooniliste harjutuste tõttu võib olla põhjendatud põletikuliste mehhanismidega, mis on tulenenud kroonilistest haigustest, sidudes cf-DNA nekroosi ja apoptoosiga. Hapnik- ja laktaatsõltuvad mehhanismid võivad selgitada cf-DNA kontsentratsiooni muutusi kõikide treeningute korral niipea kui laktaadi kontsentratsioon, stressihormoonide tase või kehatemperatuur tõuseb järk-järgult (Beiter et al., 2011). Praegused teadmised cf-DNA kuhjumisest akuutsete või krooniliste harjutuste korral on ebapiisavad, et selgitada kogu mehhanismi (Breitbach et al., 2012).

KOKKUVÕTE

Cf-DNA on rakust väljunud arvatavalt raku vigastuse või surma korral. Selle olulisust on hinnatud erinevate patoloogiliste seisundite korral, kuid hiljutised uuringud on cf-DNA kontsentratsiooni tõusu leidnud ka kehalise koormuse tulemusena. Uuringute käigus on võrreldud cf-DNA kontsentratsiooni tõusu müoglobiini, uurea, CRP, CK, UA, ksantiini, laktaadi, HMBG1 ja DNAasi kineetikatega, mis näitavad lihasväsimust ning rakukahjustusi.

Suurimaks väljakutseks antud teema puhul on hetkel küsimus, millest ja kuidas cf-DNA tekib. Välja on pakutud mitmeid erinevaid versioone, mis on kõik seostatud rakukahjustustega. Olulised cf-DNA kontsentratsiooni tõusu erinevused on leitud ratta-, jooksu- ja jõutõstmistreeningu võrdlusel. Tulemused näitavad suurimat tõusu jooksutreeningu ajal ning viitavad treeninguviisile kui cf-DNA vabastamise olulisele faktorile.

Cf-DNA vabastamise välja pakutud mehhanismid on järgmised: (i) apoptoos ehk programmeeritud rakusurm; (ii) nekroos ehk kahjustavate tegurite toimel tekkinud programmeerimata rakusurm; (iii) ROS ehk reaktiivsed hapnikuühendid, mis tekitavad DNA kahjustusi ristsidemete lõhkumisena ja ahelakatkestustena; (iv) cf-DNA ja laktaadi vaheline seos; (v) NEToos ehk neutrofiilide ekstratsellulaarsete lõksude moodustumine; (vi) aktiivne cf-DNA vabastamine ekstratsellulaarsest või intratsellulaarsest DNA'st; (vii) leukotsüütide oksüdatiivne lõhkemine, mis on põhjustatud hüperoksiast ja radikaalide produktsioonist.

Cf-DNA kontsentratsiooni oluline tõus on leitud koheselt peale treeningu lõpetamist, pöördudes tagasi algtasemele 2 h jooksul, mis viitab kiirele cf-DNA eemaldamisele. Enamjaolt eemaldatakse veres ringlev cf-DNA maksas ja vähesel määral neerudes. Hiline või aeglane cf-DNA eemaldamine on seotud kroonilise väsimussündroomiga.

Akute kehaline koormus põhjustab ajutist isheemiat lihases ja vabade hapnikuradikaalide hulga suurenemist. See viib energeetilise ja oksüdatiivse stressini. Need põhjustavad põletikke ning lihas- ja DNA kahjustusi, mille tõttu tõuseb cf-DNA kontsentratsioon.

Regulaarne krooniline koormus kutsub esile metaboolse stressi, mis tähendab raku tasandil energeetilise tasakaalu puudumist ja mis põhjustab rakuruset. Pikaajaline kehaline koormus tingib organismi energiakasutamise tõhustumise, immuunsüsteemi muutused ja kõrgeenenud cf-DNA kontsentratsiooni. Seetõttu on krooniline cf-DNA taseme tõus seostatud ületreeningu sündroomiga. Praeguseks on aga sellekohast informatsiooni liiga vähe, et tõendeid piisava kindlusega võtta.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Albus M, Brahmaer A, Tug S, Helmig S, Zahn D, et al. Cell-free DNA levels in healthy subjects. *Sports Medicine* 2015.
2. Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, et al. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European Journal of Applied Physiology* 2008; 104(4):711-717.
3. Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, et al. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *European Journal of Applied Physiology* 2010; 110(4):695-701.
4. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical Chemistry* 2004; 50(9):1668-1670.
5. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Nieb A-M, Simon P. Short-Term Treadmill Running as a Model for Studying Cell-Free DNA Kinetics In Vivo. *Clinical Chemistry* 2011; 57(4):633-636.
6. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2010; 48(6):757-767.
7. Branth S, Hambraeus L, Piehl-Aulin K, Essen-Gustavsson B, Åkerfeldt T, et al. Metabolic stress-like condition can be induced by prolonged strenuous exercise in athletes. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2009; 114(1):12-25.
8. Branth S, Ronquist G, Stridsberg M, Hambraeus L, Kindgren E, et al. Development of abdominal fat and incipient metabolic syndrome in young healthy men exposed to long-term stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2007; 17(6):427-435.
9. Breitbach S, Sterzing B, Magallanes C, Tug S, Simon P. Direct measurement of cell free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *Journal of Applied Physiology* 2014; 117(2):119-130.
10. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One* 2014; 9(3):e87838.
11. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating Cell-Free DNA. An Up-Coming Molecular Marker in Exercise Physiology. *Sports Medicine* 2012; 42(7):565-586.
12. Camus G, Poortmans J, Nys M, Deby-Dupont G, Duchateau J, et al. Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clinical Science* 1997; 92(4):415-422.

13. Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1137:218–221.
14. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(9):5119-5123.
15. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenatal Diagnosis* 2007; 27(1):6–10.
16. Conley KE, Ordway GA, Richardson RS. Deciphering the mysteries of myoglobin in striated muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 2000; 168(4):623–634.
17. Coyle EF. Physical activity as a metabolic stressor. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72:512S-520S.
18. Cuisinier C, Ward RJ, Francaux M, Sturbois X, de Witte P. Changes in plasma and urinary taurine and amino acids in runners immediately and 24 h after marathon. *Amino Acids* 2001; 20(1):13-23.
19. Deligezer U, Eralp Y, Akisik EE, Akisik EZ, Saip P, et al. Size distribution of circulating cell-free DNA in sera of breast cancer patients in the course of adjuvant chemotherapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008; 46(3):311–317.
20. Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, et al. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry* 2006; 52(9):1820-1824.
21. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Destouni A, Michailidis Y, et al. Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clinical Biochemistry* 2010; 43(16-17):1368-1370.
22. Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhuth HH, et al. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *Journal of Applied Physiology* 2000; 89(2):704-710.
23. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Review* 2001; 7:66–89.
24. Fehrenbach E, Schneider ME. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports Medicine* 2006; 36(5):373-384

25. Feng J, Gang F, Li X, Jin T, Houbao H, et al. Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen. *International Urology and Nephrology* 2013; 45(4):1023–1028.
26. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clinical Chemistry* 2009; 55(3):587–589.
27. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2007; 176(2):231–241.
28. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(36):15880–15885.
29. Goodman C, Henry G, Dawson B, Gillam I, Beilby J, et al. Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a twenty-one kilometre run. *Australian Journal of Science and Medicine in Sport* 1997; 29(4):95–98.
30. Haller N, Tug S, Breitbach S, Jörgensen A, Simon P. Increases in circulating, cell-free DNA during aerobic running depend on intensity and duration. *International Journal of Sports Physiology and Performance* 2016; 6:1-21.
31. Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *The FASEB Journal* 2007; 21(10):2602–2612.
32. Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian journal of physiology and pharmacology* 1998; 42(4):440-452.
33. Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes* 2008; 28(1):70.
34. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* 2001; 61(4):1659–1665.-
35. Jansson E, Kaijser L. Substrate utilization and enzymes in skeletal muscle of extremely endurance-trained men. *Journal of Applied Physiology* 1987; 62(3):999–1005.
36. Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181-182:471-474.
37. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemmarck U, Back W, Gross WL, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine* 2009; 15(6):623–625.

38. Lafforgue P. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. *Joint Bone Spine* 2006; 73(5):500-507.
39. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clinical Chemistry* 2003; 49(8):1286–1291.
40. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* 1977; 37(3):646-650.
41. Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, Velpandi A, Srinivasan A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *Journal of Virological Methods* 1991; 34(1):105–112.
42. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 2008; 30(4):352-358.
43. Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 249(2):366–370.
44. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, et al. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(2):421–426.
45. Millard-Stafford ML, Sparling PB, Roskopf LB, DiCarlo LJ. Carbohydrate-electrolyte replacement improves distance running performance in the heat. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 1992; 24(8):934-940.
46. Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of applied physiology* 2002; 93(1):147-153.
47. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, et al. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *Journal of immunology* 2014; 192(11):5314-5323.
48. Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, et al. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *Journal of Applied Physiology* 1997; 82(5):1662-1667.
49. Nehlsen-Cannarella SL, Nieman DC, Jessen J, Chang L, Gusewitch G, et al. The effects of acute moderate exercise on lymphocyte function and serum immunoglobulin levels. *International journal of sports medicine* 1991; 12(4):391-398.

50. Neubauer O, König D, Wagner K-H. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. *European Journal of Applied Physiology* 2008; 104(3):417-426.
51. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses? *Exercise Immunology Review* 2008; 14:51-72.
52. Newcomer BR, Sirikul B, Hunter GR, Larson-Meyer E, Bamman M. Exercise over-stress and maximal muscle oxidative metabolism: a ³¹P magnetic resonance spectroscopy case report. *British Journal of Sports Medicine* 2005; 39(5):302-306.
53. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89(8):3375–3379.
54. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise [Review]. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2001; 33:393–396.
55. Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology* 2002; 27:349–395.
56. Rainer TH, Lo YM, Chan LY, Lit LC, Cocks RA. Derivation of a prediction rule for posttraumatic organ failure using plasma DNA and other variables. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; 945:211–220.
57. Reid VL, Gleeson M, Williams N, Clancy RL. Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections. *British Journal of Sports Medicine* 2004; 38(1):42–45.
58. Ronquist G, Rudolphi O, Engstrom I, Waldenstrom A. Familial phosphofructokinase deficiency is associated with a disturbed calcium homeostasis in erythrocytes. *Journal of Internal Medicine* 2001; 249(1):85-95.
59. Sanchez-Margalet V, Valle M, Lobon JA, Maldonado A, Escobar F, et al. Diminished insulin receptors on erythrocyte ghosts in nonobese patients with essential hypertension independent of hyperinsulinemia. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1994; 24(1):74-77.
60. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, Varpula M, Karlsson S, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical Chemistry* 2008; 54(6):1000–1007.
61. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11(6):426–437.

62. Scott JP, Sale C, Greeves JP, Casey A, Dutton J, et al. Cytokine response to acute running in recreationally-active and endurance-trained men. *European journal of applied physiology* 2013; 113(7):1871-1882.
63. Smith JA, Telford RD, Mason IB, Weidemann MJ. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *International journal of sports medicine* 1990; 11(3):179-187.
64. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters* 2007; 581(5):795–799.
65. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Science* 2006; 1075:191-196.
66. Tug S, Helmig S, Deichmann ER, Schmeier-Jürchott A, Wagner E, et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exercise immunology review* 2015; 21:164-173.
67. Tug S, Mehdorn M, Helmig S, Breitbach S, Ehlert T, et al. Exploring the potential of cfDNA measurements after an exhaustive cycle ergometer test as a marker for performance related parameters. *International Journal of Sports Physiology and Performance* 2016; 6:1-24.
68. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1075:299–307.
69. Van Loon LJ. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *Journal of Applied Physiology* 2004; 97(4):1170-1187.
70. Velders M, Treff G, Machus K, Bosnyak E, Steinacker J, et al. Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clinical Biochemistry* 2014; 47(6):471-474.
71. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, et al. Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exercise Immunology Review* 2011; 17:6–63.
72. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2001; 38(3):365–371.

SUMMARY

Cf-DNA has extracted from the cell due to injury or cell death. Cf-DNA importance have been evaluated in different pathological conditions, however recent studies have found increased cf-DNA concentration also after physical exercise. Different studies have compared increases in cf-DNA concentration with myoglobin, urea, CRP, CK, UA, xanthine, lactate, HMGB1 and DNase kinetics which are indicators of fatigue and cell damages.

The most important unanswered question to date is mechanism how and from where cf-DNA is released. Studies have suggested different versions which all are relate to cell damage. Important differences in cf-DNA concentrations have been found in between running, cycling and powerlifting exercise. Results are showing the biggest increase in run training which indicates the importance of training type in cf-DNA release mechanism.

Suggested cf-DNA release mechanisms are following: (i) apoptosis – programmed cell death; (ii) necrosis – unprogrammed cell death which is generated by damaging factors; (iii) ROS – reactive oxygen species which are causing DNA damage in form of DNA cross-links and strand breaks; (iv) the relationship between cf-DNA and lactate; (v) NETose – neutrophil extracellular traps formation; (vi) active cf-DNA release from extracellular or intracellular DNA; (vii) leukocyte oxidative burst caused by hypoxia and radical production.

Important increases in cf-DNA concentration have been found immediately post-exercise returning to baseline within 2 h. This indicates to fast cf-DNA elimination. Circulating cf-DNA is eliminated mostly in the liver and a small extent in the kidneys. Late or slow elimination is related with chronic fatigue syndrome.

Acute physical exercise is related with temporary ischemia in muscle and rise in the oxygen radicals which in turn leads to energetic and oxidative stress. Energetic and oxidative stress are causing inflammations, muscle and DNA damages, which are the possible reasons for increased cf-DNA.

Regular chronic exercise may cause metabolic stress condition, which means imbalance in energy production and utilization, causing cell swelling. Chronic exercise is resulting with improvement in energy production, causing changes in the immune system and increases in cf-DNA concentration. Thus it is assumed that chronic increases in cf-DNA concentration may be related with overtraining syndrome. However, to date it is subject to further discussion.

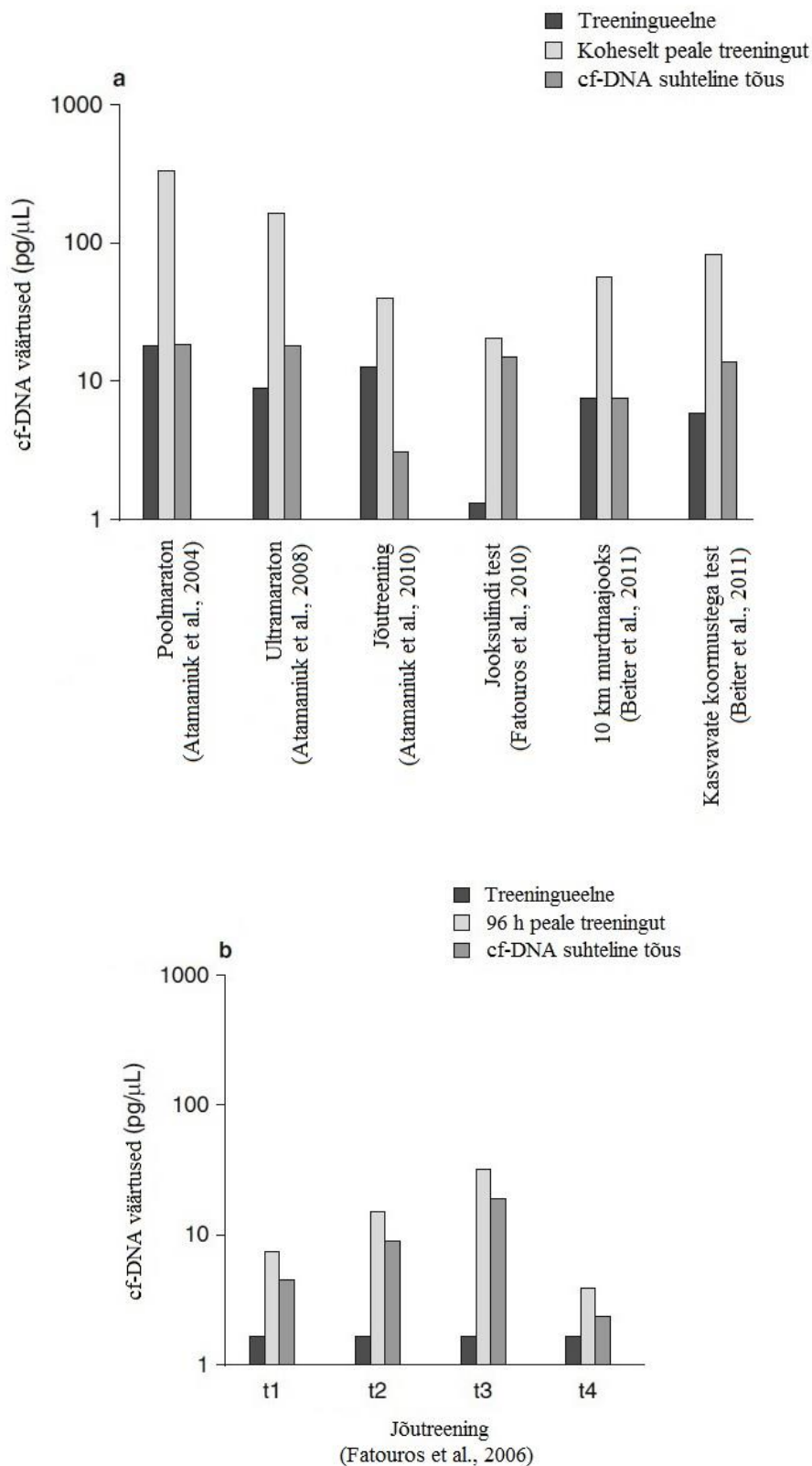
LISA 1

Allikas	N	Osalejate iseloomustus	Harjutuse protokoll	cf-DNA algfase (ng·ml⁻¹)	cf-DNA lõpptase (ng·ml⁻¹)	cf-DNA taseme tõus (korda)
Atamaniuk et al. 2004	25	Poolmaratoni aeg 90-110 min	Poolmaraton	18.01±2.80	334.4±139.4	18.5
Fatouros et al. 2006	17	Tervisesportlased: Pikkus 1.77±0.11m, kaal 77±7.1 kg, keha rasva% 12.2±2.1.	12 nädalane jõutreening, 1. ja 4. nädal madalal intensiivsusel: 2 treeningut nädalas, 2 seeriat, 10-12 kordust, 70% 1 KM-st; 2. nädal kõrgel intensiivsusel: 4 treeningut nädalas, 4 seeriat, 6-10 kordust, 75-85% 1 KM-st; 3. nädal väga kõrgel intensiivsusel: 6 treeningut nädalas, 6 seeriat, 1-6 kordust, 85-100% 1 KM-st; perioodide vahel 5 päevane puhkus	31.4±13.8	1. nädal 143.5±22.9 2. nädal 289.9±41.1 3. nädal 605.7±116.4 4. nädal 74.8±29.6	1. nädal 4.6 2. nädal 9.2 3. nädal 19.3 4. nädal 2.4
Atamaniuk et al. 2008	14	Tervisesportlased: pikkus 1.80±0.06 m, kaal 76.8±6.7 kg (M), pikkus 1.60±0.06 m, kaal 60.8±7.1 kg (N), 6 h jooksul läbiti 50-80 km, keskmine intensiivsus 70% VO _{2max} -st	6 h ultramaraton	9.0±5.6	162.5±201.4	18
Atamaniuk et al. 2010	12	Tippспортlased: pikkus 1.77±0.06 m, kaal 88.6±16.7 kg, keha rasva% 15.7±9.4	Kõrge intensiivsusega, kompleksed, kontsentrilised ja ekstsentrilised jõutõstmisharjutused, 6 harjutust, 6 seeriat, 1-5 kordust, 90-95% 1 KM-st, puhkepaus 4-10 min	12.95±4.42	40.77±31.94	3.1
Fatouros et al. 2010	11	Sportlased: pikkus 1.75±0.03 m, kaal 75±5 kg, keha rasva% 14±3, VO _{2max} 47±6 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	Jooksutest kurnatuseni: 45 min kiirusel 70-75% VO _{2max} -st, alates 46 min kiirusel 90% VO _{2max} -st	1.32±0.53	20.13±0.4	15
Beiter et al. 2011	53	Kiirusel 89% VO _{2max} -st laktaadi kontsentratsioon 7 mmol·L ⁻¹	Murdmaajooksu intervallid keskmisel kiirusel 89% VO _{2max} -st, 10x1000 m, 15 min puhkepausidega	7.53	56.95	7.6
Beiter et al. 2011	9	Anaeroobse läve kiirus 13.8±2.4 km·h ⁻¹	Kasvavate kiirustega jooksutest kurnatuseni: iga 3 min järel tõsteti kiirust 2 km·h ⁻¹	5.89±1.96	58.3±20.7	9.9
Breitbach et al. 2014	10	Tervisesportlased: pikkus 1.78±0.10 m, kaal 74.1±11.3 kg	10 km teatejooks	7.75±2.96	65.0±31.1	8.4
Velders et al. 2014	10	Võistlussportlased: pikkus 1.90±0.02 m, kaal 85.3±6.0 kg, maksimaalne võimsus anaeroobsel lävel 300.0±4.6 W	Kasvavate koormustega test sõudeergomeetril: algus 200 W ning iga 4 min järel tõsteti koormust 50 W	117	290	2.5
Haller et al. 2016	13	Tervisesportlased: pikkus 1.77±0.10 m, kaal 69.6±12.2 kg, anaeroobse läve kiirus 12.5±0.8 km·h ⁻¹	Kasvavate kiirustega jooksutest kurnatuseni: algus 6 km·h ⁻¹ ning iga 3 min järel tõsteti kiirust 2 km·h ⁻¹	5.38±2.90	38.0±25.5	7.06
Haller et al.	13	Tervisesportlased: pikkus 1.77±0.10 m, kaal	40 min jooks kiirusel 9.6 km·h ⁻¹ iga 10 min järel 1	5.91±2.20	39.3±25.9	6.6

2016		69.6±12.2 kg, anaeroobse läve kiirus 12.5±0.8 km·h ⁻¹	min puhkepaus kapillaarvere proovide võtmiseks laktaadi määramiseks			
Tug et al. 2016	11	Võistlussportlased: pikkus 1.81±0.03 m, kaal 75.75±5.19 kg, keha rasva% 11.1±2.86, VO _{2max} 63.5 ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	Kasvavate koormustega test veloergomeetril: algus 50 W ning iga 3 min järel tõsteti koormust 50 W	6.0*	30.0*	5.0

Läbiviidud uuringud cf-DNA kohta avaldamise kronoloogilises järjestuses. N – uuringus osalejate arv; DNA – desoksüribonukleiinhape; et al – ja teised; a – aasta; h – tund; min – minut; km – kilomeeter; m – meeter; KM – kordusmaksimum; VO_{2max} – maksimaalne hapnikutarbimine; W – vatt; h/nädalas – tundi nädalas; km·h⁻¹ – kilomeetrit tunnis; ml·min⁻¹·kg⁻¹ – milliliitrit minutis kilogrammi kohta; kcal·min⁻¹ – kilokalorit minutis; mmol·L⁻¹ – millimooli liitris; ng·ml⁻¹ – nanogrammi milliliitris; * arvutatud Tug et al. (2016) joonise põhjal.

LISA 2



cf-DNA kontsentratsiooni keskmised näitajad peale erineva iseloomuga treeninguid. (a) Akuutsete treeningute mõõtmised. (b) Krooniliste treeningute mõõtmised. Sõltuvalt uuringute erinevatest laboratoorsetest meetoditest ja cf-DNA eripäradest on võrreldavad vaid suhtelised tõusud (muutused kordades). **cf-DNA** = rakuvaba DNA; **t** = nädal. (Breitbach et al., 2012 järgi).

AUTORI LIHTLITSENTS

Mina _____ Marianne Haug _____
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ 07.01.1996 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

_____ Rakuvaba DNA spordis _____
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Martin Mooses _____,
(*juhendaja nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 02.05.2017 (*kuupäev*)