

*Abschlussbericht zum Vorhaben*

„Pilotstudie zum Einfluss von Schichtarbeit auf die Gesundheit –  
Untersuchung des Einflusses von Schichtarbeit auf Metabolom und  
Hormonprofile bei Gesundheits- und Krankenpflegerinnen“ (FP 0321)

*Projektlaufzeit*

01/2011 – 12/2017  
(inkl. Verlängerungen)

Berichtszeitraum

01/2011 – 12/2017

*Autoren:*

Markus Rotter, Stefan Brandmaier, Rui Wang-Sattler. Helmholtz-  
Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und  
Umwelt (HMGU)

Sylvia Rabstein, Katarzyna Burek, Martin Lehnert, Simone Putzke,  
Alexandra Beine, Thomas Behrens, Dirk Pallapies, Thomas Brüning.  
Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen  
Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA)

## Inhalt

Kurzfassung .....	3
Abstract.....	4
1. Problemstellung .....	6
2. Forschungszweck/-ziel.....	6
2.1 Erweiterung der Zielsetzung .....	7
3. Methodik .....	8
3.1 Studiendesign .....	8
3.2 Rekrutierung und Feldphase.....	8
3.3 Studieninstrumente .....	9
3.4 Probenbearbeitung.....	11
3.5 Hormonbestimmungen .....	11
3.6 Metabolombestimmungen .....	11
3.6.1 Targeted Metabolombestimmung .....	11
3.6.2 Non-targeted Metabolombestimmung .....	12
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens.....	12
4.1 Charakterisierung der Studienpopulation .....	12
4.2 Hormone im Speichel.....	15
4.2.1 Untersuchung der Assoziationen zwischen Blaulicht, Melatonin und Estradiol.	15
4.2.2 Cortisol-Aufwachreaktion.....	18
4.3 Metabolite in Urinproben und Hormone in Speichelproben .....	22
4.3.1 Lagerbedingungen von Urinproben .....	22
4.3.2 Targeted Metaboliten-Profile .....	24
4.3.3 Non-targeted Metaboliten-Profile.....	29
4.4 Projektveröffentlichungen.....	30
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen.....	31
5.1 Licht und Melatonin .....	31
5.2 Cortisol-Aufwachreaktion .....	31
5.3 Schichtarbeit und Metabolite .....	32
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen .....	34
6.1 Urinprobenstabilität .....	34
6.2 Schichtarbeit und Hormone.....	34
6.3 Schichtarbeit und Metabolite .....	35
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan.....	37
8. Anhang/Anhänge .....	37
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte .....	41

## Kurzfassung

In diesem Abschlussbericht sind die Ergebnisse des Forschungsvorhabens zur Ermittlung von Indikatoren der Beanspruchung durch Schicht- und Nachtarbeit dargestellt. Der Fokus dieses Berichts liegt auf der Darstellung der Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von Schichtarbeit auf das Metabolom und auf relevante Hormone.

In dieser Feldstudie zur Ermittlung von Indikatoren der Beanspruchung durch Schicht- und Nachtarbeit wurden insgesamt 100 weibliche Beschäftigte des BG Klinikums Bergmannsheil in mehrtägiger Schichtarbeit untersucht. 75 Probandinnen wurden während zwei aufeinanderfolgender Arbeitstage mit Tagschicht sowie während drei aufeinanderfolgender Arbeitstage mit Nachtschicht untersucht. Eine Vergleichsgruppe von 25 Mitarbeiterinnen mit reinen Tagdiensten hat an zwei Arbeitstagen das Studienprotokoll durchlaufen. Die Probandinnen wurden angewiesen, während der mehrtägigen Untersuchungsphasen Speichelproben an festgelegten Zeitpunkten zu sammeln. Weiterhin wurden von jeder Teilnehmerin Spontanurinproben asserviert. In den Speichelproben erfolgte die Bestimmung von Melatonin als wichtigstes Markersignal des circadianen Rhythmus, sowie als weitere relevante Hormone Cortisol und 17 $\beta$ -Estradiol. Das Metabolom wurde mittels der Urinproben analysiert. Wichtige individuelle Faktoren wurden anhand von Interviews erhoben. Der Chronotyp wurde im Rahmen des Erstinterviews mittels des Münchener Chronotyp Fragebogens für Schichtarbeiter bestimmt und nach Früh-, Intermediär- und Spättyp aufgeteilt. Während der Untersuchungsblöcke wurden weiterhin individuelle Lichtexposition und das Schlafverhalten erhoben. Licht in unterschiedlichen Spektralbereichen (darunter Blaulicht im Frequenzbereich um 460 nm) wurde über die Studientage alle 10 Sekunden mit an der Schulter getragenen Messgeräten (LightWatcher<sup>TM</sup>) aufgezeichnet.

### Schichtarbeit und Hormone:

1. Die hier ermittelten Ergebnisse beschreiben erstmalig die 24-h Blaulichtexposition an Arbeitstagen mit Tag- und Nachtschicht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur die Schichtarbeit, sondern auch andere Faktoren die Blaulichtexposition beeinflussen und somit zusammen das Blaulicht-Tagesprofil gestalten.
2. Bezüglich der ‚Light-at-night‘-Hypothese lässt sich eine marginale Assoziation zwischen der nächtlichen Blaulichtexposition und der Höhe des Melatoninpeaks in der ersten Nachtschicht beobachten.
3. Untersuchungen zum Einfluss der Schichtarbeit auf Cortisol-Aufwachreaktion und der Rolle des Chronotyps wurden für weibliche Schichtarbeiterinnen durchgeführt. Eine signifikant geringere Cortisol-Aufwachreaktion wurde für alle Schichtarbeiterinnen in der Nachtschicht im Vergleich zur Tagschicht beobachtet.
4. Eine abgeflachte Cortisol-Aufwachreaktion wurde im Zusammenhang mit Nachtschicht sowohl für frühe, intermediäre als auch für späte Chronotypen beobachtet. Inwieweit sich diesbezüglich Unterschiede zwischen Schichtarbeiterinnen und Kontrollgruppe zeigen, wird noch analysiert.

### Schichtarbeit und Metabolite:

1. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei einem Vergleich der Krankenschwestern während der Tagschichten beobachtet, unabhängig davon, ob diese Krankenschwestern nur in Tagschichten oder auch Nachtschichten arbeiten.
2. Bei einem Vergleich der Metaboliten-Profile zwischen Tagschicht und Nachtschicht (innerhalb der Nachtschichtgruppe) konnten für 34% der insgesamt gemessenen Metaboliten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Hier ist besonders auffällig, dass sich vor allem Acylcarnitine bei den frühen Chronotypen stark zwischen Tagschicht und Nachtschicht unterscheiden, was als Anzeichen eines beeinträchtigten Fettsäuremetabolismus aufgrund der zirkadianen Störung gedeutet werden kann. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass frühe und späte Chronotypen in der vorliegenden Studie während der Nachtschicht erhöhtem zellulärem Stress ausgesetzt zu sein scheinen, wohingegen intermediäre Chronotypen besser mit einer Tätigkeit in Nachtschicht zurechtkommen.

## Abstract

This final report presents the results of the research project for the determination of stress indicators of shift work. The focus of this report is on the presentation of results of the impact of shift work on the metabolome and on relevant hormones.

In this field study to determine indicators of stress through shift work, a total of 100 women of the BG Klinikum Bergmannsheil were examined in several-day shifts. 75 subjects were examined for two consecutive working days during day shift and three consecutive working days during night shift. A comparison group of 25 women working only day shift completed the study protocol during two working days. Subjects were instructed to collect saliva samples at fixed times during the consecutive day study period. Furthermore, each participant donated spontaneous urine samples. In the saliva samples, the melatonin levels as the most important marker signal of circadian rhythm, as well as the levels of other relevant hormones cortisol and 17 $\beta$ -estradiol, were assessed. The metabolome was analyzed based on urine samples. Important individual factors were collected through interviews. The chronotype was determined during the first interview by means of the Munich Chronotype questionnaire for shiftworkers and subdivided into early, intermediate and late type. During the examination blocks, individual light exposure and sleeping behavior were further recorded. Light in different spectral regions (including blue light in the frequency range around 460 nm) was recorded every 10 seconds during the study days with shoulder-mounted instruments (LightWatcherTM).

### Shift work and hormones:

1. The results obtained here describe for the first time the 24-h blue light exposure on working days with day and night shifts. The results indicate that not only the shift work, but also other factors influence the blue light exposure and thus together form the blue light day profile.

2. With regard to the 'light-at-night' hypothesis, a marginal association between the nocturnal blue light exposure and the height of the melatonin peak in the first night shift can be observed.
3. Studies on the influence of shift work on cortisol awakening and the role of the chronotype were carried out for female shift workers. A significantly lower cortisol awakening response was observed for all shift workers in the night shift compared to the day shift.
4. A flattened cortisol awakening reaction was observed with night shift for both early, intermediate and late chronotypes. To what extent differences between shiftworkers and the control group can be seen is still being analyzed.

#### **Shift work and metabolites:**

1. No significant differences were observed in the day shifts metabolite profiles, when comparing nurses that are only working day shift and those that also work in night shift.
2. Comparing the metabolite profiles between day shift and night shift (within the night shift group), significant differences were observed for 34% of the used measured metabolites. Especially, in nurses with early chronotype, we observed that acylcarnitines altered significantly between day and night-shifts, which indicate a strong impairment of the fatty acid oxidation due to the circadian disturbance. Furthermore, it can be seen that early and late chronotypes in the present study appear to be exposed to increased cellular stress during the night shift, whereas intermediate chronotypes are better able to cope with night shift activity.

## 1. Problemstellung

In Deutschland arbeiten laut Mikrozensus des Statistischen Bundesamtes etwa 17 Millionen Erwerbstätige in Schichtarbeit. Mögliche gesundheitliche Schäden durch die Schichtarbeit haben besondere Aufmerksamkeit erlangt, seitdem die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) im Jahre 2007 Schichtarbeit, die mit zirkadianen Störungen verbunden ist, als wahrscheinlich krebserregend beim Menschen (Gruppe 2A) einstuft (IARC, 2008). Die zugrunde liegenden Mechanismen auf dem Weg zur Entstehung von chronischen Erkrankungen sind bisher jedoch weitgehend unklar. Die Mehrzahl der biologischen Prozesse weist einen Tageszyklus auf. Eine nachhaltige Störung der Synchronisation zwischen internen biologischen Prozessen und externen Einflüssen, die mit einer Funktionsstörung verbunden ist, wird als circadiane Disruption bezeichnet.

Bislang ist noch unzureichend bekannt, welchen Einfluss Schichtarbeit auf den Tagesgang von Stoffwechsel und Hormonen ausübt und welche Biomarker neben Melatonin, eine circadiane Disruption anzeigen könnten. Die Rolle weiterer Einflussfaktoren wie z.B. Lichtverhältnisse wurde bisher kaum untersucht. Neueste Entwicklungen in der Biochemie machen es möglich, eine Vielzahl von Metabolitkonzentrationen mit Hochdurchsatzverfahren auch im Urin zu bestimmen und Hormone in Speichelproben zu untersuchen. Das ‚Metabolom‘ charakterisiert die Vielzahl der verschiedenen Stoffwechselprozesse und setzt sich insbesondere zusammen aus Metaboliten des Aminosäure-, Lipid- und Zuckerstoffwechsels. Neue Analyseverfahren ermöglichen ein umfassendes ‚Readout‘ des physiologischen Zustands eines Menschen. Während das Proteom mehr als eine Million Moleküle umfasst, ist das Metabolom mit etwa 2500 Komponenten ‚überschaubarer‘ und aufgrund der langjährigen Kenntnisse des Stoffwechsels gut zu interpretieren. Die Verfahren können nun auch mit nichtinvasiver Probengewinnung in großen wissenschaftlichen Studien eingesetzt werden.

In Anbetracht der großen Zahl von Erwerbstätigen mit Schichtarbeit stellt die Suche nach geeigneten Biomarkern, die eine circadiane Störung charakterisieren, eine Möglichkeit dar, Leitkomponenten für eine arbeitsmedizinische Vorsorge zu finden. Durch die Untersuchung von bis zu 163 Metaboliten aus zentralen Stoffwechselprozessen können möglicherweise besonders sensitive Marker gefunden werden, die einfach und schnell bestimmt werden können, und so zu einer frühzeitigen Aufdeckung von anhaltenden gesundheitlichen Schäden durch Schichtarbeit in Präventionsmaßnahmen beitragen.

## 2. Forschungszweck/-ziel

Hier wurde im Rahmen eines Verbundprojektes mit dem Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung untersucht, wie Schichtarbeit, Schlaf, Lichtverhältnisse und weitere Faktoren den Stoffwechsel (das ‚Metabolom‘) und die Hormonprofile in Tag- und Nachtschichten beeinflussen.

Basierend auf Daten von 100 Krankenschwestern unter Schichtarbeit wurde als Ziel des Forschungsprojektes FP 321 die Untersuchung des Metaboloms (bis zu 163 Metaboliten / Aminosäure- und Lipidstoffwechsel) sowie von Hormonen (Melatonin, Cortisol und Estradiol) als potentielle Biomarker für circadiane Störungen formuliert. Diese könnten circadiane Disruption oder Schlafmangel frühzeitig anzeigen und für die zukünftige arbeitsmedizinische Betreuung von Schichtarbeitern angewendet werden. Des Weiteren sollen sie die durch die

circadiane Störung betroffenen Stoffwechselwege und deren Bedeutung für den Organismus näher darlegen und verstehen helfen.

Es gibt Hinweise, dass Einflüsse von Schlafmangel am Glukosestoffwechsel erkennbar sein könnten, während Chronodisruption durch Melatoninveränderungen erfassbar ist. Mögliche Ergebnisse sind Empfehlungen für Schichtsysteme, die ein Schlafdefizit vermeiden. Für die arbeitsmedizinische Überwachung könnten geeignete Biomarker aus dem Set der Parameter extrahiert werden, die die beste Performance zeigen, Einflüsse von Schichtarbeit und Schlafmangel zu charakterisieren. Die hier eingesetzten aufwändigen Verfahren können gegebenenfalls in Point-of-Care-Tests umgesetzt werden wie z.B. Teststreifen für Urinuntersuchungen.

Dazu wurden Krankenschwestern, die in Nachtschicht arbeiten, mit Krankenschwestern, die nur in Tagschicht arbeiten, verglichen. Weiterhin wurde der Einfluss des Schichtwechsels auf die Verläufe der Metabolom- und Hormonprofile untersucht. Mögliche Einflussfaktoren wie Licht, Chronotyp und Schlafqualität auf das Metaboliten- und Hormonprofil wurden ermittelt. Die Hauptziele dieses Teilprojektes sind:

1. Vergleich der Metabolitkonzentrationen und Hormonspiegel bei Krankenschwestern mit und ohne Nachtschichtarbeit zur Identifizierung potentieller Biomarkern für circadiane Disruption und Schlafmangel
2. Untersuchung der Assoziationen zwischen Schichtarbeit sowie damit verbundenen Expositionen (24-Stunden-Lichtprofile) und circadianen Rhythmen von Melatonin und weiteren Hormonen (Estradiol, Cortisol) sowie Stoffwechselprodukten (Aminosäure-, Zuckerhaushalt, Fettstoffwechsel)
3. Analyse der Verschiebung der biologischen Tagesrhythmen des Metaboloms und der Hormonspiegel aufgrund von Nachtarbeit
4. Ermittlung der unterschiedlichen Einflüsse von Licht und Chronotyp auf das Metaboliten- und Hormonprofil

## 2.1 Erweiterung der Zielsetzung

Im November 2016 wurde die ursprüngliche Zielsetzung in Verbindung mit einem Aufstockungsantrag erweitert. Die Erweiterung des Projekts beinhaltet eine eingehende Analyse der non-targeted (Metabolom) Metaboliten-Profile unter Berücksichtigung der Einflüsse des jeweiligen Chronotyps sein. Die während des zweiten Forschungsbegleitkreises (Dezember 2013) besprochene und nach Umwidmungsantrag (Oktober 2014) bewilligte Messung einer Untergruppe an Krankenschwestern mit der Metabolom-Technologie hat den Vorteil gegenüber der targeted Technologie (Biocrates / hauptsächlich Amino- und Fettsäuren), eine größere Zahl an Stoffwechselprodukten (bis zu 800) abzudecken. Dies ermöglicht eine genauere Identifikation der betroffenen Stoffwechselwege, da einzelne Aminosäuren oftmals in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert sind und nicht ohne weiteres einem einzigen physiologischen Prozess zugeordnet werden können. Können jedoch Konzentrationsunterschiede auch in einem Ausgangstoff oder Produkt der entsprechenden Aminosäure nachgewiesen werden, lässt dies Rückschlüsse auf spezifische enzymatische Reaktionen zu. Anhand der bereits erhobenen Metabolom-Daten wird untersucht, in welcher Form der Chronotyp und Wechselschichttätigkeit Metaboliten-Profile beeinflussen.

## **3. Methodik**

### **3.1 Studiendesign**

Zur Ermittlung von Indikatoren einer gesundheitlichen Beanspruchung durch Schicht- und Nachtarbeit sollten psychomentele Parameter wie Schlafqualität und Vigilanz sowie Metaboliten- und Hormonprofile in verschiedenen Phasen der Tag- und Nachtarbeit bei weiblichen Beschäftigten in der Krankenversorgung des BG Klinikums Bergmannsheil in Bochum untersucht werden. In die Studie wurden Frauen aufgenommen, die folgende Einschlusskriterien erfüllten: Gesundheits- und Krankenpflegerinnen, MTA, MTLA, MTRA, Arzhelferinnen oder Stationssekretärinnen des Bergmannsheils, Tätigkeit in Tag- und/oder Nachtschichten, Alter zwischen 25 bis 65 Jahren. Außerdem wurden folgende Ausschlusskriterien definiert, mit denen die Vergleichbarkeit der Probandinnen zusätzlich gewährleistet werden soll: Schwangerschaft, Stillzeit in letzten 6 Monaten, hormonelle Stimulation, Krebserkrankung.

Das Studiendesign ist eine Längsschnittstudie mit wiederholten Untersuchungen zu definierten Zeiten in mehrtägigen Untersuchungsphasen mit entweder Tagschichten oder Nachtschichten. Die Studienpopulation besteht aus zwei verschiedenen Gruppen von Mitarbeiterinnen. Die Nachtschichtgruppe umfasst Probandinnen im Schichtdienst mit Nachtarbeit, und die Tagschichtgruppe besteht aus Probandinnen mit reinen Tagdiensten. Probandinnen der Nachtschichtgruppe wurden während zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Tagschichten (Tagblock) und während drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Nachtschichten (Nachtblock) untersucht. Ausschließlich am Tage tätige Probandinnen wurden während zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Tagschichten untersucht.

### **3.2 Rekrutierung und Feldphase**

Die Rekrutierung und Untersuchung der Probandinnen nach den Vorgaben des Operationshandbuchs erfolgten auf Grundlage von Genehmigungen der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum vom 22.08.2012 und 02.09.2013. Die Probandenwerbung erfolgte durch Informationsveranstaltungen beim Pflegedienst und in Abstimmung mit dem Personalrat, auf den Krankenstationen und in den Funktionsbereichen des Krankenhauses sowie durch die Distribution von Informationsmaterial und einem Aufruf zur Teilnahme per Anschreiben. Die Motivation zur Teilnahme wurde unterstützt durch die Auszahlung eines Probandengeldes und die Verlosung eines Sachpreises unter den Studienteilnehmerinnen. Zwischen September 2012 und Dezember 2014 wurden unter Beachtung der Einschlusskriterien 114 weibliche Beschäftigte des Klinikums Bergmannsheil in die Studie rekrutiert. In diesem Teil des Forschungsvorhabens wurde im ursprünglichen Arbeitsplan eine Rekrutierung von 200 Mitarbeiterinnen geplant. Insbesondere aufgrund der kurzfristigen Umgestaltungen der Schichtpläne auf den Stationen des Bergmannsheils und der Berücksichtigung der Zyklusphase bei der Planung des Termins für einen Untersuchungsblock hatte sich die ursprünglich geplante Zahl als nicht realisierbar herausgestellt.

Die Feldphase der Studie endete im Mai 2015. Zu diesem Zeitpunkt haben 100 Teilnehmerinnen das aufwändige Studienprogramm komplett abgeschlossen. 73 Probandinnen haben ihre Teilnahme im Nacht- und im Tagblock abgeschlossen. Zwei Probandinnen der Nachtschichtgruppe nahmen jeweils nur an einem Untersuchungsblock



teil. Weitere 25 ausschließlich am Tage tätige Probandinnen wurden im Tagblock untersucht.

### 3.3 Studieninstrumente

Nach erfolgreicher Rekrutierung (ärztlicher Aufklärung, Prüfung der Einschlusskriterien, Einverständnis) wurden die Probandinnen dem betriebsärztlichen Dienst für eine Laborkontrolle mittels Vielfachanalyse (u.a. Blutbild, HbA1c, Vitamin D) zugeleitet. Im Rahmen eines „Erstinterviews“ wurden soziodemographische Daten, Lebensstil und Gesundheitsstatus jeder Probandin erhoben. Durch den Einsatz des Münchener Chronotyp-Fragebogens für Schichtarbeiter (MCTQ<sub>Shift</sub>) wurden die Schlafgewohnheiten abgefragt und der Chronotyp als Schlafmittelpunkt eingeschätzt.

Einer Anregung des FBK folgend wurde ein zusätzliches mobiles Screening auf nächtliche Atemstörungen (Hypopnoe, Apnoe) durchgeführt, da ein entsprechender Befund die Schlafqualitäts-Messungen beeinflussen kann. Die Untersuchung zu schlafbezogenen Atmungserkrankungen wurde in Zusammenarbeit mit dem Schlaflabor des Klinikums Bergmannsheil mittels EASY-SCREEN durchgeführt. Probanden der Studie wurden durch das IPA pseudonymisiert am Schlaflabor angemeldet. Die Probandinnen konnten daraufhin unabhängig vom IPA mittels ihres Studien-Ausweises einen Termin mit dem Schlaflabor vereinbaren. Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden den Probandinnen vom Studienarzt auf Wunsch mitgeteilt.

Kernstück der Studie war die Untersuchung einer Vielzahl von Parametern während mehrerer Tagschichten bzw. mehrerer Nachtschichten hintereinander. Für die Verabredung dieser sog. Untersuchungsblöcke waren unter anderem der Menstruationszyklus der Probandinnen und der Dienstplan zu beachten.

Die Untersuchungen in den Nacht- oder Tagschichtphasen umfassten die folgenden Module und Instrumente:

- Die Probandinnen wurden angewiesen, jeweils eine Speichelprobe an 6 - 8 festgelegten Zeitpunkten täglich abzugeben (nach dem Aufwachen, 30 Minuten nach dem Aufwachen, zu Beginn der Schicht, bei Nachtschichten zusätzlich ca. 2 Stunden nach Schichtbeginn, in der Mitte der Schicht, bei Nachtschichten zusätzlich ca. 6 Stunden nach Schichtbeginn, am Ende der Schicht, vor dem Zubettgehen).
- Die Probandinnen waren weiterhin angewiesen, von jedem Spontanurin während der Untersuchungsblöcke jeweils eine Urinprobe zu asservieren
- Zur Erfassung von Aktivitäten und Nahrungsaufnahme sowie Stressphasen im Tagesverlauf wurden die Probandinnen gebeten, ein Schlaf- und Lifestyle-Tagebuch zu führen.
- Die individuelle Lichtexposition der Probandinnen wurde mittels eines mobilen Messgeräts (LightWatcher™, Luzius Wolf GmbH, Österreich), welches als Brosche getragen wurde, erfasst. Der LightWatcher zeichnet dabei die Bestrahlungsstärke in fünf Spektralbereichen, darunter Blaulicht im Frequenzbereich um 460 nm, alle 10 Sekunden auf. Die Probandinnen wurden angewiesen, das Messgerät während der Wachphase als Brosche an der Schulter zu tragen und während der Schlafzeit auf dem Nachttisch zu platzieren. Zeitabschnitte, an denen das Messgerät nicht oder verdeckt getragen worden war (z.B. Sport, Schwimmen), wurden in Logbüchern vermerkt.

- Die mobile Erhebung und Bewertung der Schlafqualität erfolgte mittels der SOMNOwatch™ plus mit dem Modul von Rechtschaffen & Kales. Das Gerät ermöglicht neben der Aufzeichnung des Schlaf/Wach-Rhythmus eine vollständige Erfassung und Differenzierung der Schlafstadien. Das Rechtschaffen & Kales Modul wird an den externen Anschluss der SOMNOwatch™ plus angeschlossen und erweitert den Kanal auf sieben Elektroden, mit denen Hirnstromableitung (EEG), Augenbewegungen rechts und links (EOG) und Muskeltonus im submentalen Bereich (EMG) abgeleitet werden können. Die Probandinnen wurden angewiesen das Gerät während jeden Schlafes zu tragen. Eigenständige Anbringung der externen Sensorik des Geräts wurde bei Beginn eines Untersuchungsblocks anhand einer Anleitung vor einem Spiegel geschult. Zusätzlich erhielt jede Probandin eine schriftliche Anleitung zur Mitnahme. Am Ende jeder Arbeitsschicht innerhalb der Untersuchungsblöcke wurde die Konzentrationsfähigkeit mittels eines 3-Minuten-Kurztests unter Einsatz eines PVT-192 Psycho-Vigilanz-Testgerätes ermittelt. Die Testergebnisse wurden jeweils mit der Baseline-Performance zu Beginn eines Untersuchungsblocks verglichen.

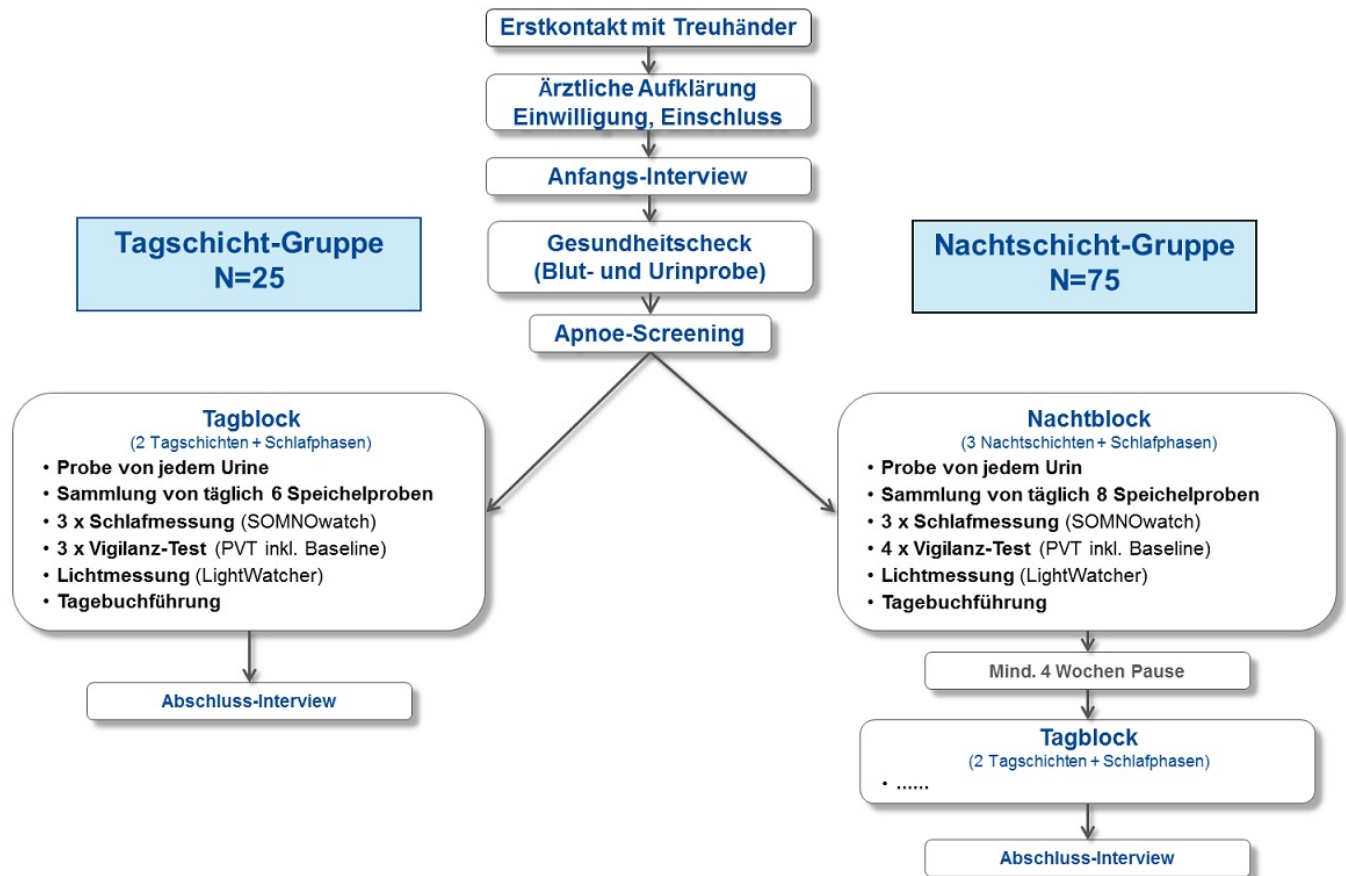
Der Untersuchungsablauf ist in der Abbildung 1 dargestellt. Eine Übersicht zu den gesammelten Daten und Proben findet sich in Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Übersicht über die gesammelten Proben und Daten

	Tagschichtgruppe (N=25)		Nachtschichtgruppe† (N=75)		Gesamt (N=100)
	Tagschicht	Tagschicht	Nachtschicht	Nachtschicht	
Untersuchungsblöcke	25	74	74	74	173
Tagebücher	25	74	74	74	173
Schlafmessungen	75	221	228	228	524
PVT-Testungen	75	222	289	289	586
Lichttage‡	75	219	278	278	572
Speichelproben	296	881	1576	1576	2753
Urinproben	539	1401	1700	1700	3640
Morgenerine	78	207	262	262	547

†73 Probandinnen wurden im Nachtschicht- und im Tagschicht-Block untersucht. Zwei Probandinnen der Nachtschichtgruppe nahmen jeweils nur an einem Untersuchungsblock teil.

‡Messung der Lichtexposition im Zeitraum von 21 Uhr bis 21 Uhr des Folgetages



**Abbildung 1:** Rekrutierung und Untersuchungsablauf in beiden Studiengruppen

### 3.4 Probenbearbeitung

Am Ende jeder Arbeitsschicht wurden die Speichelproben und Urinproben an die Study Nurse übergeben. Bis dahin wurden die Proben gekühlt aufbewahrt. Die Verarbeitung, Aliquotierung und Banking des Probenmaterials durch die Study Nurse erfolgte entsprechend der Vorgaben des Operationshandbuchs. Gefrorene Aliquots der Urinproben wurden zur Analyse des Metaboloms an das Helmholtz-Zentrum München geschickt.

### 3.5 Hormonbestimmungen

Eingefrorene Aliquots des Speichels wurden als Sammellieferung an das Labor der IBL GmbH (Hamburg) für die Bestimmung von Melatonin, Cortisol und Estradiol gesendet. Quantitative Bestimmungen von Melatonin und Estradiol wurden mittels Enzymimmunoassays (ELISA) durchgeführt. Quantitative in-vitro-Bestimmungen von freiem Cortisol in Saliva wurden mittels Luminoszenzimmunoassays durchgeführt.

### 3.6 Metabolombestimmungen

#### 3.6.1 Targeted Metabolombestimmung

Bei der Metabolitenmessung unter Verwendung des AbsoluteIDQ p150 Kits der Firma BIOCRATES handelt es sich um einen targeted Ansatz, bei dem ca 10 µL der jeweiligen

Probe verwendet werden. Unter Verwendung eines FIO-MSMS Massenspektrometers werden Signalintensitäten Referenzmetabolit-Konzentrationen zugeordnet und mit Signalintensitäten von Metaboliten mit unbekannter Konzentration verglichen. So können die tatsächlichen Konzentrationen festgelegter Metabolite in der jeweiligen Urinprobe bestimmt werden. Der Biocrates p-150 Kit quantifiziert Metabolite des Aminosäure-, Lipid- und Energiestoffwechsels. Die Messungen wurden am GAC (Genome Analysis Center) am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Die Messung der Urinproben mit der Biocrates Technologie wurde im Januar 2016 abgeschlossen.

### 3.6.2 Non-targeted Metabolombestimmung

Bei der Metabolon-Messung handelt es sich um einen sogenannten „Non-targeted“ Ansatz. Im Gegensatz zur Biocrates-Technologie werden hier nicht vorher durch einen Analysekit festgelegte Metabolite quantifiziert, sondern die relative Konzentration (basierend auf eingehenden Signalintensitäten des Detektors) aller in der jeweiligen Probe messbaren Metabolite bestimmt. In den untersuchten Urinproben konnten Abbauprodukte des Aminosäure-, Kohlenhydrat-, Vitamin-, Energie-, Fett-, Nukleotid-, Peptid- und Xenobiotika-Stoffwechselweges nachgewiesen werden. Das jeweilige Probenvolumen beträgt hier ca 100-200 µL. Um das verbliebene Budget optimal auszunutzen, wurde für eine Subgruppe (n=4 Krankenschwestern) der Teilnehmerinnen eine Messung mit der Metabolon-Technologie (non-targeted) durchgeführt (siehe auch 2.2 „Bewilligter Aufstockungsantrag“). Insgesamt wurden 68 Urinproben von 2 Krankenschwestern mit einem frühen (2:25 / 2:37) und 2 mit einem späten (4:45/5:00) Chronotyp ausgewählt, welche ein ähnliches Alter (49, 53 Jahre) haben. Ein weiteres Kriterium war ein sichtbarer Tagesrhythmus für Metabolitkonzentrationen in den Biocrates (targeted)-Daten sowie die Verfügbarkeit für Urinproben für mindestens einen Tag aus der Tagschicht und der Nachtschicht. Die Messung der Urinproben mit der Metabolon Technologie wurde im Mai 2016 abgeschlossen.

## 4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

### 4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt wurden 75 Probandinnen, die in Wechselschicht arbeiten, und 25 Probandinnen mit reinen Tagschichten aus der weiblichen Belegschaft des BG Klinikums Bergmannsheil in Bochum untersucht. Dabei wurden neben Gesundheits- und Krankenschwestern (91%) auch andere Berufsgruppen (Sterilisations-Assistentin, Stationssekretärin, Study Nurse, Arzthelferin, Diabetesberaterin) in die Studienpopulation aufgenommen. Der Altersdurchschnitt der Tagschichtgruppe war mit 47 Jahren höher als in der Nachtschichtgruppe (35 Jahre; Tab. 2). In der Tagschichtgruppe wies die Tätigkeitsbiographie von 18 Probandinnen Episoden mit Nachtarbeit auf, die bei 13 Probandinnen 9 Jahre oder länger dauerte. Die Zuordnung der Probandinnen zu einem bestimmten Chronotyp erfolgte aus den geschätzten Schlafmittelpunkten (Münchener Chronotyp-Fragebogen für Schichtarbeiter, MCTQ<sub>shift</sub>) aller Studienteilnehmer. Dies erfolgte durch die Einteilung in die unteren 25% (Frühtyp: <3:11 h), mittleren 50% (Intermediärtyp: 3:11-4:47 h) und oberen 25% (Spättyp: >4:47 h) der Teilnehmer basierend auf der Verteilung der geordneten Schlafmittelpunkte. Im Erstinterview gaben 24 der 100 Probandinnen eine Erkrankung der Schilddrüse an. Vier Probandinnen nahmen Jod ein. Bei zehn Probandinnen wurde Schilddrüsenhormon substituiert. Vier Probandinnen gaben einen

aktuell therapierten Diabetes mellitus an. Bei diesen Probandinnen zeigten sich erhöhte HbA1c-Werte (>6%) sowie bei einer weiteren Probandin, bei der bisher keine Glukosestoffwechselstörung bekannt war. Elf Probandinnen gaben an, jemals unter depressiven Zuständen gelitten zu haben, davon nahmen 3 Probandinnen aktuell Medikamente ein. Bei allen Probandinnen wurde erfolgreich ein Schlafapnoe-Screening durchgeführt. Vierzehn Probandinnen fielen mit einem Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) von mindestens 15 auf.

**Tabelle 2:** Beschreibung der Studienpopulation

	Tagschichtgruppe (n=25)	Nachtschichtgruppe† (n=75)	Gesamt (n=100)
<b>Berufsgruppen</b>			
Krankenschwester	9 (36%)	68 (91%)	77
MTA	10 (40%)	6 (8%)	16
Andere	6 (24%)	1 (1%)	7
<b>Aktuelle Schichten</b>			
Tagschicht			
6 – 14 Uhr	8 (32%)	70 (93%)	78
7 – 15 Uhr	7 (28%)	4 (5%)	11
8 – 16 Uhr	10 (40%)	0 (0%)	10
Nachtschicht			
21 – 6 Uhr	0 (0%)	74 (99%)	74
<b>Alter</b>			
Median (Minimum- Maximum)	47 (25-60)	35 (25-57)	42 (25-60)
<b>Altersgruppen</b>			
25-34	4 (16%)	37 (49,3%)	41 (41%)
35-49	12 (48%)	28 (37,3%)	40 (40%)
≥50	9 (36%)	10 (13,3%)	19 (19%)
<b>Chronotyp (MCTQ<sub>shift</sub>) [hh:mm]</b>			
Median (Minimum-	3:26 (23:13-4:51)	4:11 (1:09-8:00)	3:55 (23:13-

Maximum) 8:00)

**Chronotyp Gruppen, n (%)**

Frühtyp (< 3:11 h)	10 (40%)	15 (20%)	25 (25%)
Intermediärtyp (3:11 - 4:47 h)	11 (44%)	37 (49%)	48 (50%)
Spättyp (> 4:47 h)	1 (4%)	23 (31%)	24 (25%)

**Rauchstatus**

Nieraucher	12 (48%)	38 (51%)	50
Exraucher	9 (36%)	11 (15%)	20
Raucher	4 (16%)	26 (34%)	30

**Body-Mass-Index**

Untergewicht (<18,5)	0 (0%)	1 (1%)	1
Normal (18,5-24,9)	13 (52%)	41 (55%)	54
Übergewicht (≥25)	5 (20%)	19 (25%)	24
Fettleibig (≥30)	7 (28%)	14 (19%)	21

**Jahre in Schichtarbeit**

Median (Minimum-Maximum)	12 (0 – 38)	14 (3 – 39)	13 (0 – 39)
Nie in Nachtschicht tätig	7 (28%)	0 (0%)	7

---

†73 Probandinnen der Nachtschichtgruppe wurden im Nachtschicht- und im Tagschicht-Block untersucht. Zwei Probandinnen der Nachtschichtgruppe nahmen jeweils nur an einem Untersuchungsblock teil

## 4.2 Hormone im Speichel

### 4.2.1 Untersuchung der Assoziationen zwischen Blaulicht, Melatonin und Estradiol

In Studien zum Zusammenhang zwischen Schichtarbeit und der Entstehung von Krankheiten wurden verschiedene Hypothesen zu möglichen biologischen Mechanismen aufgestellt. Die sogenannte Light-at-Night Hypothese wurde bereits in den 1970er und 80er Jahren im Zusammenhang mit der Erforschung der Entstehung von Brustkrebs aufgestellt. Die Hypothese besagt, dass Licht in der Nacht die nächtliche Ausschüttung von Melatonin hemmt, was zu einer Steigerung der Sekretion weiblicher Geschlechtshormone führt und somit auch hormonelle Wirkungen beinhaltet, die zur Krebsentstehung v.a. bei hormonsensiblen Geweben beitragen könnten. Aufgrund der vielfältigen zellulären Wirkungen von Melatonin ist die Light-at-Night Hypothese eine der Kernhypothesen im Kontext der gesundheitlichen Auswirkungen von Schichtarbeit. Im Rahmen dieser Schichtarbeitsstudie wurde der Zusammenhang zwischen Blaulicht-Expositionen während Tag- und Nachtschichten, Melatonin und 17 $\beta$ -Estradiol untersucht.

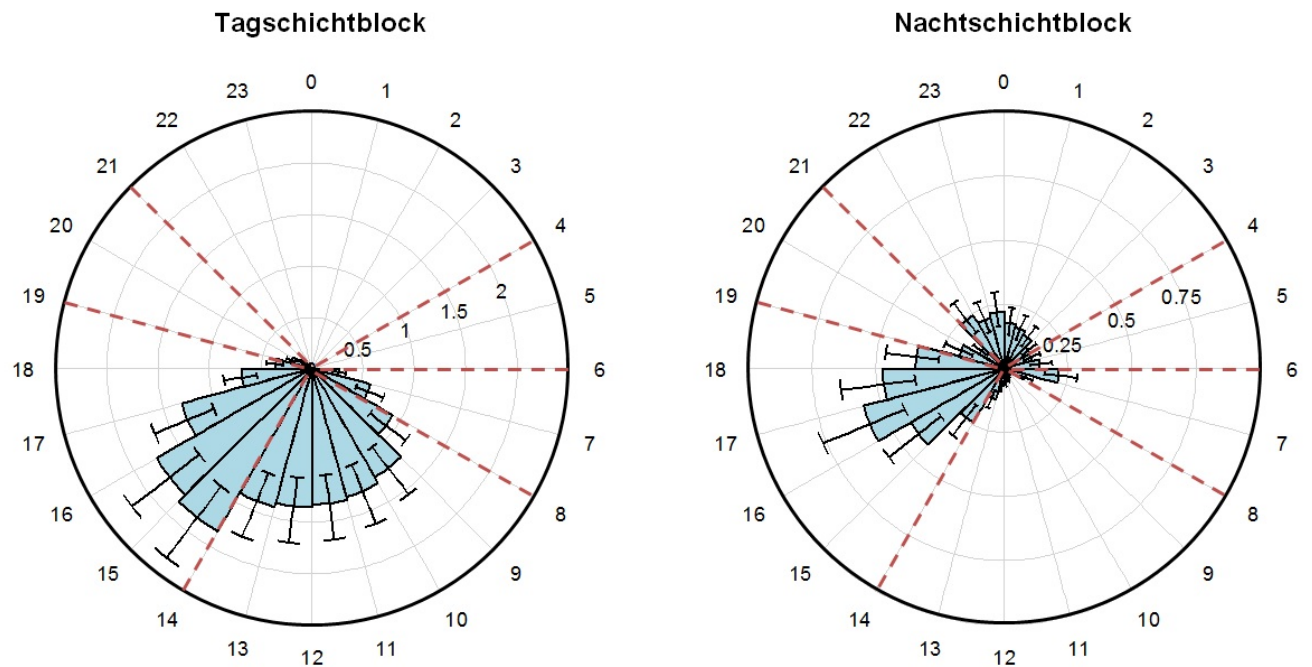
#### *Analyse der individuellen Blaulicht-Expositionen*

Um möglichst viele vergleichbare und komplette 24-Stunden-Profile aus Tag- und Nachtblöcken zu erhalten, wurden die Zeiträume von 21 Uhr bis 21 Uhr des Folgetages betrachtet und als „Lichttag“ bezeichnet. Insgesamt liegen somit über 511 komplette Lichttage vor. Die Analyse der 24-Stunden-Profile der Blaulicht-Exposition erfolgte anhand von linearen gemischten Modellen für die mittleren logarithmierten Blaulicht-Expositionen je Stunde und Untersuchungsblock adjustiert nach Jahreszeit und LightWatcher-Gerät. Abbildung 2 zeigt die geometrischen Mittelwerte der stündlichen Blaulichtexpositionen als Circular-Plots dargestellt. Der ungefähre Tagesablauf mit Schlaf- und Wachepisoden ist deutlich zu erkennen. In den ersten Stunden einer Nachtschicht, zwischen 21 und 4 Uhr, und den letzten Stunden einer Tagschicht, zwischen 8 und 14 Uhr, bleibt die Blaulichtstrahlung recht konstant. Relativ hohe Blaulichtstrahlung wurde erst nach dem Tagschlaf nach der Nachtschicht ab 15 Uhr registriert. Während der Tagschicht-Blöcke zeigten sich tagsüber wesentlich höhere Blaulicht-Expositionen.

Meist wurden in Feldstudien zur Lichtexposition nächtliche Zeitbereiche z.B. von 0 bis 5 Uhr untersucht. Jedoch könnten auch weitere Zeitbereiche relevant sein (z.B. könnte ein langer Spaziergang in der Mittagssonne zu einer verringerten Sensibilität gegenüber Licht in der Nacht führen). Für die Beschreibung der Lichtexposition ist es daher zielführend, geeignete Zeitfenster mit homogenen Lichtexpositionen zu wählen. Es wurden die kleinsten p-Werte der paarweisen Vergleiche jeweils zwei aufeinanderfolgender Stunden genutzt, um die Zeitpunkte mit den größten Sprüngen in den Bestrahlungsstärken aufzufinden. Mittels dieses semiquantitativen Ansatzes wurden insgesamt sechs Zeitfenster für die weitere Analyse ausgewählt: Nacht 21-4 Uhr, früher Morgen 4-6 Uhr, Morgen 6-8 Uhr, Vormittag 8-14 Uhr, Nachmittag 14-19 Uhr, Abend 19-21 Uhr.

In weiteren Analysen wurden individuelle Einflussfaktoren auf die Bestrahlungsstärke in den verschiedenen Zeitfenstern betrachtet. Dabei wurden Faktoren wie z.B. Alter, Chronotyp, Jahreszeit, Aufenthalt im Freien, Kinder im Haushalt, pflegebedürftige Erwachsene im Haushalt und Ausbildung auf die Blaulichtexposition in jedem Zeitfenster untersucht. Hier wurde stark erhöhte Blaulichtexposition am Tag im Frühjahr und im Sommer und,

unabhängig von der Jahreszeit, in der Nacht und am frühen Morgen bei den Nachtschichten beobachtet. Weiterhin wird eine erhöhte Blaulichtexposition bei folgenden Gruppen festgestellt: Altersgruppe 35-50 Jahre, später Chronotyp, und Probandinnen mit Kinderbetreuung am Nachmittag.

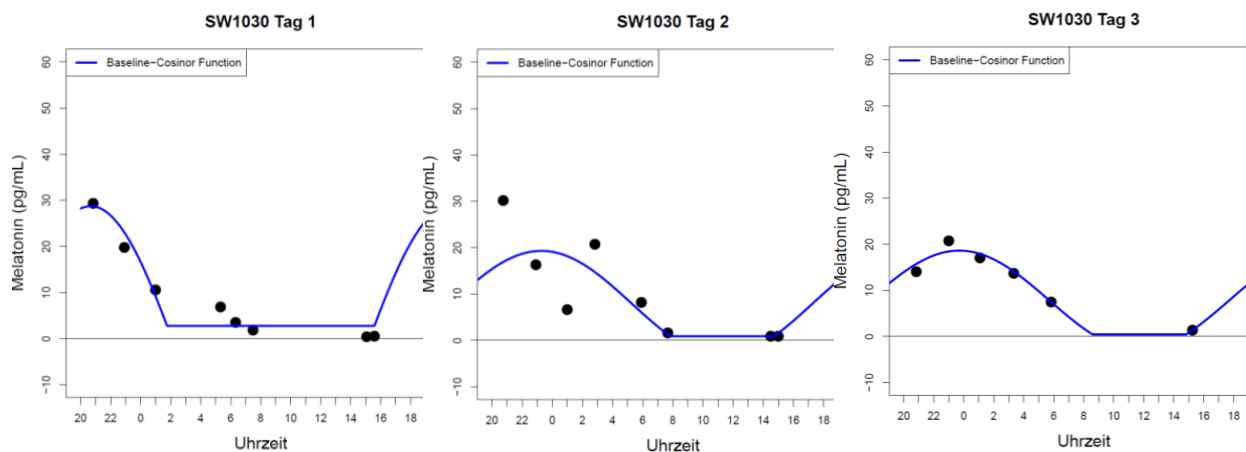


**Abbildung 2:** Circular-Plots der stündlichen Blaulichtexpositionen ( $\text{mW}/\text{m}^2$ ) im Tagschicht- und Nachtschichtblock. Dargestellt sind geschätzte geometrische Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen je Stunde. Zeitfenster sind markiert ( - - - ).

### Analyse der Melatoninverläufe

Für die Analyse des Melatonins im Speichel liegen pro Lichttag (21 Uhr bis 21 Uhr des Folgetages) 6 - 8 Messungen vor. Individuelle Schätzungen der Melatoninverläufe wurden mittels der Baseline-Cosinor-Funktion (BCF) durchgeführt. Die Grundidee der BCF besteht darin, tagsüber einen konstanten Baselinewert und in der Nacht eine Ausschüttungsphase (Peak-Phase) sowie die maximale Ausschüttung (Peak) zu schätzen. Die Peak-Phase ist der Zeitraum in welchem die Kurve von dem Baselinewert des Tages abweicht. Für jede Probandin und jeden „Lichttag“ wurde eine der Tagesgang der Melatoninfreisetzung geschätzt. Anhand der Parameter der Kurven konnte so ein maximaler Melatoninwert als Peak der Melatonin-Ausschüttung geschätzt werden. Abbildung 3 veranschaulicht die Methode am Beispiel einer Probandin im dreitägigen Nachtschichtblock. Dargestellt werden die gemessenen Melatonin-Konzentrationen während der Untersuchung und die angepasste Melatoninkurve mittels der Baseline-Cosinor-Schätzung.





**Abbildung 3:** Veranschaulichung der gemessenen Melatoninkonzentrationen und geschätzten Melatoninkurven (Baseline-Cosinor-Funktion) bei einer Probandin (SW1030) im Nachtschichtblock.

Die Kurvenschätzungen wurden anhand der Anpassung an die Beobachtungen sowie der Plausibilität bewertet. Aus der weiteren Analyse wurden Probandinnen mit einem geschätzten Peak von weniger als 3 pg/ml („low-secreter“) ausgeschlossen. Als weiteres Gütekriterium wurde die zeitliche Differenz zwischen dem Chronotyp (Schlafmittelpunkt,  $MCTQ_{shift}$ ) und dem Zeitpunkt des Melatoninpeaks betrachtet. Falls diese mehr als 3 Stunden auseinanderlagen, wurde der Peak ausgeschlossen.

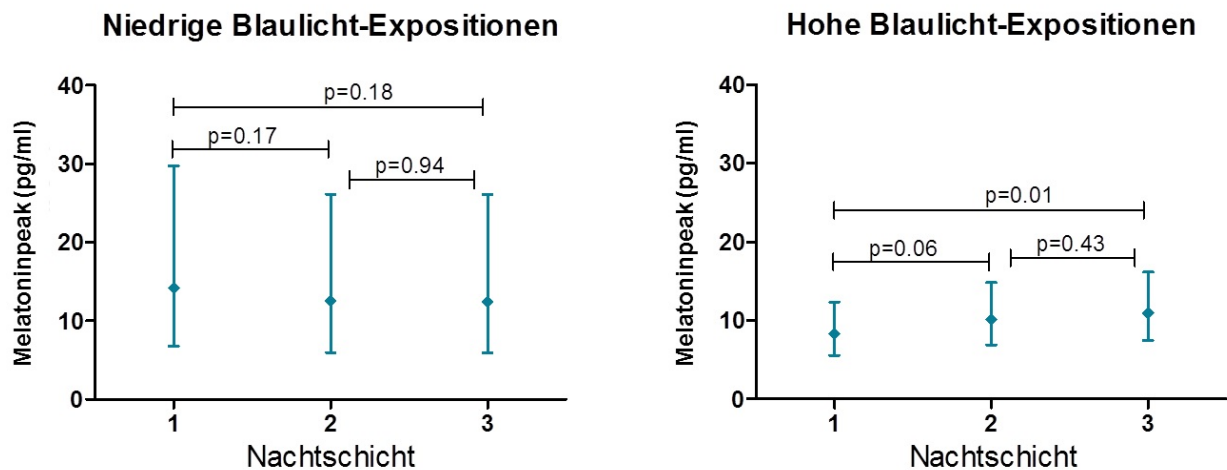
Deskriptive Analysen in den Altersgruppen 25 – 34 Jahre, 35 – 49 Jahre, 50 Jahre und älter zeigten, dass im Verlauf der Nachtschichten die Melatoninpeaks bei den älteren Probandinnen (50 Jahre und älter,  $n=10$ ) abnahmen (Median des Melatoninpeaks: 1. Tag=11,7 pg/ml, 2.Tag=6,4 pg/ml, 3. Tag=7,3 pg/ml). Melatoninpeaks der jungen Probandinnen (25 - 34 Jahre,  $n=37$ ) lagen insgesamt höher und stiegen im Verlauf der Nachtschichten (Median des Melatoninpeaks: 1. Tag=15,6 pg/ml, 2.Tag=17,7 pg/ml, 3. Tag=18,0 pg/ml).

### **Assoziationen zwischen Blaulichtexposition und Melatoninpeaks**

Für die Analyse möglicher Assoziationen zwischen beobachteten Blaulicht-Expositionen und Melatoninpeaks wurde zunächst untersucht, ob die mittlere Blaulichtexposition im Zeitfenster der Nacht (21-4 Uhr) die Höhe des Peaks in derselben Nacht beeinflusst. Des Weiteren wurde der Einfluss von Blaulicht in den anderen Zeitfenstern des Tages auf den Melatoninpeak der folgenden Nacht untersucht. Hierfür wurden die Auswirkungen der gemittelten Blaulichtexpositionen in den Zeitfenstern des 1. bzw. 2. Lichttages (ohne Nacht) auf den Peak in 2. bzw. 3. Nacht betrachtet. Zusätzlich findet in diesen Berechnungen eine Adjustierung nach Jahreszeit und Melatonin-hemmenden Medikamenten statt. In diesen Analysen wurden nur Probandinnen im Nachtschichtblock betrachtet. Hier zeigte sich ein marginaler Einfluss der Blaulichtexposition auf Höhe des Melatoninpeaks in der ersten Nacht (Zeitfenster 21-4 Uhr). Effekte der tageszeitlichen Blaulichtexposition auf den Melatoninpeak wurden am zweiten Tag im Zeitfenster 8-14 Uhr (Vormittag) beobachtet.

In weiterer Analyse wurde die Blaulichtexposition während der Nacht (21-4 Uhr) in niedrig und hoch stratifiziert und die Wirkung der Blaulichtexposition auf Melatoninpeaks in diesen Strata untersucht. Abbildung 4 zeigt die geschätzten geometrischen Mittelwerte der

Melatoninpeaks je Nachtschicht in diesen Strata. Hier wurde eine marginale Assoziation der hohen Blaulichtexpositionen in der Nacht bei Nachtschichten mit verringerten Melatoninpeaks beobachtet.



**Abbildung 4:** Geschätzte geometrische Mittelwerte der Melatoninpeaks (pg/ml) stratifiziert nach Blaulichtexposition (niedrig/hoch) bei Nachtschichten.

#### Assoziationen zwischen Schichtarbeit und 17 $\beta$ -Estradiol

Das Tagesprofil des Estradiols ist weitgehend unklar, da verschiedene Studien sehr unterschiedliche Profile zeigen. Deswegen wurde in einem ersten Analyseansatz die Gesamtmenge des 17 $\beta$ -Estradiols während einer Arbeitsschicht als Flächeninhalt (area under the curve, AUC) vom Beginn bis Ende einer 8-Stunden Arbeitsschicht geschätzt. Als relevante Einflussfaktoren auf die Estradiol-8h-AUCs wurden neben den schichtspezifischen Faktoren auch Jahreszeit, Alter, Zyklusphase und hormonelle Einflussfaktoren untersucht. In dieser ersten Analyse zeigten sich für die Estradiol-8h-AUC signifikant niedrigere Konzentrationen bei Nachtschicht im Vergleich zu Tagschicht. Weitere verfeinerte Modellierungsansätze des 17 $\beta$ -Estradiols sind geplant.

#### 4.2.2 Cortisol-Aufwachreaktion

Die Sekretion von Cortisol unterliegt einem circadianen Rhythmus. Der Höchstwert an Cortisol wird innerhalb von 30 bis 45 Minuten nach dem morgendlichen Aufwachen erreicht. Dieser Anstieg wird als Cortisol-Aufwachreaktion (CAR) bezeichnet. Im Verlauf des Tages nimmt die Cortisol-Ausschüttung ab und erreicht nachts ihren Tiefstwert. Nachtarbeit geht mit einer Verschiebung der Schlafphase in den Tag und einer möglichen Störung der circadianen Rhythmen einher. Eine Anpassung der circadianen Rhythmen an die verschobenen Schlaf-Wach-Zeiten findet kaum oder gar nicht statt. Diese Feldstudie beschreibt die CAR im Tagschichtblock bei Probandinnen ohne Nachtschicht (Tagschichtgruppe) und im Tag- und Nachtschichtblock bei Probandinnen mit Nachtschicht (Nachtschichtgruppe).

Die CAR wurde sowohl an zwei aufeinanderfolgenden Tagen der Tagschicht als auch der Nachtschicht aus den ersten beiden Speichelproben nach dem Aufwachen erfasst. Während des Tagschichtblocks handelte es sich um Speichelproben nach dem frühmorgendlichen Aufwachen. Während der Nachtschichtblöcke handelte es sich jeweils um Speichelproben nach dem Tagschlaf. Die CAR wurde als Differenz des Cortisols aus der zweiten Speichelprobe 30 Minuten nach dem Aufwachen und der ersten Speichelprobe direkt nach dem Aufwachen berechnet. Die Uhrzeit jeder Speichelabgabe wurde durch Probandinnen im Logbuch dokumentiert. Schlafmessungen wurden objektiv mittels der SOMNOWatch™ plus aufgezeichnet. Von 524 durchgeführten Schlafmessungen wurde die Ableitungsqualität bei 333 als ausreichend gut eingestuft. Die Uhrzeiten der Speichelproben wurden mit den aus der SOMNOWatch™ abgeleiteten Aufwachzeiten abgeglichen. In die Analyse der CAR wurden Probandinnen eingeschlossen, bei denen die Abgabe der ersten Speichelprobe spätestens 10 Minuten nach dem Aufwachen erfolgt war und eine gute Schlafaufzeichnung vorlag. Darüber hinaus wurden Probandinnen mit Depression (n=2), Einnahme von Cortison-Sprays beim Asthma (n=4), und einer Erkältung während der Untersuchung im Schichtblock (n=2) von der Analyse der CAR ausgeschlossen. Insgesamt wurden in diesen Analysen etwa 60% der Probandinnen in beiden Studiengruppen berücksichtigt (vgl. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Beschreibung der Cortisol-Aufwachreaktion und Schlafparameter nach Schichttyp und Schichttag

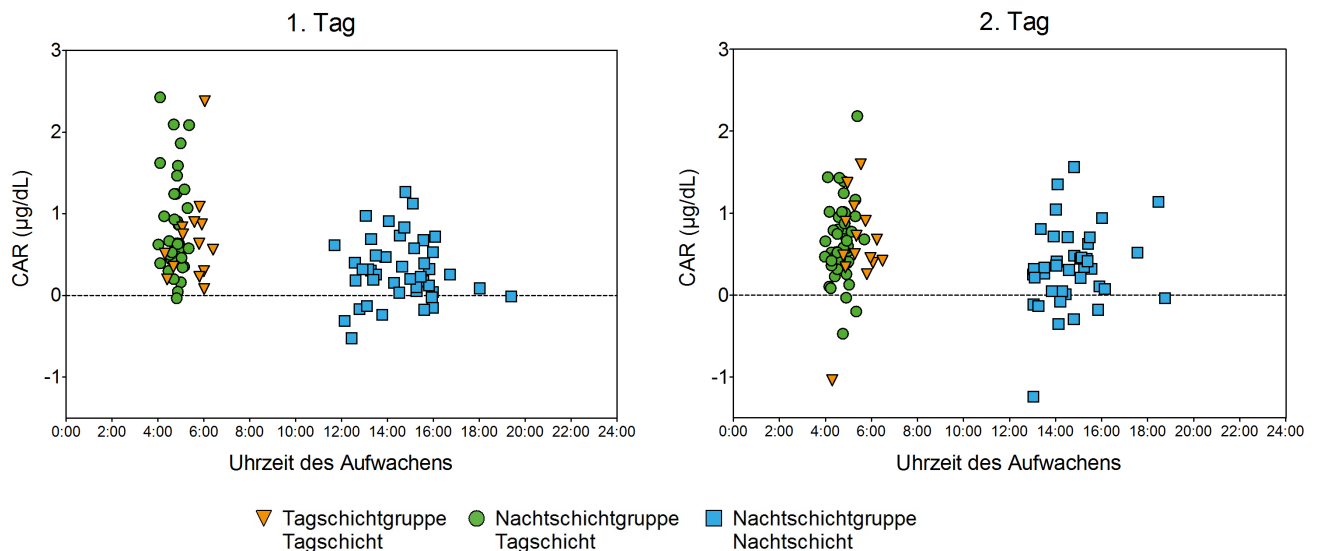
	Tagschichtgruppe		Nachtschichtgruppe	
	Tagschicht	Tagschicht	Tagschicht	Nachtschicht
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
<b>Anzahl der Probandinnen† (n, %)</b>				
1. Tag	15 (62.5%)	40 (58.8%)	47 (69.1%)	
2. Tag	15 (62.5%)	50 (73.5%)	41 (60.3%)	
<b>Cortisol-Aufwachreaktion‡ (µg/dL)</b>				
1. Tag	0.60 (0.08, 2.38)	0.63 (-0.03, 2.43)	0.26 (-0.53, 1.27)	
2. Tag	0.50 (-1.04, 1.60)	0.57 (-0.47, 2.18)	0.33 (-1.24, 1.56)	
<b>Schlafcharakteristika (SomnoWatch™)</b>				
<b>Zeit des Zubettgehens (hh:mm)</b>				
1. Tag	22:33 (20:22, 23:58)	22:12 (20:10, 23:46)	7:53 (7:12, 13:36)	
2. Tag	22:20 (20:56, 00:55)	22:06 (19:31, 00:13)	7:48 (7:00, 12:05)	
<b>Schlafdauer (hh:mm)</b>				
1. Tag	6:06 (3:33, 7:41)	5:51 (2:33, 7:36)	5:12 (3:04, 7:55)	
2. Tag	6:16 (4:11, 8:02)	5:52 (3:04, 6:58)	6:02 (4:08, 8:14)	
<b>Aufwachzeit (hh:mm)</b>				
1. Tag	5:47 (4:17, 6:23)	4:49 (4:01, 5:21)	14:38 (11:41, 19:23)	
2. Tag	5:20 (4:18, 6:28)	4:44 (3:58, 5:41)	14:34 (13:01, 18:44)	

†Probandinnen mit ersten Speichelprobe spätestens 10 Minuten nach dem Aufwachen und einer ausreichend guter Ableitungsqualität der Elektroden

‡CAR berechnet als Differenz des Cortisols aus der zweiten Speichelprobe 30 Minuten nach dem Aufwachen und der ersten Speichelprobe direkt nach dem Aufwachen

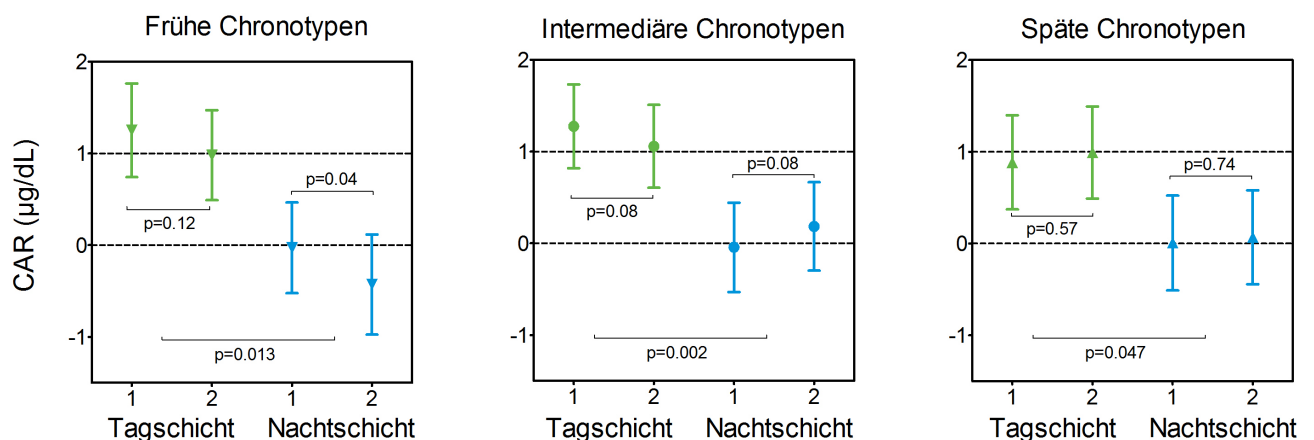
Der Zusammenhang zwischen der CAR und der Aufwachzeit wird mittels Scatterplots nach Schichttyp (Tag- und Nachtschicht) und Schichttag (1. Tag, 2. Tag) grafisch veranschaulicht (Abbildung 5). Die Verschiebung der Aufwachzeiten variiert mit Schichtbeginn. In der Nachtschichtgruppe ist die Streuung der Aufwachzeiten nach dem Tagschlaf nach der Nachtschicht (11:41-19:23 Uhr) deutlich größer als die Streuung der Aufwachzeiten nach dem Nachtschlaf im Tagschichtblock (03:58-05:41 Uhr). Der Schichtbeginn der

Tagschichtgruppe liegt zwischen 6 und 8 Uhr. Dementsprechend variieren die Aufwachzeiten zwischen 4:17-6:23 Uhr. Für die Probandinnen der Nachtschichtgruppe werden im Mittel niedrigere CAR nach dem Tagschlaf nach der Nachtschicht (Median für CAR: 1. Tag=0,26  $\mu\text{g/dL}$ , 2. Tag=0,33  $\mu\text{g/dL}$ ) im Vergleich zu CARs nach dem morgendlichen Aufwachen (Median für CAR: 1. Tag=0,63  $\mu\text{g/dL}$ , 2. Tag=0,57  $\mu\text{g/dL}$ ) beobachtet. Negative CARs werden deutlich häufiger nach dem Tagschlaf an beiden Schichttagen als nach dem Nachtschlaf beobachtet.



**Abbildung 5:** Scatterplot der CAR und der Aufwachzeit je nach Schichttyp (Tag- und Nachtschicht) und Schichttag (1. Tag, 2. Tag)

Besonders von Interesse ist hier die Variation der CAR mit der Aufwachzeit in Abhängigkeit vom Chronotyp (Schlafmittelpunkt,  $MCTQ_{\text{shift}}$ ). Dabei sollen neben der Aufwachzeit die Schlafdauer und weitere potenzielle Einflussfaktoren mitberücksichtigt werden. Anhand von gemischten linearen Modellen wurde der Effekt des Schichttyps und des Schichttages auf die Höhe der CAR untersucht. Die Modellierung der CAR erfolgte mit Adjustierung nach Aufwachzeit, Schlafdauer, Chronotyp, Jahreszeit und Rauchstatus.



**Abbildung 6:** Geschätzte Mittelwerte für CAR in der Nachtschichtgruppe in Abhängigkeit vom Chronotyp adjustiert nach Aufwachzeit, Schlafdauer, Jahreszeit und Rauchstatus.

In Abbildung 6 werden geschätzte adjustierte Mittelwerte für die CAR je nach Schichttyp und Schichttag dargestellt. Eine signifikant geringere CAR wird für alle Schichtarbeiterinnen in der Nachtschicht im Vergleich zur Tagschicht beobachtet. Eine geringere CAR wird im Zusammenhang mit Nachtschicht sowohl für frühen, intermediären als auch für späten Chronotyp beobachtet. Bei frühem Chronotyp zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Nachtschichten hinsichtlich der CAR.

## 4.3 Metabolite in Urinproben und Hormone in Speichelproben

### 4.3.1 Lagerbedingungen von Urinproben

Bisher war keine Forschung bezüglich des Einflusses von Lagerbedingungen (Zeit, Temperatur) auf Urin unter der Verwendung der targeted Technologie verfügbar. Um potentielle Veränderungen des Metabolitenprofils, welche sich durch Lagertemperatur und Lagerzeit verändern könnten, näher darzustellen und deren Einflüsse für das Hauptprojekt FP321 ausschließen zu können, wurden verschiedene Lagerbedingungen (Zeit, Temperatur) für gepoolte Urinproben von Freiwilligen simuliert. Das Studiendesign sah eine Kombination von verschiedenen Lagerzeiträumen (0, 2, 8, 24 Stunden) und Temperaturen (-80°C, -20°C, 4°C, ~9°C, ~20°C) sowie bis zu drei Einfrier-Auftau-Zyklen vor. Es wurde ein paarweiser Vergleich der Proben, welche direkt nach der Spende bei -80°C eingefroren wurden („Baseline Werte“), mit solchen durchgeführt, welche bei -20°C, 4°C, ~9°C, ~20°C für 2, 8, 24 Stunden gelagert wurden. Zusätzlich wurden die „Baseline-Werte“ mit den Einfrier- und Auftauzyklen eins bis drei verglichen. Eine Assoziationsanalyse sollte zeigen, ob Temperatur, Zeit oder die Anzahl an Einfrier-Auftau-Zyklen einen signifikanten Einfluss auf das Metabolitenprofil haben. Nach strenger Qualitätskontrolle basierend auf der Nachweisgrenze („Limit of Detection“ / LOD), dem Variationskoeffizienten („Coefficient of variance“ / CV) sowie dem Ausschluss von Ausreißer-Messwerten, wurden 63 Metaboliten für die weitere Analyse in Betracht gezogen.

Für den paarweisen Vergleich der Konzentrationen der „Baseline-Werte“ mit solchen bei verschiedenen Lagertemperaturen und Lagerzeiten waren keine signifikanten Veränderungen des Metabolitenprofils für die untersuchten Zeiträume bei -20°C sowie 4°C zu erkennen. Erst nach 24 Stunden bei 9°C konnten signifikante Veränderungen bezüglich der Konzentration für vier Metaboliten (Arginin, Valin, Leucin/Isoleucin sowie Acylcarnitin C6:1) und nach 24 Stunden bei 20°C für sechs Metaboliten (Arginin, Methionin, Serin, Valin, Leucin/Isoleucin sowie H1) gemessen werden (siehe Tabelle 4).

#### **Tabelle 4: Signifikant unterschiedliche Metaboliten für den paarweisen Vergleich von „Baseline-Werten“ mit 24 Stunden bei ~20°C und 9°C**

Die erste Spalte zeigt Metaboliten mit signifikanten Konzentrationsunterschieden aufgrund von Lagerbedingungen, bei einem Vergleich mit den „Baseline-Werte“. Die nachfolgenden Spalten zeigen die prozentuale Konzentrationsänderung, den *P* Wert und den Variationskoeffizient (CV) basierend auf vierfach Messungen der jeweiligen Temperaturen/Zeiten (2 h, 8 h, and 24 h at ~20°C and ~9°C). Signifikante *P* Werte sind fett gedruckt.

Metabolit	Baseline-Wert (0 Stunden)	2 Stunden			8 Stunden			24 Stunden		
	Mittelwert [µM]	Veränderung [%]	P-Wert	CV [%]	Veränderung [%]	P-Wert	CV [%]	Veränderung [%]	P-Wert	CV [%]
~20°C										
Arg	17.40	1.0	0.82	5.8	-28.3	0.03	17.9	-40.9	<b>3.1E-4</b>	10.8
Met	12.65	-7.1	0.26	5.1	-15.3	0.16	18.0	-43.7	<b>1.3E-4</b>	3.5
Ser	248.63	-3.7	0.44	4.8	-17.4	0.05	12.3	-36.2	<b>4.0E-5</b>	6.6
Val	30.86	-4.9	0.43	5.8	-21.7	0.09	20.3	-59.0	<b>1.0E-5</b>	3.5
xLeu	50.39	-6.1	0.25	3.0	-22.1	0.07	19.4	-39.6	<b>8.8E-5</b>	3.6
H1	622.83	3.7	0.19	2.2	-3.0	0.67	15.0	-30.3	<b>9.5E-6</b>	4.3
~9°C										
C6:1	0.16	1.9	0.77	9.2	2.2	0.76	10.3	16.2	<b>8.1E-5</b>	2.6
Arg	17.40	-0.9	0.91	11.0	6.6	0.29	6.3	-40.2	<b>7.2E-5</b>	7.0
Val	30.86	-4.9	0.41	4.4	-2.8	0.69	8.8	-42.5	<b>4.8E-5</b>	8.1
xLeu	50.39	-2.9	0.64	7.1	0.2	0.96	8.7	-35.3	<b>1.1E-4</b>	4.9

<sup>a</sup> Sofort eingefroren bei -80°C; <sup>b</sup> Signifikant für P- Wert < 7.9 E-4 (Bonferroni korrigiert); <sup>c</sup> CV = Coefficient of variance; = (standard deviation / mean value)

Für den paarweisen Vergleich der „Baseline-Werte“ mit Einfrier-Auftau-Zyklen konnten ab drei Zyklen signifikante Veränderungen des Metabolitenprofils für 2 Metabolite (C3 und H1) festgestellt werden (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Signifikant unterschiedliche Metaboliten für den paarweisen Vergleich von „Baseline-Werten“ Einfrier-Auftau-Zyklen**

Die erste Spalte zeigt Metaboliten mit signifikanten Konzentrationsunterschieden aufgrund von Frier und Tau Zyklen, bei einem Vergleich mit den „Baseline-Werten“. Die nachfolgenden Spalten zeigen die prozentuale Konzentrationsänderung, den P Wert und den Variationskoeffizient (CV) basierend auf vierfach Messungen. Signifikante P Werte ( $P < 2.64E-4$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	Baseline-Wert (0 Stunden)	Zyklus 1 (26 h)			Zyklus 2 (52 h)			Zyklus 3 (78 h)		
	Mittelwert [µM]	Veränderung [%]	P- Wert	CV [%]	Veränderung [%]	P- Wert	CV [%]	Veränderung [%]	P- Wert	CV [%]
C3	1.00	1.3	0.55	2.3	7.7	0.13	7.1	13.8	<b>7.7E-4</b>	1.3
H1	622.84	4.7	0.24	5.6	12.2	0.07	8.3	20.2	<b>3.1E-4</b>	3.4

Die durchgeführte Assoziationsanalyse konnte zeigen, dass für 10 Metabolite (Arginin, Glutamin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Valin, Leucin/Isoleucin und H1) die Interaktion von Zeit und Temperatur einen signifikanten Einfluss auf deren Konzentration hat, nicht jedoch Zeit oder Temperatur für sich allein genommen (siehe Tabelle 6).

### **Tabelle 6: Durch die Interaktion von Lagerungszeit und Temperatur signifikant veränderte Metaboliten**

Die erste Spalte zeigt Metaboliten für die eine signifikanter der Interaktion zwischen Temperatur und Zeit zu beobachten war. Die nachfolgenden Spalten geben die  $\beta$ -Schätzwerte mit Konfidenzintervallen (95%) und *P*-Werten des jeweiligen linearen gemischten Modells wieder. Signifikante *P*-Werte ( $P < 2.64E-4$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	$\beta$ -Schätzwert (95 % CI)	<i>P</i> -Wert
Arg	-0.89 (-1.26, -0.52)	<b>2.2E-5</b>
Gln	-0.68 (-0.97, -0.40)	<b>2.5E-5</b>
Met	-1.00 (-1.31, -0.70)	<b>1.2E-7</b>
Phe	-0.71 (-1.03, -0.39)	<b>7.8E-5</b>
Pro	-0.83 (-1.20, -0.46)	<b>5.8E-5</b>
Ser	-1.01 (-1.26, -0.75)	<b>9.8E-10</b>
Thr	-0.69 (-1.01, -0.38)	<b>7.7E-5</b>
Val	-1.01 (-1.44, -0.58)	<b>2.8E-5</b>
xLeu	-0.95 (-1.28, -0,61)	<b>1.2E-6</b>
H1	-1.14 (-1.51, -0.76)	<b>4.5E-7</b>

Für fünf Metabolite (C16:1-OH, C3, C4, C8:1, H1) konnte ein signifikanter Einfluss der Anzahl an Frier- und Tau-Zyklen festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

### **Tabelle 7: Signifikant mit der Anzahl an Frier- und Tau-Zyklen assoziierte Metaboliten**

Die erste Spalte zeigt Metabolite für die eine signifikante Assoziation mit der Anzahl an Frier und Tau-Zyklen zu sehen war. Die nachfolgenden Spalten geben die  $\beta$ -Schätzwerte mit Konfidenzintervallen (95%) und *P*-Werten des jeweiligen linearen gemischten Modells wieder. Signifikante *P*-Werte ( $P < 2.64E-4$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	$\beta$ -Schätzwert (95 % CI)	<i>P</i> -Wert
C3	0.53 (0.41, 1.03)	<b>2.5E-4</b>
C4	0.62 (0.36, 0.88)	<b>1.8E-4</b>
C8:1	0.70 (0.39, 1.01)	<b>2.9E-4</b>
C16:1-OH	0.72 (0.41, 1.03)	<b>2.5E-4</b>
H1	0.45 (0.27, 0.64)	<b>1.5E-4</b>

## **4.3.2 Targeted Metaboliten-Profil**

### **4.3.2.1 Integration von Hormon- und Metabolitdaten**

Zunächst wurden diejenigen Messwerte der Hormon- und Metabolitdaten, deren Urin sowie Speichelproben innerhalb derselben Stunde abgegeben wurden, zusammengefügt. Des Weiteren wurden dieselben Kriterien (siehe 4.2.1 / LOD, CV, Ausreißer) hinsichtlich der Qualitätskontrolle der Metabolitmessungen angewendet. Unter zusätzlicher Berücksichtigung multipler Biocrates-Messzeiträume wurden 44 Metabolite für die weitere



Auswertung herangezogen. Die Teilnehmer wurden in eine Vergleichsgruppe (Krankenschwestern nur in Tagschichten) sowie eine Tagschichtgruppe (Tagschicht der Krankenschwestern in Schichtsystem) und Nachtschichtgruppe (Nachtschicht der Krankenschwestern im Schichtsystem) eingeteilt. Die statistische Auswertung der Integration des Einflusses von Hormonen auf die Metabolitkonzentration unter Schichtarbeit erfolgte zunächst unter Verwendung einer Korrelationsanalyse nach Spearman. Hier wurden die Kontrollgruppe sowie die Tagschicht- und Nachtschichtgruppe separat betrachtet und Diabetiker sowie Vegetarier von der Analyse ausgeschlossen.

### **Analyse aller gemessenen Urinproben**

Innerhalb der Tagschichtgruppe waren keine Metabolite mit Melatonin, fünf Metabolite (C9, H1, Met, Phe, Thr) mit Cortisol und vier (C2, C4:1, C5-M-DC, C5:1-DC) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle A1, Anhang). Für die Tagschicht der Nachtschichtgruppe waren 10 Metabolite (C9, C12, C14:1, C14:1-OH, C14:2, C16, C16-OH, C7-DC, Phe, PC ae C38:6) mit Melatonin, acht Metabolite (C0, C2, C3, Gln, His, Ser, Thr, H1) mit Cortisol und acht Metabolite (C10:1, C10:2, C4:1, C5-M-DC, C5:1-DC, C6:1, C8:1, Gly) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle A1, Anhang). Innerhalb der Nachtschicht der Nachtschichtgruppe waren 13 Metabolite (C0, C10:2, C2, C3, C5:1, C9, Gln, Gly, Ser, Trp, His, Phe, H1) mit Melatonin und 5 Metabolite (C14:2, C9, Arg, Pro, H1) mit Cortisol sowie 16 Metabolite (C10:1, C5, C5:1, C8:1, Gln, Gly, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, xLeu, SM C24:0) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle A1, Anhang).

Des Weiteren wurde eine Assoziationsanalyse mit Hilfe linearer gemischter Regressionsmodelle durchgeführt mit dem Ziel, den Einfluss der Hormonkonzentration, unter Berücksichtigung des jeweiligen Schichttyps, auf das Metabolitprofil darzustellen. Hier konnte beobachtet werden, dass 8 Metabolite mit Melatonin, 15 Metabolite signifikant mit Cortisol sowie ein Metabolit mit 17- $\beta$ -Estradiol assoziiert ist (siehe Tabelle A2, Anhang).

### **Analyse der Morgenurine**

Die Nahrungsaufnahme spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Metabolitkonzentrationen in Körpergeweben. Die Art, Menge und Häufigkeit haben Einfluss auf das persönliche Metabolitenprofil der jeweiligen Teilnehmerin. Um dieser Tatsache Sorge zu tragen und sicherzustellen, dass nur schichtbedingte Einflüsse untersucht werden, wurden in einem konservativen Auswerteansatz nur Urinproben verwendet, welche als erste Probe nach dem Aufstehen („Morgenurin“) gespendet worden sind. Diese Herangehensweise stellt eine Annäherung an die übliche Vorgehensweise, nur Nüchternproben zu verwenden, dar.

Innerhalb der Tagschichtgruppe waren 2 Metabolite (C0 und C3) mit Melatonin und ein Metabolit (C2) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle 7). Für die Tagschicht der Nachtschichtgruppe waren 6 Metabolite (C16:2, C16-OH, C5:1, Phe, Trp, PC ae C38:3) mit Melatonin und 2 Metabolite (C10:1, C5MDC) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle 7). Innerhalb der Nachtschicht der Nachtschichtgruppe waren keine Metabolite mit Melatonin und 3 Metabolite (Gly, Val, C5MDC) mit 17- $\beta$ -Estradiol korreliert (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Signifikant mit Melatonin und 17- $\beta$ -Estradiol korrelierte Metaboliten**

Die erste Spalte zeigt Metabolite (basierend auf den Messwerten der Morgenurine) für die eine signifikante Korrelation nach Spearman mit den Hormonen Melatonin und 17- $\beta$ -Estradiol zu sehen war. Die nachfolgenden Spalten geben die Korrelationskoeffizienten  $r$  und deren  $P$ -Werte wieder. Signifikante  $P$ -Werte ( $P < 1.2E-3$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	Tagschichtgruppe		Nachtschichtgruppe			
	Tagschicht		Tagschicht		Nachtschicht	
	$r$	$P$ -Wert	$R$	$P$ -Wert	$r$	$P$ -Wert
Melatonin						
C0	-0.41	<b>5.0E-4</b>	-0.14	5.5E-2	-0.20	1.3E-2
C16-2	-0.06	6.5E-1	-0.24	<b>1.1E-3</b>	0.19	1.6E-2
C16-OH	0.08	5.3E-1	-0.34	<b>4.9E-6</b>	0.23	3.4E-3
C3	-0.41	<b>5.3E-4</b>	-0.18	1.9E-2	-0.23	3.5E-3
C5:1	-0.15	2.1E-1	-0.27	<b>2.5E-4</b>	-0.20	1.3E-2
Phe	0.08	5.2E-1	-0.31	<b>2.2E-5</b>	-0.03	7.0E-1
Trp	-0.02	8.7E-1	-0.25	<b>8.3E-4</b>	-0.02	7.9E-1
PC ae C38:3	-0.02	8.8E-1	-0.26	<b>4.6E-4</b>	0.10	2.3E-1
17- $\beta$ -Estradiol						
C10:1	0.26	3.04E-2	-0.29	<b>8.51E-5</b>	-0.19	1.73E-2
C2	0.42	<b>3.67E-4</b>	0.07	3.94E-1	0.07	3.68E-1
C5-M-DC	0.35	3.46E-3	-0.25	<b>8.68E-4</b>	-0.29	<b>2.12E-4</b>
Gly	0.15	2.15E-1	0.24	1.30E-3	0.28	<b>3.75E-4</b>
Val	0.17	1.63E-1	0.04	5.63E-1	0.29	<b>2.00E-4</b>

Des Weiteren wurde eine Assoziationsanalyse mit Hilfe linearer gemischter Regressionsmodelle durchgeführt mit dem Ziel den Einfluss der Hormonkonzentration, unter Berücksichtigung des jeweiligen Schichttyps, auf das Metabolitprofil darzustellen. Hier wurde beobachtet, dass H1 signifikant mit Cortisol assoziiert ist (siehe Tabelle 9).

### Tabelle 9: Signifikant mit Cortisol assoziierte Metaboliten

Die erste Spalte zeigt Metabolite (basierend auf den Messwerten der Morgenurine), die signifikant mit dem Hormon Cortisol assoziiert sind. Die nachfolgenden Spalten geben den Schätzwert, die Standardfehler (SE), den *P*-Wert sowie die False Discovery Rate (FDR) wieder. Signifikante *P*-Werte ( $P < 1.1E-3$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	$\beta$ -Schätzwert (95)	SE	<i>P</i> -Wert	FDR
H1	-0.12	0.03	<b>2.41E-04</b>	<b>1.1E-02</b>

#### 4.3.2.2 Der Einfluss von Schichtarbeit auf Metabolite unter Berücksichtigung des Chronotypen

Es wurden dieselben Kriterien (siehe 4.2.1 / 4.2.2 / LOD, CV, Ausreißer) hinsichtlich der Qualitätskontrolle der Metabolitmessungen angewendet. Unter zusätzlicher Berücksichtigung multipler Biocrates-Messzeiträume wurden 44 Metabolite für die weitere Auswertung herangezogen.

Die statistische Auswertung des Einflusses von Schichtarbeit auf die Metabolitkonzentration erfolgte unter Verwendung von linearen gemischten Modellen. Von der Analyse wurden zunächst Diabetiker ( $n=5$ ), Vegetarier ( $n=2$ ) sowie Personen mit extremer Schlafapnoe ( $n=1$ ) ausgeschlossen, was eine Teilnehmerzahl von 68 in der Nachtschichtgruppe sowie 21 in der Tagschichtgruppe ergibt. Zunächst wurden in einem Basis Rechenmodell (Basis Model) für technische Parameter sowie den jeweiligen Chronotyp adjustiert. Als mögliche Einflussfaktoren wurden im voll adjustierten Model (Volles Model), der jeweilige Messzeitpunkt der Proben sowie das Alter, der Raucherstatus, der BMI, der Chronotyp, der jeweilige Tag der Schicht, Jahre an Schichtarbeit, das mögliche Auftreten von Schilddrüsenerkrankungen der Teilnehmer und Zeit seit der letzten Uringabe berücksichtigt. Eine Übersicht der Populationscharakteristika ist in Tabelle 2 zu finden.

Für die weiterführende Auswertung der Daten wurden zunächst die Metabolitenprofile der Tagblöcke innerhalb der Nachtschichtgruppe mit denen der Nachtschichtblöcke verglichen. Es folgte ein Vergleich der Metabolitenprofile der Tagblöcke mit den Nachtblöcken innerhalb der Nachtschichtgruppe (kombinierte Analyse). Des weiteren wurden die Teilnehmer in frühe, intermediäre und späte Chronotypen stratifiziert. Dies erfolgte durch die Einteilung in die unteren, mittleren und oberen 33,3% der Teilnehmer basierend auf den Schlafmittelpunkten (siehe Tabelle 10). Wiederum erfolgte ein Vergleich der Metabolitenprofile der Tagschichtblöcke mit den Nachtschichtblöcken innerhalb der Nachtschichtgruppe verglichen (stratifizierte Analyse).

#### Tabelle 10: Anzahl der Teilnehmer in den Strata für frühe, intermediäre sowie späte Chronotypen in verschiedenen Schichttypen

Die erste Spalte zeigt die Einteilung der Strata wieder. Frühe Chronotypen entsprechen den unteren 33,3% der nach Schlafmittelpunkt sortierten Teilnehmer. Der intermediäre Chronotyp entspricht den mittleren 33,3% der Teilnehmer sortiert nach Schlafmittelpunkt. Der späte Chronotyp entspricht den oberen 33,3% der Teilnehmer, sortiert nach

Schlafmittelpunkt. In den Spalten Tagschichtgruppe sowie Nachtschichtgruppe ist die Anzahl der Teilnehmer für diese Gruppe im jeweiligen Stratum dargestellt.

Strata	Tagschichtgruppe	Nachtschichtgruppe
Frühe Chronotypen	12	20
Intermediäre Chronotypen	8	24
Späte Chronotypen	2	31

Multiples Testen wurde durch die Anwendung eines Bonferroni-korrigierten p-wert Cut-offs sowie die Berechnung der False Discovery Rate (FDR / nach Benjamini Hochberg) berücksichtigt.

### Berücksichtigung der Morgenurine

Wie oben bereits beschrieben, werden für die nachfolgende Analyse nur Morgenurine verwendet. Bei einem Vergleich der Tagschichtgruppe mit der Tagschicht der Nachtschichtgruppe war kein signifikanter Unterschied bezüglich des Metabolitenprofils für die verschiedenen Chronotypen zu sehen.

Bei dem Vergleich der Tagschicht (Referenz) mit der Nachtschicht hinsichtlich des Metabolitenprofils (kombinierte Analyse) konnte festgestellt werden, dass 15 Metabolite (C5, C7-DC, C8, C10, C10:2, C12, C14, C14:1, C14:1-OH, C14:2, C14:2-OH, Glycin, Phenylalanin, Serin, SM C24:0) signifikante Unterschiede zwischen der Tagschicht und der Nachtschicht zeigten.

Bei dem Vergleich der Tagschicht (Referenz) mit der Nachtschicht hinsichtlich des Metabolitenprofils (stratifizierte Analyse) konnte festgestellt werden, dass für frühe Chronotypen 11 Metabolite (C5, C7-DC, C8, C10, C12, C14, C14:1, C14:1-OH, C14:2, C14:2-OH, SM C24:0) signifikante Unterschiede zwischen der Tagschicht und der Nachtschicht zeigten. Für intermediäre Chronotypen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Metabolitenprofils beobachtet werden. Vier Metabolite (C10:2, C12, Phe und SM C24:0) zeigten signifikante Unterschiede zwischen Tagschicht und Nachtschicht für späte Chronotypen.

Eine Übersicht über signifikante Unterschiede (Ergebnisse volles Model) hinsichtlich des Metabolitenprofils während der Nachtschicht für die kombinierte und stratifizierte Analyse, ist in Tabelle 11 zu finden.

**Tabelle 11: Ergebnisse der signifikant durch Schichtarbeit veränderten Metabolite in der kombinierten und stratifizierten Analyse**

Gegeben sind für  $\beta$ - Schätzer sowie das 95% Konfidenz Intervall (KI) und die „false discovery rate“ (FDR) aus dem vollen Model für den Vergleich von Tagschichtblock (Referenz) mit dem Nachschichtblock. Signifikante *P*-Werte (FDR < 0.05) aus sind in fett markiert. N = Anzahl der Teilnehmerinnen; n = Anzahl der verwendeten Urinproben.

Kombinierte Analyse			Stratifizierte Analyse					
N = 68; n=424			Früher Chronotyp N = 16; n=91		Mittlerer Chronotyp N = 22; n = 141		Später Chronotyp N = 30; n = 192	
Metabolite	$\beta$ -Schätzer (95% KI)	FDR p-Wert	$\beta$ -Schätzer (95% KI)	FDR p-Wert	$\beta$ -Schätzer (95% KI)	FDR p-Wert	$\beta$ -Schätzer (95% KI)	FDR p-Wert
C5	0.09 (0.03, 0.15)	<b>1.8E-2</b>	0.24 (0.10, 0.38)	<b>6.3E-03</b>	-0.02 (-0.12, 0.09)	8.7E-01	0.10 (0.01, 0.19)	1.2E-01
C7-DC	0.23 (0.12, 0.35)	<b>7.1E-4</b>	0.53 (0.25, 0.81)	<b>4.3E-03</b>	0.14 (-0.08, 0.35)	4.7E-01	0.15 (-0.01, 0.31)	2.3E-01
C8	0.15 (0.05, 0.26)	<b>1.7E-2</b>	0.51 (0.23, 0.79)	<b>4.3E-03</b>	0.00 (-0.21, 0.20)	9.9E-01	0.16 (0.02, 0.29)	1.2E-01
C10	0.18 (0.07, 0.28)	<b>4.7E-3</b>	0.57 (0.26, 0.88)	<b>4.3E-03</b>	0.05 (-0.15, 0.25)	8.3E-01	0.14 (0.01, 0.27)	1.2E-01
C10:2	-0.34 (-0.50, -0.18)	<b>5.1E-4</b>	-0.22 (-0.69, 0.24)	4.6E-01	-0.22 (-0.47, 0.03)	3.8E-01	-0.39 (-0.64, -0.14)	<b>2.3E-02</b>
C12	0.30 (0.18, 0.42)	<b>1.4E-5</b>	0.68 (0.37, 0.99)	<b>2.0E-03</b>	0.19 (-0.06, 0.44)	4.1E-01	0.23 (0.09, 0.37)	<b>2.3E-02</b>
C14	0.16 (0.04, 0.27)	<b>2.1E-2</b>	0.53 (0.19, 0.86)	<b>8.7E-03</b>	0.09 (-0.13, 0.32)	6.6E-01	0.04 (-0.10, 0.19)	7.8E-01
C14:1	0.18 (0.07, 0.28)	<b>4.7E-3</b>	0.52 (0.23, 0.82)	<b>4.6E-03</b>	0.14 (-0.06, 0.35)	4.5E-01	0.04 (-0.09, 0.17)	7.8E-01
C14:1-OH	0.21 (0.09, 0.33)	<b>4.7E-3</b>	0.58 (0.23, 0.93)	<b>6.6E-03</b>	0.20 (-0.04, 0.43)	4.1E-01	0.05 (-0.10, 0.20)	7.8E-01
C14:2	0.18 (0.07, 0.29)	<b>6.6E-3</b>	0.50 (0.17, 0.82)	<b>1.1E-02</b>	0.13 (-0.07, 0.34)	4.7E-01	0.08 (-0.06, 0.22)	5.2E-01
C14:2-OH	0.16 (0.05, 0.28)	<b>1.8E-2</b>	0.56 (0.22, 0.91)	<b>7.6E-03</b>	0.09 (-0.13, 0.30)	6.6E-01	0.04 (-0.10, 0.18)	8.1E-01
Gly	0.16 (0.05, 0.28)	<b>1.8E-2</b>	-0.09 (-0.35, 0.17)	6.5E-01	0.27 (0.07, 0.46)	1.0E-01	0.21 (0.04, 0.39)	1.2E-01
Phe	0.33 (0.20, 0.45)	<b>1.4E-5</b>	0.40 (0.03, 0.78)	8.4E-02	0.37 (0.14, 0.60)	6.9E-02	0.32 (0.15, 0.50)	<b>8.0E-03</b>
Ser	0.15 (0.03, 0.27)	<b>3.8E-2</b>	-0.06 (-0.35, 0.23)	7.7E-01	0.22 (0.02, 0.43)	2.9E-01	0.17 (-0.02, 0.36)	2.5E-01
SM C24:0	0.23 (0.14, 0.32)	<b>1.4E-5</b>	0.48 (0.20, 0.76)	<b>5.3E-03</b>	0.14 (-0.04, 0.32)	4.1E-01	0.21 (0.11, 0.31)	<b>4.1E-03</b>

### 4.3.3 Non-targeted Metaboliten-Profil

#### Der Einfluss von Schichtarbeit auf Metaboliten

Um das verbliebene Budget optimal auszunutzen, wurde für eine Subgruppe (n=4 Krankenschwestern) der Teilnehmerinnen eine Messung mit der Metabolon-Technologie (non-targeted) durchgeführt (siehe auch 2.2 „Bewilligter Aufstockungsantrag“). Insgesamt wurden 68 Urinproben von 2 Krankenschwestern mit einem frühen (2:25 / 2:37) und 2 mit einem späten (4:45/5:00) Chronotyp ausgewählt, welche ein ähnliches Alter (49, 53) haben. Ein weiteres Kriterium war ein sichtbarer Tagesrhythmus für Metabolitkonzentrationen in den Biocrates (targeted)-Daten sowie die Verfügbarkeit für Urinproben für mindestens einen Tag aus der Tagschicht und der Nachtschicht.

Im Zuge der Qualitätskontrolle der Metabolitmessungen, basierend auf der Anzahl der fehlenden Werte pro gemessenen Metabolit sowie der fehlenden Werte pro Probe, wurden 624 Metabolite für die weitere Auswertung herangezogen. Für 305 der hier quantifizierten Metabolite konnte bisher eine chemische Struktur zugeordnet werden („known“), für 319 Metabolite war dies nicht möglich („unknown“).

Die statistische Auswertung des Einflusses Tagschicht im Vergleich zur Nachtschicht auf die Metabolitkonzentration erfolgte unter Verwendung von linearen gemischten Modellen unter Berücksichtigung von möglichen Einflussfaktoren wie BMI, Raucherstatus, das Auftreten von Schilddrüsenerkrankungen sowie dem jeweiligen Chronotyp. Fünf der bekannten Metabolite (2-isopropylmalat, Ascorbat (Vitamin C), Stachydrin, Theobromin, Trigonellin (N'-methylnicotinat)) zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Tagschicht und der Nachtschicht (siehe Tabelle 12).

#### **Tabelle 12: Signifikant mit Schichtarbeit assoziierte Metaboliten (Metabolon-Messung)**

Die erste Spalte zeigt Metabolite, die signifikant mit Schichtarbeit assoziiert sind. Die nachfolgenden Spalten geben den Schätzwert, die Standardfehler (SE), den *P*-Wert sowie die False Discovery Rate (FDR) wieder. Signifikante *P*-Werte für Bonferroni ( $P < 8.0E-5$ ) und FDR ( $P < 5.0E-2$ ) bzw. False Discovery Rate (FDR / nach Benjamini Hochberg) sind fett gedruckt.

Metabolit	$\beta$ -Schätzwert	SE	<i>P</i> -Wert	FDR
2-isopropylmalat	-0.62	0.14	2.29E-5	5.11E-4
Ascorbat (Vitamin C)	-1.03	0.20	2.66E-6	7.91E-5
Stachydrin	-0.83	0.15	4.92E-7	2.19E-5
Theobromin	0.98	0.15	2.87E-8	1.79E-6
Trigonellin (N'-methylnicotinat)	-0.76	0.16	1.09E-5	2.83E-4

#### **4.4 Projektveröffentlichungen**

M. Rotter, S. Brandmaier, C. Prehn, J. Adam, S. Rabstein, K. Gawrych, T. Brüning, T. Illig, H. Lickert, J. Adamski, R. Wang-Sattler. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics*. m13.1 (2017): 4.

Johannes Hertel, Markus Rotter; Stefan Frenzel; Helena U Zacharias; Jan Krumsiek; Brigit Rathkolb; Martin Hrabe de Angelis; Sylvia Rabstein; Dirk Pallapies; Thomas Brüning; Hans J Grabe; Rui Wang-Sattler. Dilution correction for dynamically influenced urinary analyte data. *Analytica Chimica Acta* (under review)

Markus Rotter, Martina Troll, Katarzyna Burek, Stefan Brandmaier, Marcela Covic, Erik Bader, Jonathan Adam, Johannes Hertel, Cornelia Prehn, Birgit Rathkolb, Martin Hrabe de Angelis, Hans Jürgen Grabe, Hannelore Daniel, Celine Vetter, Thomas Kantermann, Volker Harth, Dirk Pallapies, Thomas Behrens, Thomas Brüning, Jerzy Adamski, Heiko Lickert, Sylvia Rabstein, Rui Wang-Sattler. Night shift work influences the metabolite profile of female nurses depending on their chronotype. (in preparation)

## **5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen**

### **5.1 Licht und Melatonin**

Bonmatti-Carrion, M.A., Arguelles-Prieto, R., Martinez-Madrid, M.J., Reiter, R., Hardeland, R., Rol, M.A., Mardid, J.A. (2014). Protecting the Melatonin Rhythm through Circadian Healthy Light Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 23449–23500.

Borugian, M.J., Gallagher, R.P., Friesen, M.C., Switzer, T.F., Aronson, K.J. (2005): Twenty-Four-Hour Light Exposure and Melatonin Levels Among Shift Workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 47, 1268–1275.

Cho, Y., Ryu, S., Lee, B.R., Kim, K.H., Lee, E., Choi, J. (2015): Effects of artificial light at night on human health: A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiology International* 32: 1294–1310.

Grundy, A., Tranmer, J., Richardson, H., Graham, C.H., Aronson, K.J. (2011): The Influence of Light at Night Exposure on Melatonin Levels among Canadian Rotating Shift Nurses. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev* 20, 2404–2412.

LeGates, T.A., Fernandez, C.D., Hatter, S. (2014): Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 443–454.

Papantoniou, K., Pozo, O.J., Espinosa, A., Marcos, J., Vastaño-Vinyals, G., Basagña, X., Ribas, F.C., Mirabent, J., Martin, J., Careny, G., Martin, C.R., Middleton, B., Skene, D.J., Kogevinas, M. (2014). Circadian Variation of Melatonin, Light Exposure, and Diurnal Preference in Day and Night Shift Workers of Both Sexes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23, 1176–1186.

Smolensky, M.H., Sackett-Lundeen, L.L.S., Portaluppi, F. (2015). Nocturnal light pollution and underexposure to daytime sunlight: Complementary mechanisms of circadian disruption and related diseases. *Chronobiology International* 32, 1029–1048.

### **5.2 Cortisol-Aufwachreaktion**

Adam, E.K., Hawkey, L.C., Kudielka, B.M., Cacioppo, J.T. (2006). Day-to-day dynamics of experience-cortisol associations in a population-based sample of older adults. *Proc Natl Acad Sci* 103, 17058–17063.

Clow, A., Hucklebridge, F., Stalder, T., Evans, P., Thorn, L. (2010). The cortisol awakening response: More than a measure of HPA axis function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 97–103.

Dockray, S., Steptoe, A. (2011). Chronotype and diurnal cortisol profile in working women: Differences between work and leisure days. *Psychoneuroendocrinology* 36, 649–655.

Griefahn, B., Robens, S. (2008). The cortisol awakening response: A pilot study on the effects of shift work, morningness and sleep duration. *Psychoneuroendocrinology* 33, 981–988.

Kudielka, B.M., Federenko, I.S., Hellhammer, D.H., Wüst, S. (2006). Morningness and eveningness: The free cortisol rise after awakening in “early birds” and “night owls”. *Biological Psychology* 72, 141–146.

Kudielka, B.M., Bellingrath, S., Hellhammer, D.H. (2007). Further support for higher salivary cortisol levels in „morning“ compared to „evening“ persons. *Journal of Psychosomatic Research* 62, 595–596.

Stalder, T., Kirschbaum, C., Kudielka, B.M., Adam, E.K., Pruessner, J.C., Wust, S., Dockray, S., Smyth, N., Evans, P., Hellhammer, D.H., Miller, R., Wetherell, M.A., Lupien, S.J., et Clow, A. (2016). Assessment of the cortisol awakening response: Expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology Review* 63, 414–432.

### 5.3 Schichtarbeit und Metabolite

Ahn, K.S., and Aggarwal, B.B. (2005). Transcription Factor NF- $\kappa$ B: A Sensor for Smoke and Stress Signals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056, 218–233.

Bailey, S.M., Udo, U.S., and Young, M.E. (2014). Circadian regulation of metabolism. *Journal of Endocrinology* 222, R75–R96.

van den Berg, R., Mook-Kanamori, D.O., Donga, E., van Dijk, M., van Dijk, J.G., Lammers, G.-J., van Kralingen, K.W., Prehn, C., Adamski, J., and Romijn, J.A. (2016). A single night of sleep curtailment increases plasma acylcarnitines: Novel insights in the relationship between sleep and insulin resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 589, 145–151.

Bollinger, T., Leutz, A., Leliavski, A., Skrum, L., Kovac, J., Bonacina, L., Benedict, C., Lange, T., Westermann, J., and Oster, H. (2011). Circadian clocks in mouse and human CD4<sup>+</sup> T cells. *PLoS One* 6, e29801.

Bracci, M., Manzella, N., Copertaro, A., Staffolani, S., Strafella, E., Barbaresi, M., Copertaro, B., Rapisarda, V., Valentino, M., and Santarelli, L. (2014). Rotating-shift nurses after a day off: peripheral clock gene expression, urinary melatonin, and serum 17- $\beta$ -estradiol levels. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 295–304.

Davies, S.K., Ang, J.E., Revell, V.L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F.P., Cui, N., Middleton, B., Ackermann, K., and Kayser, M. (2014). Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 10761–10766.

Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 462–467.



Hailemariam, T.K., Huan, C., Liu, J., Li, Z., Roman, C., Kalbfleisch, M., Bui, H.H., Peake, D.A., Kuo, M.-S., and Cao, G. (2008). Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NFκB activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 1519–1526.

IARC (2008). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Shift-work, painting and fire-fighting (Lyon (in press): International Agency for Research on Cancer).

Klootwijk, E.D., Reichold, M., Helip-Wooley, A., Tolaymat, A., Broeker, C., Robinette, S.L., Reinders, J., Peindl, D., Renner, K., and Eberhart, K. (2014). Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome. *New England Journal of Medicine* 370, 129–138.

Kohsaka, A., Das, P., Hashimoto, I., Nakao, T., Deguchi, Y., Gouraud, S.S., Waki, H., Muragaki, Y., and Maeda, M. (2014). The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice. *PloS One* 9, e112811.

Manoogian, E.N., and Panda, S. (2016). Circadian clock, nutrient quality, and eating pattern tune diurnal rhythms in the mitochondrial proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 3127–3129.

Mirzoyan, K., Klavins, K., Koal, T., Gillet, M., Marsal, D., Denis, C., Klein, J., Bascands, J.-L., Schanstra, J.P., and Saulnier-Blache, J.-S. (2017). Increased urine acylcarnitines in diabetic ApoE<sup>-/-</sup>-mice: Hydroxytetradecadienoylcarnitine (C14: 2-OH) reflects diabetic nephropathy in a context of hyperlipidemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 487, 109–115.

Pochini, L., Oppedisano, F., and Indiveri, C. (2004). Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1661, 78–86.

Reuter, S.E., and Evans, A.M. (2012). Carnitine and acylcarnitines. *Clinical Pharmacokinetics* 51, 553–572.

Sahar, S., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature Reviews Cancer* 9, 886–896.

Ternes, P., Brouwers, J.F., van den Dikkenberg, J., and Holthuis, J.C. (2009). Sphingomyelin synthase SMS2 displays dual activity as ceramide phosphoethanolamine synthase. *Journal of Lipid Research* 50, 2270–2277.

Tripathi, P., and Aggarwal, A. (2006). NF-κB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-* 90, 519.

NFKB1 Gene - GeneCards | NFKB1 Protein | NFKB1 Antibody.

## 6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

### 6.1 Urinprobenstabilität

Die ausgewählten Metabolite zeigten keinen Einfluss der Lagerbedingungen bei 9°C (Cool packs).

Eine Beeinflussung der Ergebnisse aus der Untersuchung von Schichtarbeit/Chronotyp aufgrund von Lagerbedingungen ist zu vernachlässigen. Auch ein wiederholtes Auftauen von Proben bewirkt erst ab dem 3. Einfrier-Auftau-Zyklus Veränderungen im Metabolitenprofil. Urinproben sind während der Klinik-Routine idealerweise so kühl wie möglich zu lagern (wenn möglich 4°C oder weniger), wenn keine Möglichkeit der Filtration oder Zentrifugation der Proben möglich ist.

### 6.2 Schichtarbeit und Hormone

#### *Licht und Melatonin*

Die hier ermittelten Ergebnisse beschreiben erstmalig die 24-h Blaulichtexposition an Arbeitstagen mit Tag- und Nachtschicht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur die Schichtarbeit, sondern auch andere Faktoren die Blaulichtexposition beeinflussen und somit zusammen das Blaulicht-Tagesprofil gestalten.

Die ‚Light-at-night‘-Hypothese geht davon aus, dass die nächtliche Lichtexposition eine Störung in der Melatonin-Freisetzung beeinflussen könnte. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die Sensibilität gegenüber nächtlichen Lichteinflüssen durch Licht an anderen Tageszeiten beeinflusst wird. Unsere Ergebnisse zeigen eine marginale Assoziation zwischen der nächtlichen Blaulichtexposition und der Höhe des Melatoninpeaks in der ersten Nachtschicht.

Erste Analysen zum Vergleich von 17 $\beta$ -Estradiol während Tag- und Nachtschichten liefern keine Anhaltspunkte für eine Erhöhung der Estradiol-Werte bei Nachtschichten. Detailliertere Analysen auch zur Gesamtmenge von Hormonen im 24-Stunden-Verlauf sind in Planung.

#### *Cortisol-Aufwachreaktion*

Diese Ergebnisse zeigen für eine weibliche Studienpopulation von Beschäftigten in Schichtarbeit Veränderungen der Cortisol-Aufwachreaktion (CAR) im Zusammenhang mit Tag- und Nachtschicht und Chronotyp. In der Nachtschichtgruppe wurde eine signifikant geringere CAR nach Tagschlaf als nach Nachtschlaf beobachtet. Dieser Unterschied zeigte sich auch bei Stratifizierung nach Chronotyp. Bei den frühen Chronotypen war der Unterschied in der CAR zwischen Tag- und Nachtschlaf am größten. Dieses Ergebnis weist auf eine höhere Beanspruchung von Personen mit einem frühen Chronotyp durch Wechselschicht mit Nachtarbeit hin.

Das Potential der Daten erlaubt weitere Analysen des Cortisols und dessen Tageprofil, die zurzeit in Planung sind, z.B. im Zusammenhang mit Stress.

### 6.3 Schichtarbeit und Metabolite

Die Haupte Erkenntnis aus den durchgeführten Analysen ist, dass Schichtarbeit den Stoffwechsel der teilnehmenden Krankenschwestern beeinflusst. Hier ist vor allem die Klasse der Acylcarnitine (Fettstoffwechsel) zu nennen. Des Weiteren fällt auf, dass je nach Chronotyp die Auswirkungen von Schichtarbeit auf das Metaboliten-Profil unterschiedlich sind.

#### *Erhöhte Konzentrationen an Acylcarnitinen könnte durch eine veränderte Fettsäureoxidation bedingt sein*

Erhöhte Acylcarnitin Werte während der Nachtschicht könnten auf eine Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation hindeuten. Acylcarnitine werden mit Hilfe des Organic Cation / Carnitine Transporter 2 (OCTN2) in und aus der Zelle transportiert (Pochini et al., 2004). Frühere Studien haben erhöhte Konzentrationen an Acylcarnitinen im Blut von gesunden Individuen mit Schlafenzug gefunden (van den Berg et al., 2016; Davies et al., 2014). Durch die erhöhte Konzentration an Acylcarnitinen im Blut wird der OCTN2 Transporter gesättigt, was sich in der Niere in einer geringeren Resorption an Acylcarnitinen aus dem Urin (durch den OCTN2 vermittelt) Richtung Blut bemerkbar macht (Reuter and Evans, 2012). Diese Tatsache spiegelt sich in den erhöhten Konzentrationen an Acylcarnitinen wider, was vor allem für die Teilnehmerinnen mit frühem Chronotyp gilt. Des Weiteren werden mittlere- und langkettige Acylcarnitine, welche direkt von der Niere über die Fettsäureoxidation produziert werden, direkt in den Urin abgegeben (Mirzoyan et al., 2017). Innerhalb des Mitochondriums, wird die Fettsäureoxidation von der NAD<sup>+</sup> Coenzym Konzentration beeinflusst. Das Enzym NAMPT (nicotinamide phosphoribosyl transferase), welches einen stark zeitlich regulierenden Einfluss auf die NAD<sup>+</sup> Synthese hat, wird durch den CLOCK/BMAL1 Protein Komplex (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput / Brain muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Like 1) reguliert (Bailey et al., 2014; Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009; Sahar and Sassone-Corsi, 2009). Der CLOCK/BMAL1 Transkriptionsfaktor-komplex nimmt eine Schlüsselrolle bei der Modulation des circadianen Rhythmus ein (Sahar and Sassone-Corsi, 2009). Die erhöhten Acylcarnitin-Konzentrationen während der Nachtschicht sind wahrscheinlich auf eine reduzierte circadiane Transkription des NAMPT Gens bei Krankenschwestern in der Nachtschicht zurückzuführen, welche zu einer Abnahme der NAD<sup>+</sup> Konzentrationen führt (Bailey et al., 2014; Bracci et al., 2014; Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009). Des Weiteren sind hier die ACADs (Acyl-CoA dehydrogenasen) zu nennen, welche die Oxidation von langkettigen Acylcarnitinen katalysieren, in ihrer Aktivität einem Tagesrhythmus unterliegen und von Nachtschichtarbeit beeinflusst werden könnten (Manoogian and Panda, 2016). Zusätzlich ist hier eine Zunahme von C14:2-OH zu nennen. C14:2-OH ist ein Produkt des C14:2-OH-CoA, welches durch das bifunktionale Enzym Ehhadh verstoffwechselt wird (Mirzoyan et al., 2017). Die Expression von Ehhadh hängt von dem circadianen Gen *BMAL1* ab (Kohsaka et al., 2014). Erhöhte Konzentrationen an C14:2-OH könnten über eine beeinflusste Aktivität von Ehhadh (durch eine reduzierte Bmal1 Expression bedingt), beeinflusst sein (Klootwijk et al., 2014; Kohsaka et al., 2014; Mirzoyan et al., 2017). Wegen erhöhter Anpassungsschwierigkeiten (an Nachtschichtarbeit) von Krankenschwestern mit einem frühen Chronotyp, schlussfolgern wir,

dass diese Teilnehmerinnen besonders sensitiv auf Nachtschichtarbeit reagieren und die stärksten metabolischen Anzeichen für ein Schlafdefizit zeigen.

### ***Anzeichen von zellulärem Stress für frühe und späte Chronotypen während Nachtschicht***

Ein weiterer interessanter Metabolit stellt SM 24:0 dar. Dieser ist unter Berücksichtigung der Morgenurine sowohl für die frühen als auch die späten Chronotypen zu sehen (erhöht). Sphingomyeline sind ein zentraler Bestandteil der Zellmembran und werden durch die Übertragung von Phosphocholin auf Ceramid gebildet (Ternes et al., 2009). Diese Reaktion wird durch das Enzym SMS2 (Sphingomyelin Synthase 2) an der Plasmamembran katalysiert. SMS2 wird durch das Gen SGMS2 codiert, welches bezüglich seiner Expression einem circadianen Rhythmus unterworfen ist (Bollinger et al., 2011). Eine veränderte Genexpression während der Nachtschicht im Vergleich zur Tagschicht könnte zu einer erhöhten Produktion von SMS2 führen und in einer gesteigerten Enzymaktivität resultieren. Diese würde die Konzentrationsänderung (Anstieg) an Sphingomyelin erklären. Ein weiterer Baustein im Sphingomyelin-Stoffwechsel ist die Aktivierung des sogenannten „transcription factor NF- kappa B (NF-κB)“ durch SMS2 (Hailemariam et al., 2008; NFKB1 Gene - GeneCards). NF-κB ist ein Protein, welches eine Schlüsselrolle in der Immunantwort bei Entzündungen spielt (Tripathi and Aggarwal, 2006). Es wird normalerweise durch verschiedene Stimuli wie Stress oder Entzündungen aktiviert und wurde mit verschiedenen Krankheiten (Asthma und Diabetes) in Verbindung gebracht (Ahn and Aggarwal, 2005; Tripathi and Aggarwal, 2006). Die sichtbare Erhöhung der Sphingomyelin-Konzentration mit der einhergehenden Aktivierung des NF-κB könnte somit als eine erste Reaktion des Organismus auf Stress angesehen werden. Wegen der tragenden Rolle von NF-κB für die Immunantwort wurde es auch als „Rauchmelder“ der Zelle für bezeichnet (Ahn and Aggarwal, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass frühe und späte Chronotypen in der vorliegenden Studie während der Nachtschicht erhöhtem zellulärem Stress ausgesetzt zu sein scheinen, wohingegen intermediäre Chronotypen besser damit zurechtkommen.

## 7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Insgesamt ließen sich keine erheblichen Beeinträchtigungen der Metabolom-Profile unter Nachtarbeit erkennen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten am ehesten auf Effekte von Nachtarbeit auf die Gruppe der Acylcarnitile und somit eine mögliche Beeinträchtigung des Fettstoffwechsels gerade bei extremen, insbesondere frühen Chronotypen hin. Hieraus lässt sich ableiten, dass eine begleitende Ernährungsberatung insbesondere für diese Gruppen zu empfehlen sein könnte.

## 8. Anhang/Anhänge

**Tabelle A1. Signifikant mit Melatonin, Cortisol und 17- $\beta$ -Estradiol korrelierte Metaboliten**

Die erste Spalte zeigt Metabolite, für die eine signifikante Korrelation nach Spearman mit den Hormonen Melatonin, Cortisol und 17- $\beta$ -Estradiol zu sehen war. Die nachfolgenden Spalten geben die Korrelationskoeffizienten  $r$  und deren  $P$ -Werte für die jeweilige Schichtgruppe wieder. Signifikante  $P$ -Werte ( $P < 1.1E-3$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	Tagschichtgruppe		Nachtschichtgruppe			
	Tagschicht		Tagschicht		Nachtschicht	
	$r$	$P$ -Wert	$r$	$P$ -Wert	$r$	$P$ -Wert
Melatonin						
C0	-0.12	1.4E-01	0.00	9.6E-01	-0.21	<b>3.1E-07</b>
C10:2	0.04	5.8E-01	0.00	9.5E-01	0.21	<b>3.5E-07</b>
C12	-0.12	1.4E-01	-0.23	<b>5.1E-06</b>	-0.04	3.6E-01
C14:1	-0.14	8.6E-02	-0.19	<b>1.4E-04</b>	0.01	8.8E-01
C14:1-OH	-0.14	7.5E-02	-0.23	<b>2.9E-06</b>	0.00	9.1E-01
C14:2	-0.09	2.3E-01	-0.19	<b>1.6E-04</b>	-0.02	7.0E-01
C16	-0.11	1.8E-01	-0.21	<b>3.2E-05</b>	0.12	2.9E-03
C16-OH	-0.04	6.4E-01	-0.22	<b>8.6E-06</b>	0.05	2.4E-01
C2	-0.13	1.1E-01	0.00	9.8E-01	-0.19	<b>1.7E-06</b>
C3	-0.14	7.9E-02	-0.05	2.9E-01	-0.20	<b>1.2E-06</b>
C5:1	0.00	9.6E-01	-0.05	3.6E-01	-0.20	<b>1.4E-06</b>
C7-DC	-0.22	4.1E-03	-0.28	<b>3.1E-08</b>	-0.07	7.0E-02
C9	-0.23	3.7E-03	-0.22	<b>1.4E-05</b>	0.18	<b>1.3E-05</b>
Gln	-0.09	2.6E-01	-0.02	6.3E-01	-0.28	<b>1.2E-12</b>
Gly	0.01	8.8E-01	0.00	9.8E-01	-0.17	<b>2.2E-05</b>

H1	-0.21	7.9E-03	-0.16	1.3E-03	0.13	<b>9.7E-04</b>
His	0.02	7.7E-01	0.13	9.7E-03	-0.16	<b>8.2E-05</b>
Phe	-0.05	5.5E-01	-0.25	<b>8.0E-07</b>	-0.16	<b>7.2E-05</b>
Ser	-0.02	7.7E-01	0.01	8.2E-01	-0.16	<b>9.2E-05</b>
Trp	0.01	9.1E-01	-0.06	2.5E-01	-0.15	<b>2.9E-04</b>
aeC38:6	0.01	8.5E-01	-0.18	<b>4.3E-04</b>	0.06	1.3E-01

Cortisol

Arg	-0.14	7.9E-02	0.02	6.9E-01	-0.16	<b>8.7E-05</b>
C0	-0.07	3.9E-01	-0.18	<b>3.4E-04</b>	0.04	3.5E-01
C14:2	0.03	7.2E-01	0.07	1.5E-01	0.14	<b>8.9E-04</b>
C2	0.04	5.8E-01	-0.20	<b>8.0E-05</b>	0.12	2.4E-03
C3	-0.17	2.9E-02	-0.16	<b>1.0E-03</b>	0.01	8.4E-01
C9	-0.32	<b>3.0E-05</b>	-0.15	3.2E-03	-0.14	<b>6.0E-04</b>
Gln	-0.24	2.5E-03	-0.18	<b>2.7E-04</b>	0.10	1.1E-02
H1	-0.40	<b>1.2E-07</b>	-0.28	<b>1.9E-08</b>	-0.30	<b>3.0E-14</b>
His	-0.13	1.1E-01	-0.19	<b>1.6E-04</b>	-0.01	7.4E-01
Met	-0.27	<b>4.4E-04</b>	-0.15	2.1E-03	-0.09	3.2E-02
Phe	-0.26	<b>6.7E-04</b>	-0.15	2.0E-03	-0.02	6.4E-01
Pro	-0.12	1.2E-01	0.03	5.7E-01	-0.14	<b>8.6E-04</b>
Ser	-0.17	3.1E-02	-0.18	<b>2.6E-04</b>	-0.08	5.3E-02
Thr	-0.30	<b>1.2E-04</b>	-0.21	<b>3.9E-05</b>	-0.11	6.3E-03

17-β-Estradiol

C10_1	0.13	1.1E-01	-0.34	<b>1.4E-11</b>	-0.16	<b>8.1E-05</b>
C10_2	-0.16	4.8E-02	-0.19	<b>1.4E-04</b>	0.01	8.2E-01
C2	0.27	<b>5.1E-04</b>	0.02	6.6E-01	0.06	1.4E-01
C4_1	0.30	<b>1.3E-04</b>	-0.22	<b>1.4E-05</b>	-0.11	4.8E-03
C5	-0.12	1.4E-01	0.09	9.1E-02	0.22	<b>4.0E-08</b>
C5MDC	0.28	<b>2.6E-04</b>	-0.22	<b>1.1E-05</b>	-0.12	2.8E-03
C5_1	-0.11	1.5E-01	0.11	3.7E-02	0.16	<b>1.2E-04</b>
C5_1DC	0.28	<b>2.9E-04</b>	-0.21	<b>3.9E-05</b>	-0.11	5.7E-03
C6_1	-0.03	7.5E-01	-0.17	<b>9.9E-04</b>	0.00	9.5E-01

C8_1	0.16	4.5E-02	-0.21	<b>3.0E-05</b>	-0.20	<b>4.7E-07</b>
Gln	0.00	9.7E-01	0.01	8.4E-01	0.20	<b>9.9E-07</b>
Gly	0.09	2.4E-01	0.22	<b>1.4E-05</b>	0.31	<b>5.1E-15</b>
Met	0.02	8.0E-01	-0.03	5.1E-01	0.25	<b>5.6E-10</b>
Phe	-0.01	9.3E-01	0.11	3.0E-02	0.18	<b>5.5E-06</b>
Pro	0.00	9.7E-01	0.00	9.2E-01	0.15	<b>2.0E-04</b>
SMC24_0	-0.12	1.2E-01	0.02	7.3E-01	0.23	<b>9.2E-09</b>
Ser	0.07	3.5E-01	0.11	3.5E-02	0.28	<b>2.3E-12</b>
Thr	-0.03	7.2E-01	0.02	7.4E-01	0.16	<b>8.9E-05</b>
Trp	0.06	4.4E-01	-0.02	7.1E-01	0.14	<b>4.0E-04</b>
Tyr	0.11	1.8E-01	0.05	3.0E-01	0.18	<b>1.0E-05</b>
Val	0.15	5.4E-02	0.06	2.6E-01	0.26	<b>2.6E-10</b>
xLeu	0.22	5.4E-03	0.13	1.1E-02	0.22	<b>3.8E-08</b>

**Tabelle A2. Signifikant mit Melatonin, Cortisol und 17-  $\beta$  -Estradiol assoziierte Metaboliten**

Die erste Spalte zeigt Metabolite, die signifikant mit den Hormonen, Melatonin, 17-  $\beta$  -Estradiol und Cortisol assoziiert sind. Die nachfolgenden Spalten geben den Schätzwert, die Standardfehler (SE), den *P*-Wert sowie die False Discovery Rate (FDR) wieder. Signifikante *P*-Werte ( $P < 1.1E-3$ ) sind fett gedruckt.

Metabolit	$\beta$ -Schätzwert (95% CI)	SE	<i>P</i> -Wert	FDR
Melatonin				
C10:1	-0.09	0.02	<b>6.2E-06</b>	<b>4.5E-05</b>
C10:2	0.14	0.03	<b>3.0E-08</b>	<b>1.3E-06</b>
C2	-0.07	0.02	<b>8.4E-04</b>	<b>4.6E-03</b>
C7-DC	-0.10	0.02	<b>4.5E-06</b>	<b>4.1E-05</b>
Gln	-0.13	0.03	<b>9.2E-07</b>	<b>1.3E-05</b>
Gly	-0.09	0.02	<b>1.6E-05</b>	<b>1.0E-04</b>
Phe	-0.12	0.02	<b>5.5E-07</b>	<b>1.2E-05</b>
PC ae C38:3	0.11	0.02	<b>4.7E-06</b>	<b>4.1E-05</b>
Cortisol				
C16	-0.08	0.02	<b>4.1E-04</b>	<b>1.3E-03</b>
C3	-0.09	0.02	<b>2.7E-04</b>	<b>1.0E-03</b>
C5	-0.06	0.01	<b>4.8E-05</b>	<b>3.0E-04</b>
C9	-0.10	0.02	<b>2.0E-07</b>	<b>3.0E-06</b>
Arg	-0.08	0.02	<b>9.3E-05</b>	<b>4.6E-04</b>
Gly	-0.07	0.02	<b>2.3E-04</b>	<b>9.0E-04</b>
His	-0.08	0.02	<b>1.4E-04</b>	<b>6.0E-04</b>

Met	-0.08	0.02	<b>3.4E-06</b>	<b>3.0E-05</b>
Phe	-0.13	0.02	<b>4.9E-08</b>	<b>1.1E-06</b>
Ser	-0.09	0.02	<b>8.0E-05</b>	<b>4.4E-04</b>
Thr	-0.10	0.02	<b>3.3E-05</b>	<b>2.4E-04</b>
Tyr	-0.09	0.02	<b>3.3E-06</b>	<b>3.0E-05</b>
Val	-0.07	0.02	<b>3.2E-04</b>	<b>1.1E-03</b>
xLeu	-0.08	0.02	<b>4.3E-04</b>	<b>1.3E-03</b>
H1	-0.27	0.02	<b>1.1E-25</b>	<b>5.0E-24</b>
Estradiol				
C9	-0.13	0.03	<b>2.0E-06</b>	<b>8.7E-05</b>



## Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP321

Titel: Pilotstudie zum Einfluss von Schichtarbeit auf die Gesundheit – Untersuchung des Einflusses von Schichtarbeit auf Metabolom und Hormonprofile bei Gesundheits- und Krankenpflegerinnen

### Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 27. 03. 2018 vorgelegte


**Abschlussbericht** mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.

 , IPA Datum: 27.3.2018


Name, Institution

 , IPA Datum: 27.3.2018

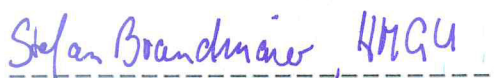
Name, Institution

 , IPA Datum: 27.3.2018

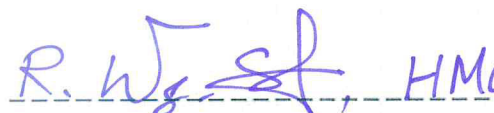
Name, Institution

 , HMGU Datum: 27.3.2018

Name, Institution

 , HMGU Datum: 27.03.2018

Name, Institution

 , HMGU Datum: 27.03.2018

Name, Institution