

Aus dem Institut für Neuroendokrinologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. J. Born

---

# **Über den Beitrag von Interleukin-6 auf die langsam oszillierende hirnelektrische Aktivität im Schlaf**

Inauguraldissertation

Zur Erreichung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Nora Manon Jacob

aus Braunschweig

Berlin 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. medic. Lisa Marshall

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Nitschke

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2012

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.07.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Schlaf.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Polysomnographische Messung des Schlafes .....	2
1.1.2 Hirnelektrische Rhythmen im Schlaf .....	4
<b>1.2 Neuromodulatorische und neuroendokrine Rolle des Immunsystems für den Schlaf .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Interleukin 6 .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Interleukin 6 und seine Rezeptoren .....	9
1.3.2 Periphere und zentrale Wirkungen des IL-6 10	
1.3.3 Interleukin 6 und Schlaf .....	11
1.3.4 IL-6 und neuronale Aktivität .....	15
<b>1.4 Fragestellung und Hypothese .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Versuchspersonen .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Schlaflabor .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Versuchsablauf .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 EEG und polysomnographische Aufzeichnung .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Blutentnahmen und Parameterbestimmung .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Datenauswertung .....</b>	<b>25</b>
<b>2.7 Statistik .....</b>	<b>26</b>

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1 Polysomnographie	28
3.2 Leistungsspektren des Elektroenzephalogramms	30
3.3 IL-6 und Kortisol	32
3.3.1 Plasmakonzentrationen von IL-6 und s-IL-6-R	32
3.3.2 Serumkonzentrationen von Kortisol	33
<b>4 Diskussion</b>	<b>34</b>
4.1 IL-6 erhöht den SWS und die SWA in der zweiten Nachthälfte (Hypothese 1) ...	34
4.2 IL-6-Applikation führt zur Abnahme des REM-Schlafes (Hypothese 2).....	37
4.3 IL-6 verbessert die Schlafeffizienz (Hypothese 3) .....	39
4.4 Periphere Wirkungen von IL-6 (Hypothese 4) .....	40
4.5 Diskussion der Methoden .....	42
4.6 Ausblick.....	43
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
<b>7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b> .....	<b>51</b>
<b>8 Anhang</b> .....	<b>52</b>
<b>9 Danksagung</b> .....	<b>56</b>
<b>10 Lebenslauf</b> .....	<b>57</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CRP	C-reaktives Protein
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
GH	Growth hormone
GHRH	Growth hormone releasing hormone
gp 130	Glykoprotein 130
HPAA	Hypothalamus-Hypophysen-Adrenokortikale-Achse
IL-6	Interleukin 6
m-IL-6-R	Membrangebundener Interleukin-6- $\alpha$ -Rezeptor
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NREM	Non-Rapid-Eye-Movement
REM	Rapid-Eye-Movement
S1-S4	Schlafstadium 1-4
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sgp 130	Lösliches Glykoprotein 130
s-IL-6-R	Löslicher Interleukin-6- $\alpha$ -Rezeptor
SPW-R	Sharp wave-ripple
SRS	Sleep Regulatory Substances
SWA	Slow Wave Activity
SWS	Slow Wave Sleep
Tab.	Tabelle
W	Wach

# 1 Einleitung

## 1.1 Schlaf

Schlaf ist ein Zustand der Ruhe, eine Art Bewusstlosigkeit, die einem Lebewesen zur Regeneration, aber auch zur Weiterentwicklung dient. Schlaf ist dadurch gekennzeichnet, dass eine stereotype Position eingenommen wird und wenige Bewegungen stattfinden. Währenddessen zeigt sich ein vermindertes Antwortverhalten gegenüber externen Reizen, und der Schlafprozess ist reversibel. Der Schlaf scheint subjektiv eine regenerative Rolle für den gesamten Organismus zu haben, weil sich nach dem Schlaf für gewöhnlich das Gefühl der Erholung einstellt. Durch die Ruhephase haben der Körper, die Organe, Stoffwechselforgänge und auch alltägliche Abnutzungserscheinungen die Möglichkeit, sich zu regenerieren. Es hat sich gezeigt, dass Schlaf von wesentlicher Bedeutung für die Hirnfunktion ist. Beispielsweise werden während des Schlafes die Gedächtnisbildung weiter gefestigt (Born *et al.* 2006; Gais *et al.* 2006) und Erinnerungen verarbeitet. Weiterhin finden homöostatische Regulationsprozesse des Gehirns statt (Diekelmann & Born 2010; Tononi & Cirelli 2006).

Durch Schlafentzug, selbst durch partiellen, kommt es beim Menschen zu physiologischen Änderungen, beispielsweise Änderungen der elektrischen Hirnaktivität (gemessen an der unterschiedlichen Ausprägung des Frequenzspektrums des Elektroenzephalogramms (EEG) (Brunner *et al.* 1993)), zu kognitiven Einbußen und negativer Stimmung (Dinges *et al.* 1997), sowie zur Beeinflussung des endokrinen Systems und des Immunsystems (Redwine *et al.* 2000).

In verschiedenen Studien hat sich gezeigt, dass sich Schlaf und Immunsystem gegenseitig beeinflussen. Zum einen können Zellen und Transmitter des Immunsystems die Schlafarchitektur beeinflussen (Krueger & Majde 2003). Zum anderen beeinflusst der Schlaf das Immunsystem. Während des Schlafes zeigen sich beispielsweise andere Aktivierungsmuster für immunkompetente Zellen, die auch eine Immunschwäche bei Schlafentzug erklären könnten (Born *et al.* 1997).

Diese Arbeit untersucht die durch das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) induzierten zentralnervösen Prozesse im Schlaf. Dabei wird die Modulation der hirnelektrischen Aktivität fokussiert.

### 1.1.1 Polysomnographische Messung des Schlafes

Die Erforschung des Schlafes, ein Thema, das die Menschheit seit jeher fasziniert hat, wurde durch die Erfindung des Elektroenzephalogramms (EEG) 1929 von Hans Berger objektivierbar gemacht. Durch das EEG konnte erstmals gezeigt werden, dass während des Schlafes komplexe neuronale Vorgänge stattfinden und es verschiedene Schlafphasen gibt. Aserinsky und Kleitmann (Aserinsky & Kleitman 1953) führten erstmals die Unterscheidung des sogenannten Non-Rapid Eye Movement-Schlafes (NREM-Schlaf) von dem Rapid Eye Movement-Schlaf (REM-Schlaf, „Paradoxe Schlaf“) ein.

Durch Rechtschaffen und Kales wurden 1968 Definitionen zur Einteilung verschiedener Schlafstadien eingeführt, die bis heute noch, wenn auch zum Teil in modifizierter Form, verwendet werden (Rechtschaffen & Kales 1968). Zur polysomnographischen Einteilung in die verschiedenen Schlafstadien werden typischerweise die Signale von zwei EEG-Ableitungen, des Elektrookulogramms (EOG) und des Elektromyogramms (EMG) verwendet. Die aufgezeichneten Signale werden in 30-sekündigen Epochen betrachtet und verschiedenen Stadien zugeteilt. Seit einiger Zeit gibt es Bestrebungen, die Kriterien der Schlafstadieneinteilung an neuere neurophysiologische Kenntnisse und analysetechnische Möglichkeiten anzupassen (Rodenbeck *et al.* 2006).

Neben dem Wachzustand (W) differenziert man die Stadien S1-S4, die zum NREM-Schlaf gezählt werden, und den REM-Schlaf. Die wesentlichen Kriterien zur Unterscheidung der Schlafstadien sind wie folgt:

Beim Wachzustand dominiert (>50%) die EEG-Alpha-Aktivität (Frequenz: 8-13 Hz, Amplitude: 20-100  $\mu$ V) und/oder niedrig amplitudige Aktivität gemischter Frequenzen. Das begleitende EMG ist oft relativ hoch amplitudig und es werden Augenbewegungen im EOG registriert.

Das Stadium 1 (S1) ist durch eine Verringerung des Alpha-Anteils (<50%) mit genereller Verlangsamung des EEGs (Theta-Aktivität, Frequenz: 2-7 Hz, Amplitude: 50-75  $\mu$ V) und rollenden Augenbewegungen charakterisiert. Dieses Stadium tritt nach dem Einschlafen auf, aber auch nach Bewegungen in tieferen Schlafphasen. In diesem Stadium treten noch keine Spindeln oder K-Komplexe (s.u.) auf. Beim Übergang zu Stadium 2 können Vertex-Wellen auftreten (hohe Frequenz und Amplitude bis 200  $\mu$ V).

Im Stadium 2 (S2) treten dann definitionsgemäß K-Komplexe (Welle mit steil negativer Auslenkung, direkt gefolgt von positiver Komponente, Dauer mind. 0,5 sec) und Schlafspindeln (12-14 Hz für mindestens 0,5 sec) auf. Treten während eines Intervalls von bis

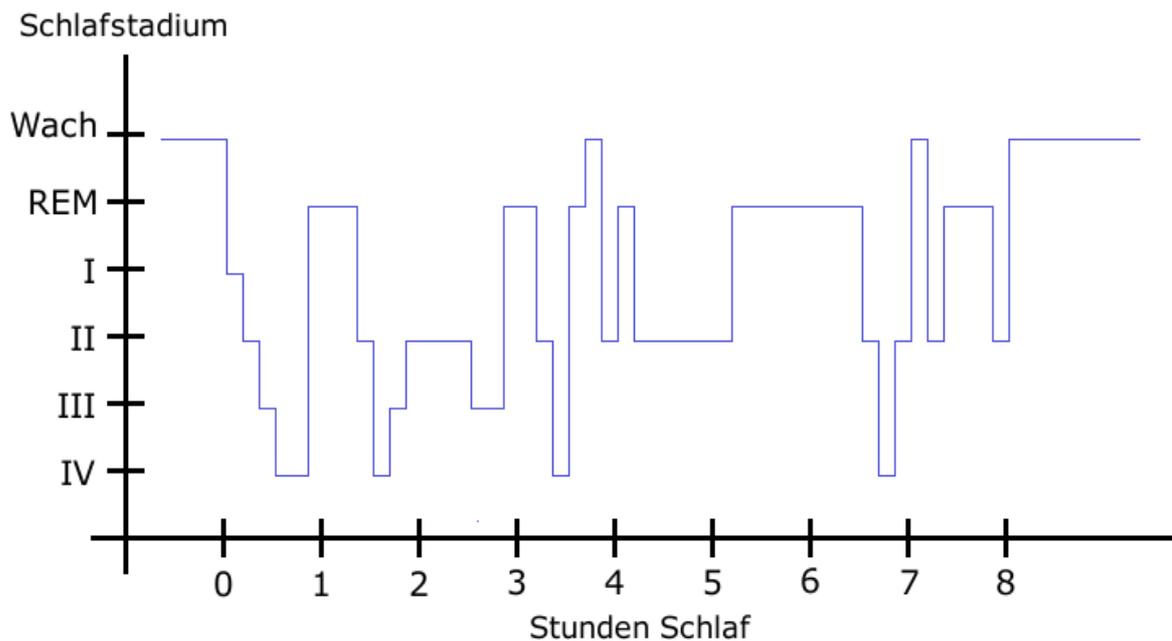
zu drei Minuten weder K-Komplexe noch Schlafspindeln und zusätzlich auch keine Bewegungsarousals auf, wird dieses Intervall als S2 gescort. Gibt es dagegen Bewegungsarousals, zählt dies zu S1 bis zum nächsten Auftreten einer Schlafspindel oder eines K-Komplex. Die Augenbewegungen werden ruhiger und der Muskeltonus nimmt weiter ab. Die Stadien 1 und 2 gelten als leichter NREM-Schlaf.

Für das Stadium 3 (S3) gilt, dass hohe langsame Wellen (Delta-Wellen, Frequenz 0,5-2 Hz,  $>75 \mu\text{V}$  Amplitude mit einer Breite von mindestens 0,5 sec) mehr als 20% einer Epoche ausmachen müssen. Für das Stadium 4 (S4) sind es mehr als 50% einer Epoche. Das EMG ist in beiden Stadien sehr flach. Die Stadien 3 und 4 gelten als Tiefschlafphasen.

Der REM-Schlaf ist durch schnelle Augenbewegungen, sehr niedriges EMG und ein charakteristisches, desynchronisiertes EEG mit Theta-Aktivität (2-7 Hz) und auch Alpha-Aktivität gekennzeichnet. Weiterhin fallen erhöhte Puls- und Blutdruckwerte auf. Der REM-Schlaf gilt als die traumreiche Schlafphase, und das Erwecken aus dieser Schlafphase wird als unangenehm wahrgenommen.

Die NREM-Schlafstadien S1-S4 und die REM-Schlafphase laufen zyklisch ab. Ein Schlafzyklus dauert ca. 90 Minuten und pro Nacht werden ungefähr 4-6 Zyklen durchlaufen (s. Abb. 1). In der ersten Nachthälfte überwiegt der Tiefschlaf (Schlafstadien 3 und 4), auf Englisch als „Slow Wave Sleep“ (SWS) bezeichnet. In der zweiten Nachthälfte nimmt der Anteil des REM-Schlafes zum Morgen hin immer mehr zu.

Epochen, die mehr als zur Hälfte durch muskelabhängige Bewegungsartefakte gestört sind, werden weder dem Wachzustand noch den Schlafstadien zugeordnet. Sie werden vielmehr als Movement Time (MT) gewertet und keinem Schlafstadium zugeordnet. Einzelne kleine Bewegungsartefakte, die weniger als die Hälfte der Epoche einnehmen, werden als Movement Arousal (MA) zusätzlich zum bestehenden Schlafstadium gescort. Sie können beispielsweise einen Stadienwechsel ankündigen.



**Abb. 1 Typischer Verlauf der einzelnen Schlafphasen und -zyklen**

### 1.1.2 Hirnelektrische Rhythmen im Schlaf

Die Einteilung der Schlafstadien ermöglicht die Angabe, wie viel Zeit im jeweiligen Schlafstadium verbracht wurde. Informationen über die Ausprägung der einzelnen Rhythmen der hirnelektrischen Aktivität werden indirekt erfasst.

In diesem Abschnitt werden die charakteristischen EEG-Rhythmen des Schlafes näher betrachtet. Sie werden dabei während des SWS fokussiert, da i) seit den 90er Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse über die hirnelektrische Aktivität im SWS inklusive vermehrter Hinweise für die funktionale Relevanz bei der Gedächtniskonsolidierung gewonnen wurden und ii) die subkutane IL-6-Gabe den Anteil der in SWS verbrachten Zeit modifizierte (Späth-Schwalbe *et al.* 1998).

Im EEG-Signal ist SWS durch das Vorkommen von großamplitudigen, langsamen Wellen (< 4 Hz) charakterisiert, die konventionell zusammenfassend als Deltawellen bezeichnet wurden. Die Rhythmen in diesem Frequenzbereich stellen jedoch kein einheitliches Phänomen dar. Ausgehend von Studien auf zellulärer Ebene wurde zwischen „clock-like“ Deltawellen thalamischen Ursprungs, kortikalen Deltawellen und langsameren Oszillationen unterschieden. Erstere sind das Ergebnis intrinsischer Aktivität (Zwischenspiel zweier intrinsischer Ionenströme) thalamocorticaler Zellen. Diese Aktivität wird vor allem im Frequenzbereich 1 – 4 Hz analysiert (Steriade 1999).

Die langsamen Oszillationen ( $< 1$  Hz) treten im Neocortex, aber auch anderen Hirnregionen auf. Ihre maximale Leistung im EEG liegt beim Menschen im Frequenzbereich um 0,7 – 0,8 Hz. Die kortikalen Deltawellen werden mittlerweile als Ausprägung (der hyperpolarisierenden Phase) der langsamen Oszillationen betrachtet. Slow Wave Activity (SWA) umfasst alle EEG Rhythmen im Frequenzbereich von 0,5 bis 4 Hz. Da die spektrale Leistung der langsamen Oszillation ( $< 1$  Hz) deutlich stärker als die Rhythmen im 1-4 Hz Frequenzbereich ist, wird die SWA von der Aktivität der langsamen Oszillation wesentlich geprägt. In dieser Arbeit wird die SWA auch berechnet.

Die langsamen Oszillationen wurden erstmals von Steriade (Steriade *et al.* 1993b; Steriade *et al.* 1993a) bei intrazellulären Untersuchungen an Tieren entdeckt und konnten dann auch in humanen EEGs nachgewiesen werden (Möller *et al.* 2002). Die langsame Oszillation besteht aus einer Depolarisations- und Hyperpolarisationsphase. Im Oberflächen-EEG unterscheidet man zwischen einem positivem und einem negativen Anteil. Die negative Halbwelle im Oberflächen-EEG reflektiert die Hyperpolarisationsphase der langsamen Oszillation. Dieser Zustand wird auch als „down state“ bezeichnet. Es treten nahezu keine Entladungen der neocorticalen Neurone auf. Der positive Anteil reflektiert die Depolarisationsphase und wird entsprechend als „up state“ verstanden (Contreras & Steriade 1995; Steriade *et al.* 1993a). Die traditionellen Deltawellen des Tiefschlafes repräsentieren am wahrscheinlichsten die hyperpolarisierende Phase (negative Halbwelle im EEG) der langsamen Oszillationen. Die langsame Oszillation breitet sich entlang des Neocortex aus und greift auch auf Strukturen wie den Thalamus oder den Hippocampus über. Es konnte ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der langsamen Oszillationen und dem Auftreten von Spindeln und sharp wave-ripple-(SPW-R-)Aktivität gezeigt werden (Sirota *et al.* 2003) und weiterhin, dass es während der Depolarisationsphase der langsamen Oszillation zu einer erhöhten Spindelaktivität (Möller *et al.* 2002) und SPW-R-Aktivität (Möller *et al.* 2006) kommt.

Corticothalamische Schlafspindeln treten zum einen im NREM-Schlaf während des Schlafstadiums 2 auf, aber auch während des SWS. Der hippocampale SPW-R-Komplex reflektiert ein starkes Depolarisationsereignis („sharp wave“: 40-120 ms Dauer), das in der CA3-Subregion des Hippocampus seinen Ursprung hat und zusammen mit den sogenannten *Ripples* – neuronalen Entladungen in der Pyramidenschicht der CA1-Subregion (100-300 Hz) – auftritt (Buzsaki 1989).

## 1.2 Neuromodulatorische und neuroendokrine Rolle des Immunsystems für den Schlaf

Die Botenstoffe des Immunsystems sind die Zytokine. Es handelt sich um eine Klasse von Peptiden, die von Zellen des Immunsystems produziert werden und für diese als Botenstoffe fungieren. Man teilt sie in verschiedene Untergruppen ein, wie Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren oder Chemokine. Lange Zeit ging man davon aus, dass Zytokine ein reines Produkt des Immunsystems sind mit Aufgaben, die sich auf dieses beschränken. Aber es wurde deutlich, dass Zytokine auch neuroendokrine (Vgontzas *et al.* 2005) und neuromodulatorische (Lange *et al.* 2010) Funktionen besitzen.

Eine der Aufgaben ist die Aktivierung von Funktionen im Gehirn während einer Entzündung, zum Beispiel das Initiieren von Fieber oder Müdigkeit. Weiterhin beeinflussen sie die Hämatopoese und wirken bei der Gewebe- und Zelldifferenzierung mit.

Zytokine haben allem Anschein nach auch eine Rolle bei der Beeinflussung von Schlaf und Schlafstadien. Unter den Zytokinen gibt es eher schlafinduzierende (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6) und schlafhemmende (IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- $\beta$ ) Komponenten (Krueger & Majde 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die schlaffördernden Zytokine den Anteil von NREM-Schlaf zu Lasten des REM-Schlafs erhöhen und dass IL-1- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mit dem Anteil an SWA korrelieren (Krueger & Majde 2003). Es wurde der Begriff der „Sleep Regulatory Substances“ (SRS) formuliert, der durch einen zu erfüllenden Kriterienkatalog definiert ist (Krueger *et al.* 2007). Diese Kriterien beinhalten, dass SRS einen Schlafphänotyp wie z.B. den NREM-Schlaf erhöhen sollen. Die Hemmung der SRS soll Spontanschlaf reduzieren und die Spiegel der SRS sollen mit der Schlafneigung korrelieren. Außerdem sollen sie die Schlafregulierung beeinflussen und während pathologischer Zustände mit der Schläfrigkeit korrelieren. Diese Kriterien werden beispielsweise von IL-1 und TNF- $\alpha$  erfüllt. Für IL-6 konnten diese Kriterien bis jetzt noch nicht alle nachgewiesen werden. Zytokine können so einerseits direkt neuromodulatorisch als schlafregulierende Substanzen fungieren. Andererseits können sie aber auch über Interaktionen mit dem neuroendokrinen System den Schlaf beeinflussen. Generell scheinen Zytokine eine Rolle bei der Schlafarchitektur zu spielen, und im Fall einer Entzündung werden diese Effekte durch erhöhte Werte verstärkt. Die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem zentralnervösen Prozess des Schlafes sind bidirektional.

In einer der ersten Studien, welche speziell den Einfluss von Schlaf und nicht nur der zirkadianen Rhythmik auf das Immunsystem zeigte, kam es zu einem schlafbedingten Abfall von zirkulierenden Monozyten, NK-Zellen und Lymphozyten und zu einem Anstieg von IL-2 (Born *et al.* 1997). Man vermutete eine eventuelle Umverteilung der Zellen in den extravasalen Raum, wie beispielsweise das Lymphgewebe, um in einer Zeit mit geringem Antigenkontakt die Immunabwehr dort aufrechtzuerhalten und zu organisieren. Damit wäre auch eine Immunschwäche bei Schlafstörungen zu erklären.

Der Effekt der Zytokine hängt von vielen Faktoren ab, wie beispielsweise der Konzentration, Infektionen oder der Schlafphase. Akut führen Zytokine eher zu einer Zunahme der Müdigkeit und zu flacherem Schlaf. Verspätet kommt es aber zu verbessertem Schlaf, eventuell durch die Induktion von T-Zellen, die dann schlaffördernde Zytokine produzieren (Marshall & Born 2002).

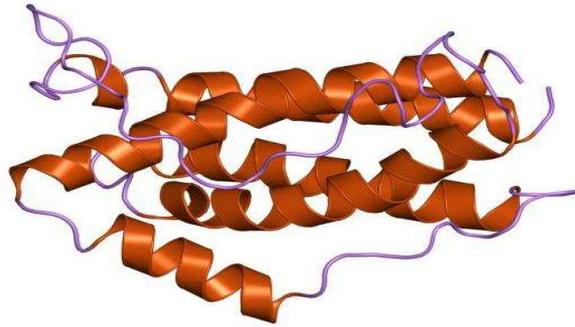
Releasinghormone wie CRH und GHRH haben Einfluss auf die Zytokinfreisetzung, auf den Schlaf und die Gedächtniskonsolidierung: GHRH beispielsweise hat eine schlaffördernde Wirkung, in dem es den NREM-Anteil bei Tieren und Menschen anhebt, was hauptsächlich durch autokrine und parakrine Vorgänge im Gehirn geschieht und nicht durch die Wirkung des Hormons an sich (Krueger & Majde 2003; Marshall *et al.* 1999; Perras *et al.* 1999). GHRH erhöht unter anderem aber auch die Th-1-vermittelte Produktion von schlaffördernden Zytokinen, wie beispielsweise IL-2 (Lange *et al.* 2006).

In dieser Arbeit sind die Wirkungen von CRH und Kortisol interessanter, weil IL-6, das Zytokin mit dem sich diese Arbeit hauptsächlich befasst, die Hypothalamus-Hypophysen-Adrenokortikale-Achse (HPAA) aktiviert und somit zu einer Ausschüttung von z.B. CRH und Kortisol führt. Aber auch das Kortisol mit seiner immunsuppressiven Wirkung beeinflusst die IL-6-Produktion. Kortisol weist eine zirkadiane Rhythmik auf mit einer sehr niedrigen Plasmakonzentration zu Beginn der Nacht, die dann ab ca. 2 Uhr nachts sukzessive steigt, bis sie ein Maximum in den frühen Morgenstunden erreicht. Denn der in der ersten Nachthälfte dominierende SWS unterdrückt die Aktivität der HPAA (Born & Fehm 1998), welche dann zum Morgen hin zunimmt. Dieser frühmorgendliche Peak könnte dann das IL-6 supprimieren (Seres *et al.* 2004). Auch die Schlafarchitektur wird durch Kortisol beeinflusst. Nach Kortisolgabe ergibt sich eine Schlafumverteilung mit Zunahme des SWS und Abnahme des REM-Schlafes (Born *et al.* 1989).

### 1.3 Interleukin 6

Da sich diese Arbeit vornehmlich mit den Auswirkungen von IL-6 auf Schlaf und die durch die intranasale Gabe von IL-6 hervorgerufenen hirnelektrischen Prozesse beschäftigt, folgt hier eine eingehendere Betrachtung. Speziell geht es um die genauen Wirkmechanismen auf Rezeptorebene und darum, die peripheren von den zentralen Wirkungen des IL-6 zu unterscheiden und vor allem die Auswirkungen auf Schlaf und die hirnelektrischen Prozesse zu beschreiben.

Für IL-6 zeigt sich, dass sich sein Aufgabengebiet nicht nur auf den immunologischen Bereich erstreckt, sondern ebenfalls auf den zentralnervösen und den endokrinen. Es wird von immunologischen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten oder Fibroblasten produziert. Zentral konnte die mRNA von IL-6 und von seinem Rezeptor IL-6-R bei Ratten in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden (Gadient & Otten 1994). IL-6 wird unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen zentral von beispielsweise Neuronen (März *et al.* 1998) oder Gliazellen exprimiert. Beispielsweise führt die Membrandepolarisation von Neuronen zu einer erhöhten Expression von IL-6 (Sallmann *et al.* 2000) (s. 1.3.4.), aber auch pathologische Bedingungen führen zu einer Zunahme der IL-6-Produktion. Bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen zeigen sich erhöhte IL-6-Konzentrationen (Frei *et al.* 1989; Suzuki *et al.* 1999a; Suzuki *et al.* 1999b). Die Produktion von IL-6 wird auch auf endokriner Ebene reguliert. Beispielsweise hemmen immunsuppressive Glucocorticoide die IL-6-Produktion (Breuninger *et al.* 1993). Ein fördernder Effekt auf die IL-6-Produktion konnte bei Ratten durch die bei Stresssituationen erhöhten Katecholamine wie z.B. Adrenalin nachgewiesen werden (van Gool *et al.* 1990). Ähnlich wie auch Hormone, beispielsweise Kortisol, weist IL-6 ein zirkadianes Sekretionsmuster auf (Vgontzas *et al.* 2005), das auch abhängig vom Schlaf-/Wach-Zyklus ist. Dies konnte nicht nur bei Menschen sondern auch bei Tieren gezeigt werden (Guan *et al.* 2005) (s. Abschnitt 1.3.3).



**Abb. 2 Strukturmodell Interleukin 6**

### **1.3.1 Interleukin 6 und seine Rezeptoren**

IL-6 kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden. Es gibt eine membrangebundene und eine lösliche Form. Die membrangebundene Form m-IL-6-R kommt nur auf wenigen Zellen des Körpers, wie Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen und einigen Lymphozyten, vor. Bei der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 an den membrangebundenen Interleukin-6- $\alpha$ -Rezeptor, und das Signal wird über das rezeptorassoziierte und signaltransduzierende Glykoprotein 130 (gp 130) weitergegeben.

Der lösliche Rezeptor s-IL-6-R hat die gleiche Affinität für IL-6 wie der membrangebundene IL-6 Rezeptor-Typ. Hierbei bildet der s-IL-6-Rezeptor einen Komplex mit IL-6, der dann an Zellen binden kann, die nur das gp 130 enthalten, um dann die Signaltransduktion auszulösen. Diesen Vorgang nennt man Transsignaling (Rose-John 2003). Der s-IL-6-R kommt beispielsweise im Urin, Serum oder Liquor vor und der Komplex mit IL-6 kann dann Zielzellen stimulieren, wie zum Beispiel Nervenzellen (März *et al.* 1999), die wegen des fehlenden membrangebundenen m-IL-6-Rezeptors durch IL-6 allein nicht stimuliert werden können. Das gp 130 ist auf fast allen Zellen des Körpers enthalten.

Der s-IL-6-R entsteht durch zwei unterschiedliche Mechanismen. Der PC-s-IL-6-R (PC: proteolytically cleaved) entsteht durch Proteolyse und zeigt eine schnelle Kinetik. Der DS-s-IL-6-R (DS: differentially spliced) entsteht durch mRNA-splicing. Die Sekretion ist verhältnismäßig langsam, weil es zu einer de novo-Synthese kommt.

Das Transsignaling kann durch das artifiziell hergestellte Designerzytokin Hyper-IL-6 nachgeahmt werden. Hierbei handelt es sich um ein fusioniertes Protein aus humanem IL-6 und dem s-IL-6-Rezeptor, die über ein flexibles Protein verbunden sind (Scheller & Rose-John 2006). Hyper-IL-6 kann, im Gegensatz zu IL-6 allein, viele Zellen des Gehirns aktivieren und ist 100- bis 1000-fach aktiver.

Lösliche Rezeptoren wirken meist antagonistisch, im Fall des s-IL-6-R aber nicht, dieser Rezeptor wirkt agonistisch. Beide Formen binden ihre Liganden mit gleicher Affinität. Ein natürlicher Antagonist des Transsignalings ist das lösliche Glykoprotein 130 (sgp 130). Das sgp 130 bindet nur an den IL-6/s-IL-6-R-Komplex und inhibiert damit selektiv das Transsignaling, nicht aber die klassische Signaltransduktion (Jostock *et al.* 2001). Bei alleiniger Gegenwart von IL-6 oder s-IL-6-R wirkt sgp 130 nicht antagonistisch. Da s-IL-6-R bei mehreren chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Crohn, vor allem am Übergang vom akuten in den chronischen Status eine Rolle zu spielen scheint, eröffnet die Wirkung des sgp 130 auch eventuelle therapeutische Optionen (Jones *et al.* 2005; Jones *et al.* 2011; Rose-John 2003).

### **1.3.2 Periphere und zentrale Wirkungen des IL-6**

IL-6 hat verschiedene Wirkungen, wobei systemische von cerebralen, sowie physiologische von pathologischen Effekten unterschieden werden können. Systemisch spielt IL-6 unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion. Es induziert die Produktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber und fördert den Proteinabbau in der Muskulatur. Auch die B-Zell-Differenzierung wird positiv beeinflusst. Zentral sezerniertes IL-6 moduliert die zentrale Komponente der Akute-Phase-Reaktion. Es kommt zu vermehrter Schläfrigkeit, dem pyrogenen Effekt, der Aktivierung der zentralen Komponenten der HPAA und der Einwirkung auf immunkompetente Organe wie Milz und Lymphknoten. Dies bedeutet, dass IL-6 einen Mechanismus auslöst, mit dem das Hirn auf das Immunsystem einwirken kann. Auch unter physiologischen Bedingungen werden regulierende und neuroprotektive Aspekte des IL-6 diskutiert (s. 1.3.4). IL-6 gehört zur Familie der neuropoetischen Zytokine. Hierzu gehören u.a. der Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Interleukin-11 (IL-11), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Gadient & Otten 1997). Diesen Substanzen werden neuroprotektive Wirkungen nachgesagt und ihnen ist gemeinsam, dass sie gp 130 als Untereinheit ihrer Signaltransduktion verwenden (Juttler *et al.* 2002).

Da während einer Infektion verschiedene Zytokine kaskadenartig ausgeschüttet werden, ist es schwierig zu sagen, welche Wirkung genau von welchem Zytokin ausgeht. Späth-Schwalbe (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) untersuchte die spezifischen Effekte von IL-6 durch subkutane Gabe. Hormonell führte dies zu einer Aktivierung der Stressachse mit Anstiegen von ACTH und Kortisol (s. Abschnitt 1.2.). Weiterhin kam es zu vermehrter Müdigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten und einer Umverteilung des Schlafes. Das subkutan applizierte IL-6 ließ die Körpertemperatur diskret ansteigen und es kam nach einem 12-stündigen Intervall zu einem deutlichen CRP-Anstieg.

Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-6 unter pathologischen Bedingungen sezerniert wird, aber auch unter physiologischen, allerdings in geringeren Dosen. Hierbei scheint es zentrale Einflüsse auf Schlaf, Gedächtnis, Körpertemperatur und Stimmung zu haben. Auch endokrinologische Wirkungen, wie Aktivierung der Stress-Achse wurden beobachtet.

### 1.3.3 Interleukin 6 und Schlaf

Für diese Arbeit sind vor allem die Auswirkungen des IL-6 auf die Schlafarchitektur und die hirnelektrische Aktivität interessant.

In diesem Abschnitt wird ein Überblick über die Beziehung zwischen IL-6 und Schlaf in mehrfacher Hinsicht gegeben. Dabei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Welches Verhalten zeigt das endogene IL-6 im Schlaf bzw. in Bezug auf das zirkadiane und normale Schlaf-Wach-Verhalten?
2. Welche Wirkung hat eine Modifizierung des Schlafes auf das endogene IL-6?
3. Welche Wirkung hat IL-6 auf Schlaf und Schlaffeffizienz?
4. Welche Wirkung hat die Gabe von exogenem IL-6 auf Schlaf?

Im Blut gesunder Probanden konnten während des Schlafes erhöhte IL-6-Spiegel gemessen und ein zirkadianes Sekretionsmuster dargestellt werden (Redwine *et al.* 2000; Vgontzas *et al.* 1999; Lange *et al.* 2010). Direkt zum Schlafbeginn, sowie während der Schlafstadien 1, 2 und des REM-Schlafes demonstrierte Redwine in ihrer Arbeit einen IL-6-Anstieg im Plasma (Redwine *et al.* 2000). Die Konzentration während des SWS unterschied sich nicht von der Konzentration während des Wachzustandes. In der Studie von Vgontzas *et al.* (Vgontzas *et al.* 1999) konnte in der Nacht mit normalem Schlaf eine

biphasische zirkadiane Rhythmik des IL-6-Spiegels gezeigt werden. Zwei Nadirs um 8:00 und 21:00 Uhr und zwei Peaks um 19:00 Uhr und um 5:00 Uhr mit einem Höhepunkt der Ausschüttung um 5:00 Uhr wurden beobachtet.

Auch bei Ratten wurden zentrale und periphere IL-6-Spiegel über den 24h-Zyklus gemessen. Im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Hypophyse, aber auch im Serum und Fettgewebe konnten während der hellen Schlafphase, im Gegensatz zu der dunkeln Aktivitätsphase höhere IL-6-Spiegel nachgewiesen werden (Guan et al., 2005). Seres (Seres et al., 2004) konnte bei gesunden Ratten eine klare zirkadiane Rhythmik mit einem Nadir in der dunklen Aktivitätsphase und einem Peak in der hellen Schlafphase. Wie bereits in Abschnitt 1.2. beschrieben, könnte der Nadir des IL-6 durch das ansteigende Kortison bedingt und somit die zirkadiane Rhythmik auch durch Kortisol beeinflusst sein.

Die Arbeit von Haack spricht IL-6 eine zirkadiane Rhythmik und schlafmodulierende Rolle ab (Haack et al. 2002). Hier wurden bei schwierigen Blutentnahmen oder Entnahmen aus einem liegenden intravenösen Katheter erhöhte IL-6 Konzentrationen gemessen, so dass die beobachteten nächtlichen IL-6-Anstiege (Redwine et al. 2000; Vgontzas et al. 1999) eher als Störfaktoren durch Blutentnahmen gedeutet wurden. Von Vgontzas (Vgontzas et al. 2005) wurde eine Kosinor-Analyse zur Korrektur möglicher Fehler durch die Blutentnahmetechnik durchgeführt, und es zeigte sich weiterhin eine zirkadiane Rhythmik für IL-6. Weiterhin sprechen die Ähnlichkeiten zwischen den Spezies dafür, dass Schlaf mit erhöhten IL-6-Spiegeln einhergeht.

Kam es zu einer Modifizierung des Schlafes, wie beispielsweise durch Schlafentzug, konnte ein verändertes Sekretionsmuster des IL-6 mit erhöhter Sekretion im Verlauf des nächsten Tages und einer niedrigeren IL-6-Sekretion in der darauffolgenden Nacht beobachtet werden, wobei die Gesamtmenge an sezerniertem IL-6 sich nicht änderte (Vgontzas et al. 1999). Die erhöhten IL-6 Werte am darauffolgenden Tag wurden mit einhergehender erhöhter Tagesmüdigkeit und Schläfrigkeit und die niedrigeren nächtlichen Werte mit tieferem Schlaf in Verbindung gebracht. Redwine (Redwine et al. 2000) zeigte, dass sich der Anstieg der IL-6-Konzentration bei partiellem Schlafentzug (Schlafbeginn erst um 03:00 Uhr) zum Zeitpunkt des späteren Schlafbeginns hin verschiebt.

In einer anderen Humanstudie konnte zwischen den Bedingungen Schlaf und Wachheit keine signifikante Änderung der IL-6-Plasmakonzentration nachgewiesen werden (Born et al., 1997). Lange (Lange et al. 2010) konnte zwar einen IL-6 Anstieg während des Schlafes darstellen, der aber von den Versuchsbedingungen Wachheit vs. Schlaf unbeeinflusst blieb.

Bei Menschen mit einer Schlafstörung, in diesem Fall einer chronischen Insomnie (nächtlich gestörter Schlaf, hohe Tagesmüdigkeit), kam es zu einer Umverteilung der IL-6-Produktion von der dunklen in die helle Periode des 24h-Zyklus (Vgontzas & Chrousos 2002), so dass vermutet wird, dass, passend zu den Beobachtungen nach Schlafentzug, ein am Tage erhöhter IL-Spiegel mit gestörtem nächtlichen Schlaf einhergeht (Vgontzas *et al.* 1999). Weiterhin korrelierten erhöhte IL-6-Werte am Tage nach Schlafentzug negativ mit dem SWS-Anteil in der darauffolgenden Nacht. Burgos (Burgos *et al.* 2006) wies bei Insomnie-Patienten erhöhte IL-6-Konzentrationen vor allem in der zweiten Nachthälfte nach und geht von einer bidirektionalen Beeinflussung aus. Schlaflosigkeit erhöht die Produktion von IL-6 und das erhöhte IL-6 wiederum beeinflusst die Schlafarchitektur.

Es scheint also, dass die IL-6-Sekretion einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Durch Schlafentzug oder Schlafstörungen kommt es zu einer Zunahme und zeitlichen Änderung der Sekretionsmuster. Somit scheint IL-6 Schläfrigkeit und Müdigkeit hervorzurufen, den Schlaf zu modulieren, aber nicht unbedingt Schlaf zu induzieren.

Ein weiterer interessanter Ansatz wurde von Vgontzas (Vgontzas *et al.* 2005) formuliert. Hier wurde zwischen den eigentlichen Wirkungen des IL-6 und weiteren Einflüssen durch zusätzlich sezerniertes Kortisol unterschieden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-6 ohne Aktivierung der HPA-Achse zu erhöhter Schläfrigkeit und Zunahme der Schlaffeffizienz führt. Kommt es jedoch im Rahmen der IL-6-Zunahme ebenfalls zu einer Aktivierung der HPA-Achse, resultieren hieraus Ermüdungserscheinungen kombiniert mit einer verminderten Schlafqualität.

Es existieren jedoch auch Beobachtungen, die keinen positiven Zusammenhang zwischen IL-6 und Schlaf vermuten lassen (Hong *et al.* 2005; Mills *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2011). Hong (Hong *et al.* 2005) stellte bei gesunden Probanden eine negative Korrelation zwischen der IL-6-Produktion in den Morgenstunden und der Schlaffeffizienz und dem Anteil des SWS in der darauffolgenden Nacht fest. Mills (Mills *et al.* 2007) wies eine positive Korrelation zwischen erhöhtem IL-6 und einer erhöhten Schlaf- und REM-Latenz bei gesunden Probanden auf, und bei der Arbeit von Thomas (Thomas *et al.* 2011) konnte bei erhöhter abendlicher IL-6 Expression eine Abnahme des SWS und eine Zunahme des REM beobachtet werden. Die Zunahme des REM-Schlafes wurde vor allem in der ersten Nachthälfte beobachtet, so dass auch über eine IL-6 vermittelte Verschiebung des REM-Schlafes in die erste Nachthälfte zu Ungunsten des SWS spekuliert wurde. Höhere IL-6-Konzentrationen wurden bei diesen Studien eher mit einer niedrigen Schlafqualität in Zusammenhang gebracht.

Weitere Erkenntnisse über die Interaktionen von IL-6 und Schlaf wurden experimentell bei Beobachtung der Auswirkungen von exogen appliziertem IL-6 auf die Schlafarchitektur gesammelt. Die bereits erwähnte Studie von Späth-Schwalbe und Kollegen (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) zeigte auf, dass es bei subkutaner Applikation von IL-6 am Abend vor dem Schlafen (4h vor Licht aus) zu vermehrter Müdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten kam. Es zeigte sich eine Modulation des nächtlichen Schlafes mit Reduktion des REM-Schlafes in der gesamten Nacht und des SWS in der ersten Nachthälfte, sowie einer Zunahme des SWS in der zweiten Nachthälfte. Es wurde diskutiert, ob die Abnahme des REM-Schlafes ein durch das erhöhte Kortisol vermittelter Aspekt sei, da andere Arbeiten zeigten, dass es durch Kortisolgabe zu einer Abnahme des REM-Schlafes kam (Born *et al.* 1989). Weiterhin wurde die Vermutung geäußert, dass die SWS-Umverteilung, die nicht durch den Effekt des Kortisols erklärt werden kann (Born *et al.* 1989), eher als zentraler Wirkmechanismus des IL-6 zu sehen ist. Diese Vermutung unterstützt zusätzlich die Arbeit von Hogan (Hogan *et al.* 2003). Hier wurde Ratten zentral (i.c.v.) IL-6 appliziert, ohne dass hierdurch der REM-Schlaf beeinflusst wurde. Bezüglich des NREM-Schlafes zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen von Späth-Schwalbe eine Zunahme des NREM-Schlafes innerhalb der ersten drei Stunden nach Injektion, gefolgt von einer Abnahme.

Auch durch Transsignaling wird Schlaf direkt beeinflusst. In einer Studie wurde Ratten Hyper-IL-6 (s.o.) injiziert (May *et al.* 2009). Das Hyper-IL-6 ähnelt dem IL-6-Transsignaling und aktiviert die gleichen Zellen im Gehirn (s.1.3.1). Nach den Injektionen kam es zu einem Anstieg des REM-Schlaf-Anteils. Der NREM-Schlaf wies nach Injektion von Hyper-IL-6 keine Änderung auf.

In einer weiteren Arbeit wurde wiederum der Einfluss von Schlaf auf das Transsignaling untersucht (Dimitrov *et al.* 2006). Dazu wurden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten des Transsignalings wie s-IL-6-R, sgp 130, die m-IL-6-R-Expression und die Anzahl IL-6 produzierender Monozyten bei Probanden während normalen Schlafes und während 24-stündiger Wachheit gemessen. Es zeigte sich, dass es im Schlaf während der zweiten Nachthälfte im Vergleich zu den Wachprobanden zu einem signifikanten s-IL-6-R-Anstieg kam, wobei der REM-Schlaf positiv mit der s-IL-6-R-Konzentration korrelierte. Dies bewirkte eine Zunahme der Anzahl an IL-6/s-IL-6-R-Komplexen und in Folge auch der Aktivität des Transsignalings. So wurden schließlich Zellen aktiviert, die normalerweise nicht auf IL-6 ansprechen. Schlaf erhöht somit vermutlich die Beeinflussung verschiedener Organsysteme durch IL-6. So weisen auch genauere Betrachtungen auf Einflüsse der immunologischen wie auch der zentralnervösen Ebene durch IL-6 hin.

Schlaf, hormonelle Sekretionsmuster und IL-6 beeinflussen sich gegenseitig auf verschiedenen Ebenen. Insgesamt scheint die Studienlage IL-6 in Bezug auf Schlaf und Schläfrigkeit einen fördernden Effekt zu zusprechen. Doch es existieren wie oben beschrieben auch gegenläufige Meinungen, so dass die Wirkung von IL-6 auf Schlaf durch weitere Studien geprüft werden muss.

#### **1.3.4 IL-6 und neuronale Aktivität**

Wie bereits beschrieben konnte die Expression von IL-6 in verschiedenen Hirnregionen durch verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden (s.1.3).

In verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass die IL-6-Genexpression durch Depolarisation von Neuronenmembranen ansteigt (Balschun *et al.* 2004; Sallmann *et al.* 2000). Balschun konnte beispielsweise nachweisen (Balschun *et al.* 2004), dass es durch Lernen zu einer Langzeitpotenzierung im Hippocampus von Ratten kam und dadurch vermittelt zu einer erhöhten IL-6-Genexpression. Weiterhin zeigte sich bei Untersuchungen an Astrozyten von Ratten, dass es durch die erhöhte IL-6 Expression unter anderem zu einer erhöhten Produktion von Neurotrophin kommt, welches neuroprotektiv wirkt (März *et al.* 1999). Die Expression von IL-6, ausgelöst durch die Depolarisation der Neuronenmembran könnte ein Mechanismus darstellen wie Nervenzellen ihr Überleben durch auto- und parakrine Wirkweise von IL-6 sichern.

Durch verschiedene Arbeiten verdeutlicht sich, dass vor allem das Transsignaling für die zentrale Wirkung von IL-6 von Bedeutung ist. Studien an Ratten wiesen die Notwendigkeit von s-IL-6-R für zentrale Wirkungen vom IL-6 nach. Die Arbeit von März (März *et al.* 1999) zeigte, dass es durch die kombinierte Gabe von IL-6 und s-IL-6-R oder von Hyper-IL6 zu einer dosis- und zeitabhängigen Änderung der Morphologie von Astrozyten kommt und diese Neurotrophin synthetisieren. Nur IL-6 oder der s-IL-6-R konnten diese Prozesse nicht hervorrufen. An sympathischen Neuronen von Ratten wurden die Expressierung von IL-6-mRNA und die Sekretion von biologisch aktivem IL-6 nachgewiesen (März *et al.* 1998). Die Neuronen waren jedoch erst nach Zugabe von s-IL-6-R für das von ihnen sezernierte IL-6 sensibel. Dadurch konnte aber ihr Überleben verbessert werden. Schöbitz konnte bei intracerebroventrikulärer Applikation von s-IL-6-R vor IL-6-Gabe bei Ratten deutlich verstärkte Effekte des IL-6 verzeichnen (Schöbitz *et al.* 1995) und May wies durch diese Methode eine signifikante Zunahme des REM-Schlafes bei Ratten nach (s.1.3.3).

Um die zentralen Wirkungsaspekte des IL-6 genau nachvollziehen zu können, sind möglichst hohe zentrale Konzentrationen zu erreichen und periphere Wirkungen gering zu halten. Da eine subkutane Gabe hierfür ungeeignet ist, musste für diese Arbeit eine passende Applikationsform im Vorfeld ausgewählt werden. Von den verschiedenen Möglichkeiten scheiden einige, wie beispielsweise die intravenöse, intramuskuläre oder orale Gabe aus, da sie hohe systemische Dosen verursachen würden. Die einzige Möglichkeit, beim Menschen allein das ZNS zu erreichen, ist die intrathekale Gabe. Da es sich hierbei um eine invasive Methode handelt, bestehen erhöhte Risiken (Infektionsgefahr, Gefahr von Rückenmarksschädigungen) und das Studiendesign wäre erheblich aufwendiger.

Deswegen wird hier eine **intranasale Gabe des IL-6** vorgesehen. Es hat sich in diversen Studien für verschiedene Hormone und Peptide gezeigt, dass durch die intranasale Applikation schnell und nicht invasiv hohe zentrale Dosen mit geringer peripherer Wirkung erreicht werden können, da die untersuchten Substanzen schnell und direkt den zerebralen Liquor unter möglicherweise vollständiger Umgehung des Blutkreislaufes erreichen (Born *et al.* 2002; Fehm *et al.* 2000). Weiterhin zeigten sich durch die hohen zentralen Dosen auch verstärkte zentrale Effekte im Gegensatz zur peripheren intravenösen Gabe (Pietrowsky *et al.* 1996). Auch im Tierversuch an Ratten konnten diese Zusammenhänge demonstriert werden (Chen *et al.* 1998). Dabei werden zwei verschiedene Transportwege, ein intraneuronaler und ein extraneuronaler, vermutet. Bei dem intraneuronalen geht man davon aus, dass die Substanzen in den N. olfactorius eingeschlossen werden und axonal in das Gehirn transportiert werden. Dieser Prozess dauert einige Stunden. Extraneuronal gelangen die Peptide zwischen interzellulären Spalten in das olfaktorische Epithel und diffundieren dann in den Subarachnoidalraum. Man geht davon aus, dass für die rasche zentrale Dosiserhöhung der schnellere extraneuronale Transportweg verantwortlich ist. Die cerebrale Aufnahme wird außerdem durch die Molekülgröße beeinflusst. In vorangegangenen Studien wurden Stoffe, wie Insulin oder Vasopressin (Born *et al.* 2002), mit einer relativ geringen Molekülgröße (Insulin: 5808 Dalton; Vasopressin 1084 Dalton) betrachtet. Interleukin-6 besitzt im Gegensatz hierzu eine relativ bedeutende Molekülgröße von ca. 26 000 Dalton, aber die intranasale Applikationsform scheint trotzdem die einfachste Art und Weise darzustellen, um vor allem die zentralen Wirkungen des IL-6 auf Schlaf und Gedächtnis in Abgrenzung zu und unter Ausschluss von systemischen Wirkungen zu beobachten.

## 1.4 Fragestellung und Hypothese

Wie beschrieben, werden IL-6 neuromodulatorische Eigenschaften zugesprochen, und es konnten vielfältige Daten zur schlafmodulierenden Wirkung von IL-6 gesammelt werden. Bei der hier vorliegenden Arbeit soll in erster Linie geklärt werden, ob das bei der hier gewählten Applikationsform vermeintlich zentralnervös wirkende IL-6 bei Menschen die hirnelektrische Aktivität und Schlafarchitektur beeinflusst. Vor allem die Arbeiten von Späth-Schwalbe, Hogan und May sind für diese Arbeit richtungsweisend, da sie bereits einen direkten Einfluss des IL-6 auf einzelne Schlafstadien deutlich gemacht haben.

**Hypothese 1:** Die intranasale Gabe von IL-6 am Abend wird den Anteil des SWS und der SWA in der folgenden Nacht erhöhen

Grundlage dieser Hypothese ist vor allem die Arbeit von Späth-Schwalbe et al. aus dem Jahr 1998 (s. Abschnitt 1.3.3), bei der die systemische Gabe von IL-6 den Anteil des SWS in der zweiten Nachthälfte erhöhte. Bereits hier wurde vermutet, dass es sich dabei um einen zentralen Effekt des IL-6 handeln könnte. Es wird davon ausgegangen, dass durch die intranasale Gabe von IL-6 die vermeintlich zentralnervöse Wirkung deutlicher ausgeprägt sein wird. Der SWS wird anhand der polysomnographischen Daten beurteilt.

Bei der SWA (0,5-4Hz) handelt es sich um die Hauptoszillationsfrequenz des Tiefschlafs. Die Leistung des SWA wird durch die EEG-FFT Analyse ermittelt. Späth-Schwalbe berechnete die SWA nicht gesondert. Es wird vermutet, dass es durch die intranasale Applikation und die dadurch vermutlich zentral vermittelte Wirkungsweise von IL-6 ebenfalls zu einer Zunahme der SWA kommen wird. Da bis jetzt aber keine Erkenntnisse über die Beeinflussung der SWA durch IL-6 vorliegen, gilt es, dies gesondert zu untersuchen. Ein differenzierter Einfluss von IL-6 auf SWS und SWA wäre möglich.

**Hypothese 2:** Die intranasale Gabe von IL-6 am Abend wird den Anteil von REM-Schlaf nicht erniedrigen.

Diese Hypothese wird durch die Annahme begründet, dass zentral appliziertes IL-6 bei Ratten zu keiner Beeinflussung des REM-Schlafes führte (Hogan *et al.* 2003). Die beim Menschen beobachtete Abnahme des REM-Schlafes nach systemischer IL-6 Gabe (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) könnte somit ein durch erhöhtes Kortisol vermittelter Effekt sein (Born *et al.* 1989). Auch eine Zunahme des REM-Schlafes durch intranasal applizier-

tes IL-6 ist denkbar. Studien konnten zeigen, dass der lösliche IL-6-Rezeptor s-IL-6-R eine erhöhte Verfügbarkeit in der zweiten Nachthälfte hat, eine erhöhte Kapazität für Transsignaling besteht und diese positiv mit dem REM-Schlaf korreliert (Dimitrov *et al.* 2006). Auch an Ratten konnte eine Assoziation zwischen dem IL-6-Transsignaling und dem Anteil von REM-Schlaf nachgewiesen werden (May *et al.* 2009).

**Hypothese 3:** Intranasal appliziertes IL-6 wird die Schlafeffizienz erhöhen.

Schlafeffizienz ist definiert als das Verhältnis der Schlafdauer zu der Bettliegezeit. Hierzu liegt eine uneinheitliche Studienlage vor. IL-6 moduliert Schlaf und ruft Schläfrigkeit hervor, ob aber die Effizienz verbessert wird, gilt es zu prüfen. Eine Studie, die die Wirkungen von erhöhtem endogenen IL-6 beobachtet hat, beschreibt eine negative Beeinflussung der Schlafeffizienz (Hong *et al.* 2005). Da bei dieser Studie das zentrale Wirkungsspektrum von exogen-applizierten IL-6 untersucht wird, und es von einer schlafinduzierenden zentralen Wirkung des IL-6 (Hypothese 1 und 2) ausgegangen wird, ergibt sich die Annahme einer gesteigerten Schlafeffizienz.

**Hypothese 4:** Der periphere IL-6-Spiegel und die peripheren IL-6-Wirkungen werden sich nach intranasaler Applikation nicht signifikant von der Placebobedingung unterscheiden. Es wird zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die periphere Kortisolkonzentration kommen.

Diese Hypothese ergibt sich durch den intranasalen Applikationsmodus von IL-6. Durch diesen erhoffen wir uns eine möglichst hohe zentrale Wirksamkeit ohne Induktion peripherer Mechanismen (s. Einleitung Kapitel 1.3.4). Es gilt zu prüfen, inwieweit es bei dieser Methode zu einem Übertritt des IL-6 in die Peripherie kommt. Hierzu werden die peripheren IL-6 Konzentrationen im Plasma gemessen. Durch Bestimmung der Kortisolkonzentration im Serum kann eine Aussage über das Ausmaß der HPA-Achsen-Aktivierung durch das intranasal applizierte IL-6 getroffen werden. So ergeben sich genauere Aussagen zu peripheren und zentralen IL-6-Wirkungen.

Insgesamt gilt es den Einfluss des Zytokins IL-6 auf die zentralnervöse Schlafregulation des Menschen nachzuweisen. Die gemeinsame Betrachtung der Wirkung von intranasal

verabreichtem IL-6 auf die hirnelektrische und die systemische Aktivität soll hierüber Aufschluss geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchspersonen

An dieser Doppelblindstudie nahmen insgesamt 17 männliche Probanden im Alter von 20 bis 36 Jahren teil. Das Durchschnittsalter betrug  $25,4 \pm 1,1$  Jahre. Alle waren gesunde Nichtraucher ohne regelmäßige Medikamenteneinnahme oder relevanter Vorerkrankungen und mit regelmäßigem Schlaf-Wach-Rhythmus mindestens sechs Wochen vor Beginn der Versuche. Das Körpergewicht der Testpersonen lag im idealen Bereich, zwischen  $19,85$  und  $25,17$  kg/m<sup>2</sup> bei einem mittleren Body Mass Index von  $22,3 \pm 0,4$  kg/m<sup>2</sup>. Weitere Grundvoraussetzungen wurden durch eine körperliche Voruntersuchung inklusive Blutentnahme eines Standardlabors (Blutbild, Elektrolyte, Glukose, Harnsäure, Kreatinin, Bilirubin, TSH, GOT, GPT, Gamma-GT, alkalische Phosphatase, LDH, CK, CK-MB und CRP) ermittelt.

In der Woche vor der ersten Versuchsnacht wurde zunächst eine Eingewöhnungsnacht unter Versuchsbedingungen mit Venenverweilkanüle und Kopf- und Gesichtselektroden zur polysomnographischen Aufzeichnung durchgeführt. Nur Probanden, bei denen die untersuchten Laborwerte und die durchgeführte Probenacht den Versuchskriterien entsprachen, wurden für die Studie zugelassen.

Alle Probanden willigten nach ausreichender Aufklärung über Versuchsablauf sowie mögliche Risiken schriftlich ein (s. Anhang).

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck genehmigt (s. Anhang).

### 2.2 Schlaflabor

Die Versuche wurden in den Räumlichkeiten des Institutes für Neuroendokrinologie der Universität zu Lübeck, Haus 23 A, durchgeführt.

Die Probanden schliefen in einem Raum, der durch eine Wandöffnung mit einem Vorraum verbunden ist. Durch die Wandöffnung verliefen der Infusionsschlauch und die EEG-Kabel, so dass nachts Blut in dem Vorraum entnommen werden konnte, ohne den Schlaf

des Probanden zu stören. Hier befand sich auch das EEG–Gerät zur Aufzeichnung der polysomnographischen Daten.

## 2.3 Versuchsablauf

Auf die Eingewöhnungsnacht folgten zwei Versuchs Nächte, einmal mit Substanzgabe, das andere Mal mit Placebogabe. Die Nacht dauerte jeweils von 17.30 Uhr bis 9.00 Uhr. Zwischen den Nächten war eine Pause von drei Wochen.

Die Probanden wurden aufgefordert, am Tag des Versuches zwischen 7.00 und 8.00 Uhr aufzustehen, nach dem Frühstück kein Koffein mehr zu sich zu nehmen und gegen 12.00 Uhr die letzte Mahlzeit einzunehmen.

Im Überblick verlief die Versuchsnacht wie folgt:

17.30	Ankunft Proband, Einnahme Abendessen
18.00	Fixierung von EEG-Elektroden und Venenverweilkanüle
19.30	erste Blutentnahme 0A, Gedächtnistests
21.15	zweite Blutentnahme 0B, Substanzgabe
21.30	Blutentnahme 1-10 und orale Temperaturmessung alle fünf Minuten
22.20	Blutentnahme 12-13 und orale Temperaturmessung alle zwanzig Minuten
23.00	Licht aus, alle dreißig Minuten Blutentnahmen 14-28
06.30	Wecken, sofern nicht REM
07.00	Blutentnahme 30 (30 min nach dem Wecken)
07.15	Blutentnahme 31 (45 min nach dem Wecken)
Ab 08.00	Abfrage der Gedächtnistests

**Tab. 1 Zeitlicher Versuchsablauf**

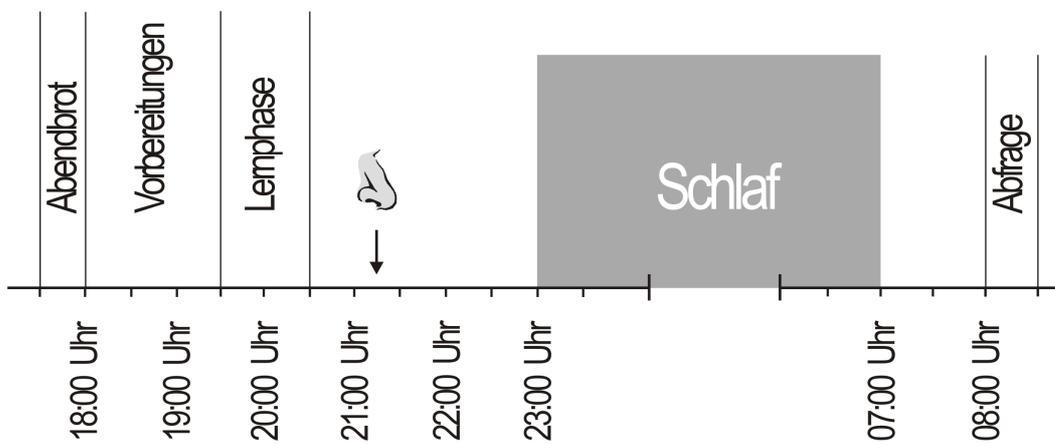
Die Probanden erschienen um 17.30 Uhr im Schlaflabor und nahmen ein standardisiertes Abendessen, bestehend aus drei Scheiben Vollkornbrot, vier Scheiben Wurst, vier Scheiben Käse, einem mageren Streichkäse, 20g Diätmargarine, einer Tomate, Tee und Süßstoff, ein. Die Probanden sollten solange Essen, bis ihr Hunger gestillt war. Danach wurden die Elektroden fixiert und der venöse Zugang gelegt. Um 19.30 Uhr wurde die erste Blutentnahme 0A vorgenommen. Darauf folgten die Gedächtnistests, die bis ca. 21.00 Uhr andauerten.

Nach der zweiten Blutentnahme 0B und erstmaliger sublingualer Temperaturmessung wurde um 21.10 Uhr mit der intranasalen Substanzgabe begonnen. In halbminütigen Abständen inhalierten die Versuchspersonen 0,1 ml Hübe des IL-6 oder des Placebo, bis insgesamt 2 ml verbraucht waren. Das IL-6 für die Lösung wurde unter Benutzung rekombinanter DNA-Techniken in *Escheria Coli* produziert und dann gesäubert. Die Lipopolysaccharid-(LPS-)Konzentration lag bei 0,036 ng/kg der applizierten IL-6-Dosis. Zirkulierende LPS haben dosisabhängig Einfluss auf die Schlafarchitektur, wobei die geringste wirksame Dosis 0,2 ng/kg KG beträgt (Mullington *et al.* 2000). Berücksichtigt man, dass über die intranasale Applikation einiges der Substanz verloren geht, dürfte es zu keiner Beeinflussung durch die LPS gekommen sein. Die Lösung setzte sich aus 0,8 mg IL-6 verdünnt in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS [L1825], <http://www.biochrom.de>) zusammen. Das Placebo bestand aus 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines Zerstäubers appliziert, der eine gute Anreicherung der Nasenschleimhäute gewährte.

Zwischen 21.30 Uhr und 22.20 Uhr wurde alle fünf Minuten sublingual die Temperatur gemessen sowie Blut in den vier Röhrchen entnommen (s.u.). Zusätzlich wurde alle zehn Minuten die Schläfrigkeit des Probanden anhand der Stanford Sleepiness Scale bewertet (MacLean *et al.* 1992). Hierzu beurteilt der Proband mit Hilfe einer Skala mit acht verschiedenen Müdigkeitsstufen seinen Zustand. Dieses Procedere wurde nochmals um 22.20 und 23.00 Uhr vor dem Licht löschen durchgeführt.

Von 23.00 Uhr bis 7.00 Uhr des nächsten Tages dauerte die Versuchsnacht, wobei halbstündlich Blutentnahmen erfolgten (s.o.). Bei insgesamt 5 Probanden, die an Nachversuchen teilnahmen, erfolgten in diesem Zeitraum nur stündliche Blutentnahmen. Um aber gleiche Versuchsbedingungen nachzuahmen, wurde das Abnahmesystem zu den anderen regulären Zeitpunkten (jeweils 30 min später) mit Kochsalzlösung gespült. Ab 6.30 Uhr wurden die Probanden geweckt, sobald sie sich in einer NREM-Phase befanden. Jeweils eine halbe und eine dreiviertel Stunde nach dem Wecken wurde das letzte Mal Blut

entnommen. In der Zwischenzeit wurden Elektroden und venöser Zugang entfernt. Im Anschluss erfolgte die Abfrage der Gedächtnistests in selber Reihenfolge wie am Vorabend. Zusätzlich wurden der Regensburger Wortflüssigkeitstest (Aschenbrenner S. *et al.* 2000) durchgeführt. Es handelt sich dabei um die deutsche Abwandlung des von Christensen und Guilford entwickelten Originaltests (Christensen & Guilford 1958). Ferner wurde der Digit Span durchgeführt, um eventuelle Änderungen der Abfrageleistung zu bemerken (de Quervain *et al.* 2000).



**Abb. 3 Schematische Anordnung des Versuchsablaufs**

## 2.4 EEG und polysomnographische Aufzeichnung

Die EEG-Elektroden wurden entlang der Mittellinie über frontale, zentrale und parietale Anteile des Cortex (Fz, Cz, Pz), sowie an den entsprechenden lateralen Ableitstellen (F3, C3, P3 und F4, C4, P4) des 10:20 Systems appliziert und gegen eine Referenzelektrode an einem Nasenbein abgeleitet. Für die polysomnographische Aufzeichnung wurden weitere vier Elektroden für das EOG und zwei für das EMG verwendet. Das horizontale EOG wurde beidseits lateral der Orbitaländer (HEOG) und das vertikale links supra- und infraorbital (VEOG) abgeleitet. Mittig auf der Stirn war die Erdungselektrode platziert. Das

bipolare EMG wurde von den submentalen Muskeln registriert. Zusätzlich wurde die Herzfrequenz (Regelmäßigkeit der R-Zacken) mittels EKG aufgezeichnet.

Um gute Übergangswiderstände zu erzielen, wurden die betreffenden Hautareale zuerst mit Alkohol entfettet und dann durch eine Peelingpaste (Everi® Conductive and Abrasive Paste, spes medica) von überschüssigen Hautschuppen befreit. Die Elektroden wurden mit einer speziellen Elektrodenpaste (EC2® Genuine Grass Electrode Cream, Grass Technologies, West Warwick, USA) befestigt und zusätzlich mit Klebeband fixiert. So wurden Übergangswiderstände von unter 5 k $\Omega$  erreicht. Während des Schlafes wurden die Kabel gebündelt und mit Klebeband am Bett fixiert, so dass der Proband genügend Bewegungsfreiheit hatte.

Die EEG-, EOG-, EMG- und EKG-Signale wurden mit einem 32-Kanal-Elektroenzephalographen verstärkt (Nihon Kohden, Japan), analog-digital gewandelt (CED 1401, Cambridge Electronic Design Ltd. UK) und auf einem PC gespeichert. EEG, EOG und EMG wurden mit einer Empfindlichkeit von 10 $\mu$ V/V, 100  $\mu$ V/V bzw. 75  $\mu$ V/V abgeleitet. Hoch- bzw. Tiefpassfilter wurden für das EEG bei 0,03 und 35 Hz, für das EOG bei 0,03 und 35 Hz und für das EMG bei 1,59 und 120 Hz gesetzt. Die Abtastrate der Signale betrug 200 Hz.

## 2.5 Blutentnahmen und Parameterbestimmung

Die Blutentnahmen erfolgten über einen Venenverweilkatheter (BD Adyste Pro Vialon®, 18 GA, 1,3x45mm, 97ml/min) im Unterarm mit angeschlossenen Infusionsschlauchsystem, bestehend aus Infusionslösung (0,9% NaCl-Lösung), Infusionsbesteck (Original Infusomat-Leitung, 250 cm Länge, 20 ml, Braun, Melsungen), Dreiwegehahn (Discofix®, Braun, Melsungen), sowie einem Verlängerungsschlauch (Heidelberger Verlängerung, 150 cm Länge). Die Blutentnahmen fanden außerhalb des Schlafraumes statt, indem am Dreiwegehahn mit einer Spritze Blut aspiriert wurde. Nach der Entnahme wurde mit ca. 5 ml Kochsalzlösung nachgespült. Zwischen den Entnahmen wurde das Infusionssystem kontinuierlich mit langsam infundierter Kochsalzlösung gespült (ca. 250 ml/Nacht).

Bei einem Teil der Blutabnahmen (0A bis 13, sowie 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 30 und 31) wurden jeweils ein EDTA-(Kalium-Etylendiamintetraessigsäure-)Röhrchen, ein Serum-Röhrchen (Inhalt: Granulat, Gerinnungsaktivator), sowie ein Lithium-Heparin-Röhrchen und ein mit Natrium-Fluorid-beschichtetes Röhrchen entnommen. Bei den übrigen Entnahmen wurden nur die ersten beiden Röhrchen abgenommen.

Aus dem EDTA-Röhrchen wurden die Kortisol-, hGH-, Insulin- und Leptin-Werte bestimmt. Das Serum-Röhrchen diente zur Bestimmung von sgp130, s-IL-6-R, IL-6 und ACTH, das Natrium-Fluorid-Röhrchen für die Glukose-Werte und das Lithium-Heparin-Röhrchen zur CRP-Ermittlung.

Das entnommene Blut wurde sofort bei 4000U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand in acht verschiedene Eppendorfgefäße abpipettiert und bis zur Bestimmung bei -80°C gekühlt.

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 wurden mit einem standardisierten enzymgekoppelten Immunoassay bestimmt (mittlere minimale Nachweisgrenze (MDD): 0.16 pg/ml, intra- und interassay Variationskoeffizienten (VK): <9.6%; <http://www.rndsystems.com>). Die Serum-Kortisol-Konzentrationen wurde über Immunolite (MDD: 0.2 µg/dl, intra- und interassay VK: <10%; DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Germany; [www.dpc-biermann.de](http://www.dpc-biermann.de)) ermittelt und das CRP durch einen Latex Immunoassay (MDD: 0.1 mg/L; intra- und interassay VK: <3.6%; [www.sentinel diagnostics.com](http://www.sentinel diagnostics.com)). S-IL-6-R-Plasmakonzentrationen wurden via ELISA (MDD: 6.5 pg/ml, intra- und interassay VK: <3.6%; <http://www.rndsystems.com>) ermittelt und jeweils um 1 Uhr und 5 Uhr in randomisierten Untergruppen (n = 8) bestimmt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es in der zweiten Nachthälfte zu einem signifikanten Anstieg der s-IL-6-R-Plasmakonzentration kommt (Dimitrov *et al.* 2006).

## 2.6 Datenauswertung

- **Polysomnographie**

Die aufgezeichneten polysomnographischen Daten wurden nach den Standardkriterien von Rechtschaffen und Kales (Rechtschaffen & Kales 1968) eingeteilt in Wach, S1, S2, S3, S4, REM-Schlaf, sowie „Movement-Time“ MT. Der SWS wurde als in den Stadien S3 und S4 verbrachte Zeit definiert. Weiterhin wurden die Einschlaflatenz, die Gesamtschlafdauer, die Dauer der einzelnen Schlafstadien und die Latenz der einzelnen Schlafphasen in Bezug auf die Einschlafzeit, die auf 23.00 Uhr festgelegt wurde, ermittelt. Die prozentualen Anteile der einzelnen Schlafphasen wurden in Bezug zur gesamten Schlafzeit gesetzt. Außerdem wurde die Schlafeffizienz, festgesetzt als das Verhältnis der Schlafdauer zur Bettliegezeit  $[(\text{Gesamtschlafzeit} - \text{Wachheit nach Schlafbeginn}) / \text{Gesamtschlafzeit}]$ , berechnet.

- **EEG**

Für die Analyse des EEGs wurde die Fast-Fourier-Transformation (FFT) angewendet. Getrennt für beide Nachthälften wurden die durchschnittlichen Anteile von Slow Wave Activity (SWA), Spindelaktivität (niedrig: 8-12 Hz, hoch: 12-16Hz) und Theta-Aktivität (4-8 Hz) untersucht. Die FFT wurde für nachfolgende, nicht überlappende und artefaktfreie EEG-Abschnitte mit jeweils 2,048 Datenpunkten ( $\approx 20,45$  s; Auflösung = 0,04891) berechnet. Vor der Berechnung der einzelnen Leistungsspektren wurde auf jedem EEG-Abschnitt ein Hanning-Fenster angewendet. Hier interessiert insbesondere die an den Positionen der Mittellinie (Fz, Cz, Pz) gemessene Aktivität.

Die FFT ist ein Verfahren, um das EEG-Signal quantitativ zu erfassen. Dieses Verfahren, das auf einer diskreten Form der Fourier-Transformation beruht und sich schneller Algorithmen bedient, bezeichnet man als Spektralanalyse, wobei ein zeitlich definierter EEG-Abschnitt in seine einzelnen Frequenzkomponenten (Spektrum) zerlegt wird. Die Ergebnisse der FFT werden dann als sogenanntes Leistungsspektrum präsentiert. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Amplitudenspektren gezeigt, welche die Verteilung der Leistungsamplituden für die einzelnen Frequenzen veranschaulicht. Grundlage der FFT ist die Annahme, dass man den Signalabschnitt in einzelne Sinus- und Kosinus-Schwingungen unterschiedlicher Frequenz zerlegen kann.

## 2.7 Statistik

Der statistische Vergleich der EEGs, der Serumkonzentrationen von IL-6, s-IL-6-R und des Plamakortisols zwischen IL-6 und dem Placebo erfolgte mit der Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) mit Messwiederholungen für die Faktoren „Bedingung“ (IL-6 und Placebo) und, wo angebracht, auch mit dem Faktor „Zeit“. Paarweise Vergleiche wurden bei signifikanten Effekten mit Hilfe des t-Tests durchgeführt.

Bei den polysomnographischen Daten wurden die Unterschiede zwischen IL-6 und Placebo mit einem nichtparametrischen statistischen Test untersucht (Wilcoxon-Rangsummentest).

Die EEG-Aufzeichnungen von drei Versuchsteilnehmern wurden wegen zu starker Artefakte oder technischer Probleme ausgeschlossen. Wegen der begrenzten Blutmenge konnten nicht von allen Probanden alle Parameter komplett bestimmt werden. Eine vollständige Analyse der hormonellen Parameter erfolgte nur bei 12 Probanden.

Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als signifikant anerkannt. Alle Ergebnisse liegen als Mittelwert und als Standardfehler des Mittelwerts vor.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Polysomnographie

Die Versuchspersonen schliefen nach IL-6-Gabe durchschnittlich  $440 \pm 5,7$  Minuten und nach Placebogabe  $442,6 \pm 4,5$  Minuten. In Tabelle 1 sind die Resultate der Schlafparameter beider Gruppen (Latenzen und in verschiedenen Schlafstadien verbrachte Zeit) für die ganze Nacht dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede am Anteil des REM-Schlafes in den beiden Versuchsbedingungen.

Aufgezeigt sind hier die Gesamtzeit im Bett, Gesamtschlafzeit, Schlafeffizienz, Zeit bis zum Schlafbeginn (nach dem Licht löschen), Latenz bis zum ersten SWS (Summe von Schlafstadium 3 und 4). Außerdem sind die im REM-Schlaf und in Schlafstadium 1, 2, SWS verbrachte Zeit in Minuten und als prozentualer Anteil der Gesamtschlafzeit erfasst. Die Minuten für SWS und REM-Schlaf wurden auch separat für die erste und zweite Nachthälfte angegeben.

Die Schlafdaten sind für die IL-6-Kondition (0,8 mg IL-6, intranasal appliziert um 21.15 Uhr) und für die Placebo-Kondition als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. \* steht für P-Werte  $< 0,05$ . So werden signifikante Werte im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe angezeigt.

Wiederholte ANOVA-Messungen mit den Faktoren „Bedingung“ (IL-6/Placebo) und „Zeit“ (1. Und 2. Nachthälfte) konnten keine signifikanten Effekte auf einzelne Schlafstadien nachweisen ( $P > 0,28$  für alle Vergleiche). Für die erste Nachthälfte zeigten sich zwar große zeitliche Variationen für die SWS-Dauer, doch es herrschte keine signifikante Interaktion zwischen den beiden Bedingungen und den Nachthälften. Während der zweiten Nachthälfte konnte ein verstärkender Einfluss von IL-6 nachgewiesen werden: es kam wie vermutet zu einer signifikanten Zunahme der in SWS verbrachten Zeit ( $P < 0,035$ , Wilcoxon-Rangsummentest, einseitig).

#### Schlafeffizienz

Für die IL-6-Bedingung konnte eine erhöhte Schlafeffizienz nach dem Schlafeintritt ( $+1,6 \pm 0,7$  %;  $P < 0,02$ ; Wilcoxon-Rangsummentest, zweiseitig, s. Tabelle 1) ermittelt werden, da die Probanden signifikant weniger wach waren ( $-6,75 \pm 3,39$  min;  $P < 0,02$ ). Für die Ge-

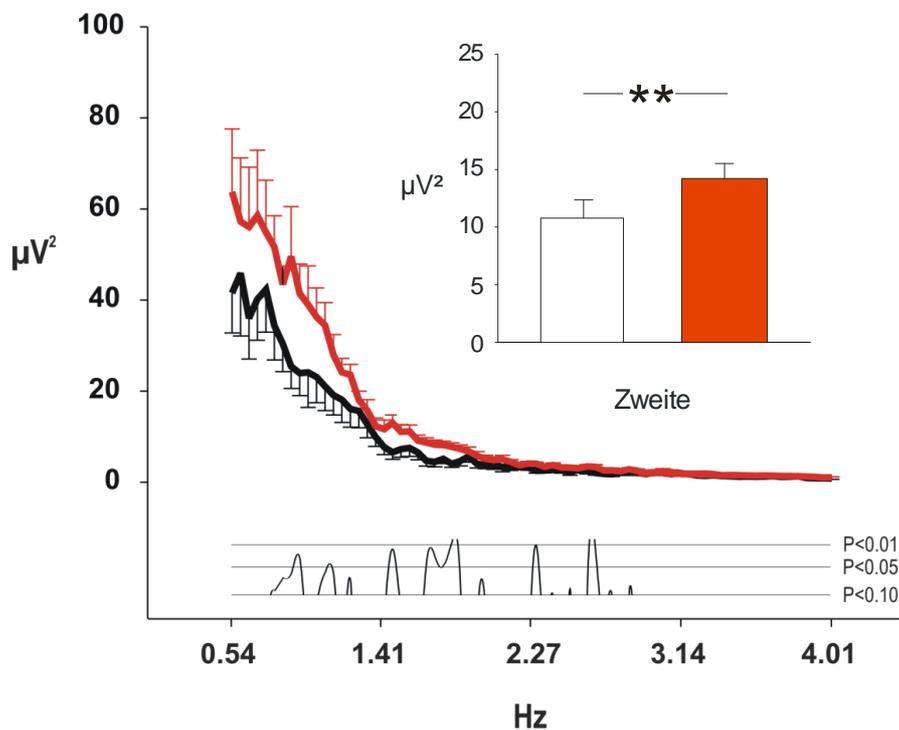
samtschlafzeit und den Zeitraum bis zum Schlafbeginn stellte sich zwischen beiden Bedingungen kein wesentlicher Unterschied dar.

Parameter	IL-6	Placebo
Gesamtzeit im Bett (min)	458,4 ± 2,5	462,1 ± 2,9
Gesamtschlafzeit (min)	440,0 ± 5,7	442,6 ± 4,5
Schlafeffizienz (%)	99,1 ± 0,3	* 97,6 ± 0,9
Schlafbeginn (min)	18,4 ± 5,5	19,5 ± 5,8
SWS Latenz (min)	28,2 ± 10,8	24,4 ± 8,1
REM Latenz (min)	109,6 ± 12,4	92,8 ± 5,3
<b>Zeitdauer der Schlafstadien in min</b>	IL-6	Placebo
Wach	3,6 ± 1,6	* 10,4 ± 3,8
Schlafstadium 1	50,7 ± 9,5	46,7 ± 7,4
Schlafstadium 2	235,0 ± 8,5	239,4 ± 8,7
SWS	65,6 ± 7,5	58,1 ± 8,5
SWS erste Nachthälfte	50,9 ± 6,3	50,5 ± 7,6
SWS zweite Nachthälfte	14,6 ± 3,6	* 7,6 ± 1,9
REM	83,5 ± 5,3	86,2 ± 6,6
REM erste Nachthälfte	23,5 ± 2,6	24,0 ± 3,5
REM zweite Nachthälfte	60,0 ± 5,7	62,1 ± 5,1
<b>Zeitdauer der Schlafstadien in Prozent der Gesamt-</b>		
Wach	0,7 ± 0,3	2,0 ± 0,9
Schlafstadium 1	12,6 ± 2,7	12,6 ± 2,9
Schlafstadium 2	51,8 ± 2,0	52,0 ± 1,9
SWS	14,7 ± 1,7	12,9 ± 1,8
REM	19,7 ± 1,4	20,0 ± 1,7

**Tab. 2 Polysomnographische Charakteristika**

### 3.2 Leistungsspektren des Elektroenzephalogramms

Die Analyse des EEGs mittels FFT ergab, dass der Anteil der SWA (Leistung in dem 0,5-4 Hz-Band) generell bei beiden Bedingungen in der ersten Nachthälfte höher war als in der zweiten ( $P < 0,03$  für den Nachthälften-Haupteffekt). Es zeigte sich aber, dass es nur unter IL-6-Applikation zu einem signifikanten Anstieg der SWA in der zweiten Nachthälfte kam (IL-6 vs. Placebo:  $+3,51 \pm 1,19 \mu\text{V}^2$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,02$  für die IL-6/Placebo- x Nachthälften-Interaktion; s. Abbildung 4). In der ersten Nachthälfte hingegen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden in der SWA (IL-6 vs. Placebo:  $0,00 \pm 0,66 \mu\text{V}^2$ ,  $P > 0,99$ ). Das Leistungsspektrum über die gesamte Nacht für die Frequenzen bis 30 Hz ist zum Vergleich in Abbildung 5 dargestellt.



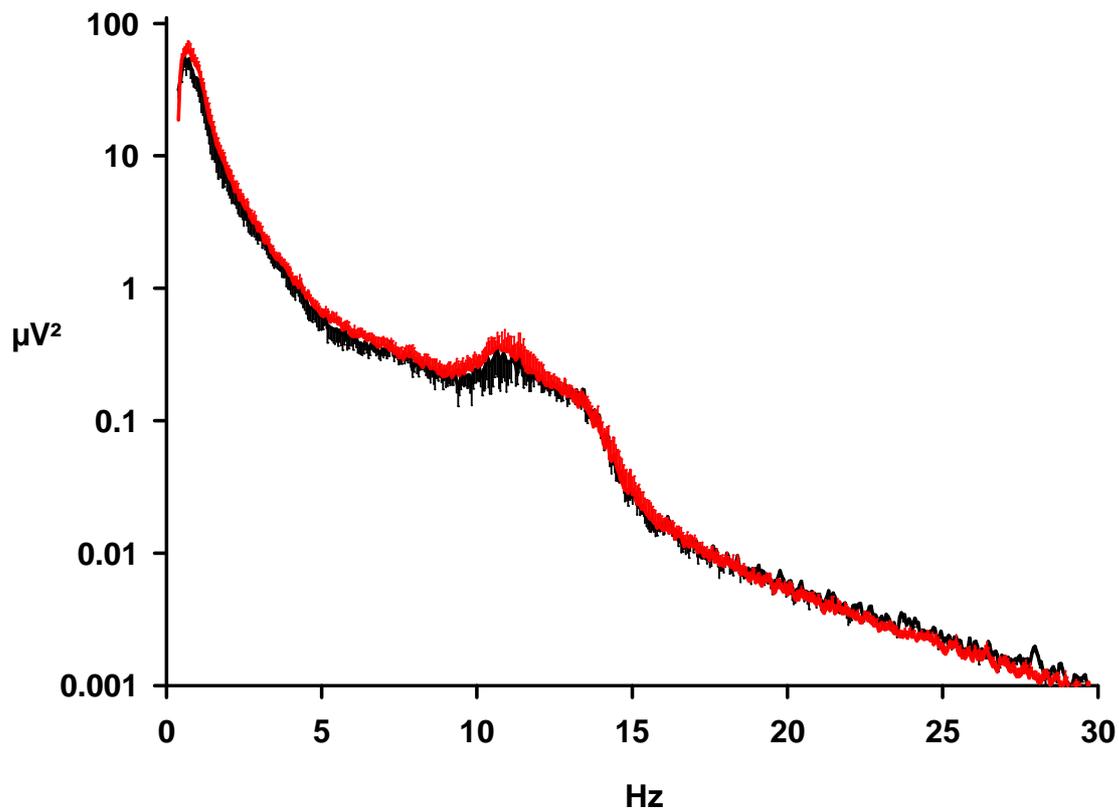
**Abb. 4 EEG-Leistung der Slow Wave Activity (SWA; 0,5-4 Hz) für die 2. Nachthälfte an Fz**

Leistungsspektrum (Mittelwert und Standardfehler) innerhalb des Frequenzbereiches der SWA. Die entsprechenden Signifikanzniveaus für den paarweisen Vergleich zwischen der IL-6- (rote Linie) und der Placebobedingung (schwarze Linie) sind unten angegeben (t-Test für verbundene Stichproben, zweiseitig)

**Einschub** Mittlere EEG-Leistung und Standardfehler von 0,5-4 Hz für die 2. Nachthälfte an Fz. Die Sternchen kennzeichnen den signifikanten Unterschied (\*\*  $P < 0.01$  (t-Test für verbundenene Stichproben)) zwischen den zwei Bedingungen (IL-6: rot, Placebo: weiss).

Das niederfrequente Spindelband (8-12 Hz), welches frontal am stärksten ausgeprägt ist, wurde an Fz für beide Bedingungen für die jeweils erste und zweite Nachthälfte getrennt untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen (Fz: IL-6 vs. Placebo, erste Nachthälfte:  $0,29 \pm 0,05$  vs.  $0,28 \pm 0,06 \mu V^2$ ; zweite Nachthälfte:  $0,22 \pm 0,04$  vs.  $0,19 \pm 0,04 \mu V^2$ ;  $P > 0,21$  für alle Vergleiche, s. Abb. 5). Auch für das hochfrequente Spindelband (12-16 Hz), das posterior am stärksten ausgeprägt ist und an Pz untersucht wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede demonstriert werden (Pz: IL-6 vs. Placebo, erste Nachthälfte:  $0,15 \pm 0,02$  vs.  $0,16 \pm 0,03 \mu V^2$ ; zweite Nachthälfte:  $0,15 \pm 0,03$  vs.  $0,15 \pm 0,04 \mu V^2$ ;  $P > 0,56$  für alle Vergleiche). Ferner wurde auch im Theta-Frequenzband (5-9 Hz) kein Unterschied durch IL-6-Gabe beobachtet (Pz: IL-6 vs. Placebo, erste Nachthälfte:  $0,15 \pm 0,02$  vs.  $0,16 \pm 0,03 \mu V^2$ ; zweite Nachthälfte:  $0,15 \pm 0,03$  vs.  $0,15 \pm 0,04 \mu V^2$ ;  $P > 0,56$  für alle Vergleiche).

Somit ergibt sich als Hauptbefund der EEG-Auswertungen, dass durch IL-6 eine signifikante Zunahme der SWA innerhalb der zweiten Nachthälfte entsteht.

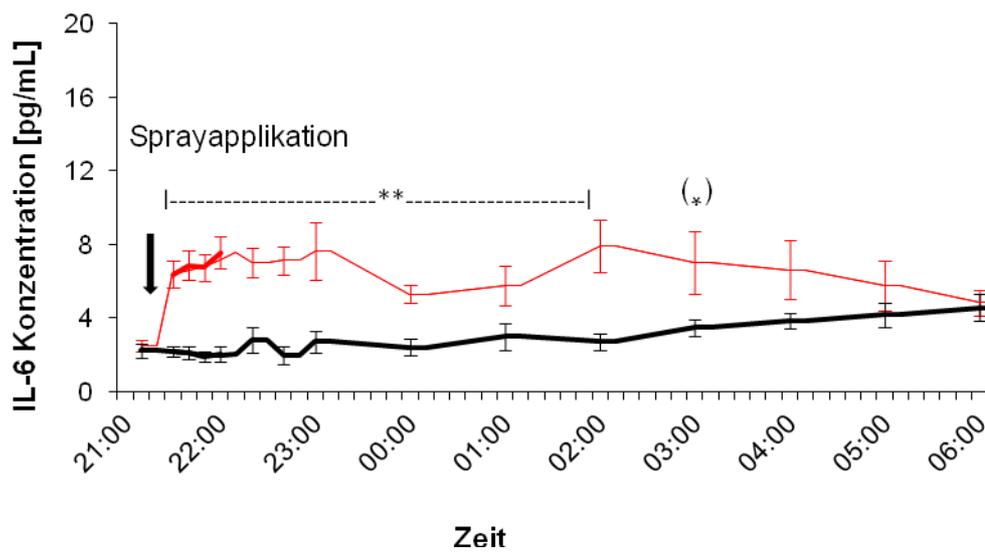


**Abb. 5 EEG-Leistungsspektrum (Mittelwert und Standardfehler) für die gesamte Nacht an Fz (IL-6: rot, Placebo: schwarz)**

### 3.3 IL-6 und Kortisol

#### 3.3.1 Plasmakonzentrationen von IL-6 und s-IL-6-R

Nach intranasaler IL-6-Gabe zeigte sich in der ANOVA ein Anstieg der IL-6-Serumkonzentration, vor allem in der ersten Nachthälfte ( $P < 0,02$  für die Interaktion IL-6/Placebo x Zeit; siehe Abbildung 6).

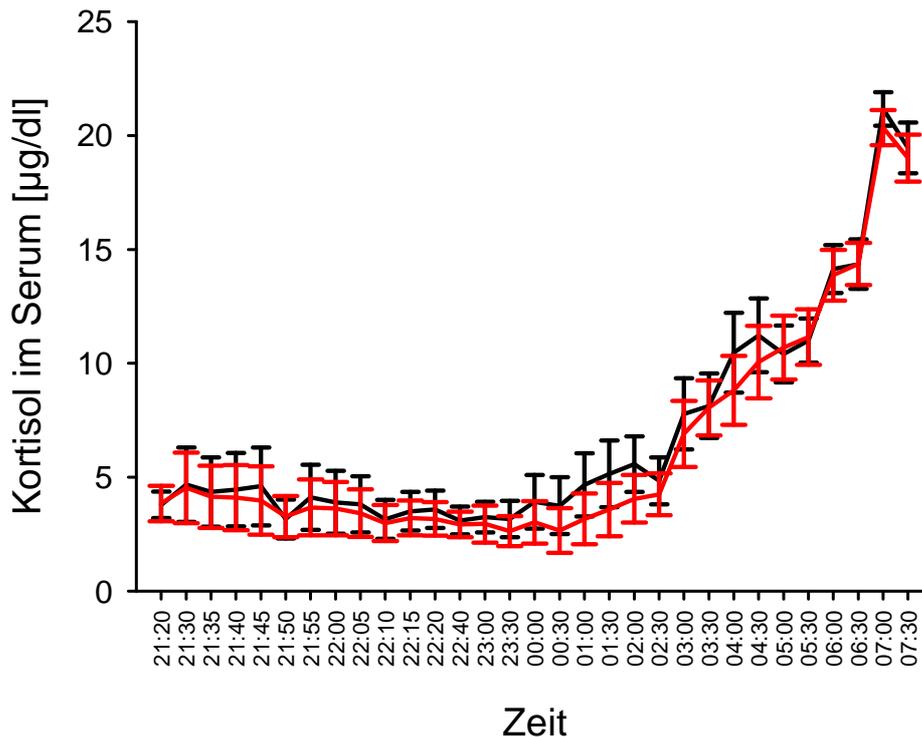


**Abb. 6 Plasmakonzentration von IL-6** vor intranasaler Applikation von Placebo- (schwarz) vs. Interleukin-6- (rot) Gabe und nächtlicher Verlauf

Der s-IL-6-R wies bei beiden Konditionen während der zweiten Nachthälfte höhere Konzentrationen auf (1Uhr – 1. Nachthälfte:  $35,93 \pm 3,63$  ng/ml; 5 Uhr - 2. Nachthälfte:  $38,67 \pm 4,15$  ng/ml,  $P < 0,05$ ), aber nicht spezifisch für eine der Bedingungen ( $P > 0,32$  für die jeweilige Interaktion IL-6/Placebo x Zeit).

### 3.3.2 Serumkonzentrationen von Kortisol

Für die Serumkonzentration von Kortisol konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Substanz- und Placebogabe aufgezeigt werden (vor Schlaf: IL-6:  $3,94 \pm 1,25$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; Placebo:  $3,96 \pm 1,15$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ , während Schlaf: IL-6:  $9,02 \pm 0,66$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; Placebo:  $8,25 \pm 0,89$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ;  $P > 0,27$  bei allen Vergleichen).



**Abb. 7 Serumkonzentration von Kortisol** vor intranasaler IL-6 Gabe um 21.15 Uhr und nächtlicher Verlauf für IL-6- (rot) vs. Placebobedingung (schwarz)

#### Ergänzende Befunde

Weder CRP noch die Körpertemperatur unterschieden sich signifikant zwischen IL-6 und Placebo ( $P > 0,05$ ). Genauere Angaben hierzu befinden sich in der Inauguraldissertation von V. Ulrich.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist, das Zusammenspiel von IL-6 und Schlaf tiefergehend zu untersuchen. Dabei wird durch die gewählte intranasale Applikationsform versucht, zentrale Effekte des IL-6 von peripheren genauer abzugrenzen und vor allem die Auswirkungen auf die hirnelektrische Aktivität zu untersuchen. Die wesentlichen Hypothesen dieser Arbeit sind (s.1.4), dass es nach intranasaler Applikation von IL-6 zu einer Zunahme des SWS und SWA in der zweiten Nachthälfte kommt (Hypothese 1) und dass der REM-Schlaf dadurch unbeeinflusst bleibt bzw. zunimmt (Hypothese 2). Weiterhin wurde postuliert, dass sich die Schlafeffizienz durch die IL-6-Applikation verbessern wird (Hypothese 3). Durch die intranasale Applikation des IL-6 werden sich die peripheren IL-6-Spiegel und die peripheren IL-6-Wirkungen nicht signifikant von der Placebobedingung unterscheiden und es wird zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die periphere Kortisolkonzentration kommen (Hypothese 4).

Diese Hypothesen werden im Folgenden im Licht der gewonnenen experimentellen Ergebnisse und der Literatur kritisch evaluiert und eingeordnet.

### 4.1 IL-6 erhöht den SWS und die SWA in der zweiten Nachthälfte (Hypothese 1)

Nach Hypothese 1 ruft die intranasale Gabe von IL-6 am Abend eine Zunahme des Anteils von SWS und der SWA in der zweiten Nachthälfte hervor.

Zu dieser Annahme führte uns zum einen die Arbeit von Späth-Schwalbe (Späth-Schwalbe *et al.* 1998), in der nach subkutaner IL-6 Applikation eine Zunahme des SWS in der zweiten Nachthälfte beobachtet wurde. Weiterhin konnte nach intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation von IL-6 bei Ratten (Hogan *et al.* 2003) innerhalb der ersten drei Stunden nach Injektion eine Zunahme des SWS beobachtet werden.

Es liegen auch Arbeiten vor, die einen negativen Einfluss von IL-6 auf den Schlaf festgestellt haben (Hong *et al.* 2005; Mills *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2011). Es wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten endogenen IL-6 Konzentration und einer Abnahme des SWS (Thomas *et al.* 2011; Vgontzas *et al.* 1999) gesehen. May (May *et al.* 2009) konnte nach Hyper-IL-6-Gabe (löst künstlich Transsignaling aus) keinen Einfluss auf den NREM-Schlaf beobachten.

Die von uns vermuteten Effekte des IL-6 bestätigten sich, denn es kam nach intranasaler Applikation zu einer signifikanten Zunahme des SWS und der SWA in der zweiten Nachthälfte. Dieses Ergebnis weist deutlich daraufhin, dass die direkte Modulation der Schlafarchitektur ein zentraler Wirkmechanismus des IL-6 ist. Die nach subkutaner Gabe von IL-6 beobachtete Umverteilung des SWS von der ersten in die zweite Nachthälfte (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) konnte nach intranasaler Gabe nicht beobachtet werden und scheint somit am ehesten ein peripherer Effekt des IL-6 zu sein. Es scheint unwahrscheinlich, dass die Umverteilung des SWS eine direkte Wirkung von peripher erhöhten IL-6-Konzentrationen ist, da bei unserer Arbeit erhöhte Plasmaspiegel von IL-6 nach intranasaler Gabe zu verzeichnen waren und wir keine Umverteilung des SWS feststellen konnten. Die periphere Kortisolkonzentration im Serum wurde nach intranasaler Applikation von IL-6 aber während der gesamten Nacht nie beeinflusst. Im Fall subkutaner Applikation, hingegen, nahm sie in der ersten Nachthälfte deutlich zu. Es ist also davon auszugehen, dass die von Späth-Schwalbe und Mitarbeitern beobachtete Umverteilung des SWS am ehesten als ein durch erhöhtes Kortisol vermittelter Effekt einzuordnen ist.

Generell passen unsere Erkenntnisse auch zu den Ergebnissen von Hogan (Hogan *et al.* 2003), die bei direkter zentraler (intracerebroventrikuläre (i.c.v.)) Applikation von IL-6 bei Ratten innerhalb der ersten drei Stunden nach Injektion eine Zunahme des SWS dokumentieren. Allerdings wurde hier nach dem initialen Anstieg ein Abfall des SWS beobachtet. Unsere Daten konnten den SWS-Anstieg erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Applikation nachweisen. Dies könnte auf Unterschiede zwischen intranasaler und intracerebroventrikulärer (i.c.v.) Applikation hinweisen. Die i.c.v. Applikation kann direkt zentral wirken, während bei der hier verwendeten Methode die Moleküle intra- und extraneuronal in das ZNS befördert werden müssen. Gerade der länger andauernde extraneuronale Transport (s.1.3.4) könnte somit verlängert hohe zentrale IL-6-Konzentrationen aufrechterhalten und somit die beobachtete Abnahme des SWS verhindern.

Zum Einfluss von IL-6 auf die SWA liegen noch keine separaten Erkenntnisse vor. Die SWA entspricht der Hauptoszillationsfrequenz während des SWS und liegt in einem Bereich zwischen 0,5 und 4 Hz. Als Hauptoszillationsfrequenz des SWS ist die SWA somit für gewöhnlich während der ersten Nachthälfte erhöht, was auch mit unseren Ergebnissen für beide Bedingungen übereinstimmt. Durch unsere Ergebnisse konnte erstmalig eine deutliche Zunahme der SWA in der zweiten Nachthälfte nach intranasaler Applikation IL-6 beschrieben werden. Diese Daten sprechen ebenfalls für einen zentral vermittelten schlaffördernden Effekt des IL-6.

Durch unsere Ergebnisse werden die Aussagen von Thomas (Thomas *et al.* 2011), die eine negative Korrelation zwischen erhöhter abendlicher IL-6-Expression und SWS beschrieben, entkräftet. Der Versuchsaufbau seiner Arbeit unterscheidet sich allerdings von dem dieser Arbeit. Es wurde zum einen kein exogenes IL-6 appliziert, sondern die abendliche IL-6 Expression der Monozyten nach Lipopolysaccharid-Zugabe in Bezug zur Schlafarchitektur gesetzt. Es wurden auch keine 30-minütigen Blutentnahmen durchgeführt, sondern lediglich abends vor dem Schlaf und am Morgen nach dem Schlaf. Ob es sich bei den Ergebnissen der Arbeit um zentrale Effekte von IL-6 auf die Schlafarchitektur handelt, ist unter den Versuchsbedingungen eher schwierig zu beurteilen. Vgontzas (Vgontzas *et al.* 1999) beobachtete mehr SWS nach Schlafentzug und setzte diese Tatsache ins Verhältnis zu den Änderungen der IL-6 Sekretion. Es kam durch den Schlafentzug zu keiner Zunahme der Gesamtmenge von IL-6, aber tagsüber erhöhten sich die Werte und nachts flachten sie ab. Dabei kam es zu einer Zunahme des SWS, woraus geschlossen wurde, dass eine niedrige nächtliche IL-6-Konzentration für einen verbesserten Schlaf durch eine Zunahme des SWS ursächlich ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen zwar, dass ein Einfluss von IL-6 und dessen Sekretionsmuster auf die Schlafarchitektur besteht, aber es kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Auswirkungen eine erhöhte Gesamtmenge von IL-6 auf den Schlaf hat. Bei dieser Arbeit resultierte eine Zunahme des SWS-Anteils durch eine exogene Erhöhung der Gesamtkonzentration von IL-6.

Als eine Erklärungsmöglichkeit, wie das IL-6 den SWS/SWA-Anstieg vermitteln kann, könnte folgende Hypothese in Betracht gezogen werden. Man könnte den SWS/SWA-Anstieg mit dem s-IL-6-R-Anstieg in der zweiten Nachthälfte in Verbindung setzen. Es konnte bereits bei Untersuchungen an Astrozyten des Rattenhirns gezeigt werden, dass diese nur in Anwesenheit von s-IL-6-R oder Hyper-IL-6 sensibel für IL-6 sind (März *et al.* 1999). Weiterhin konnte Schöbitz bei Ratten (Schöbitz *et al.* 1995) verstärkte und verlängerte Wirkungen von zentral appliziertem IL-6 im Beisein von s-IL-6-R nachweisen. Diese Fakten verdeutlichen, dass IL-6, um im Hirn wirksam zu sein, vom Transsignaling abhängig ist. Somit ist auch trotz induzierter IL-6-Zunahme eine zentrale Wirkung von IL-6 via klassischer Signaltransduktion am membrangebundenen Rezeptor während der ersten Nachthälfte unwahrscheinlich. Da es in der zweiten Nachthälfte zu einer Zunahme des s-IL-6-R kommt (Dimitrov *et al.* 2006), die wir auch für beide Bedingungen darstellen konnten, und somit auch des Transsignalings (Dimitrov *et al.* 2006; Rose-John 2003), kann es bei der IL-6-Bedingung durch die erhöhte zentrale IL-6-Konzentration über eine erhöhte Transsignalingkapazität zu der Zunahme der SWA kommen. Dieser Ansatz bleibt rein

spekulativ, da eine invasive Untersuchung des menschlichen Gehirns auf Neuronen- oder Rezeptorebene allein aus ethischen Gründen im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht möglich ist. Mit den hier eingesetzten objektiven Untersuchungsmethoden wie polysomnographischer Aufzeichnungen und Blutuntersuchungen ergibt sich eine Zunahme des SWS und der SWA als Folge einer zentralen Wirkweise von IL-6.

## 4.2 IL-6-Applikation führt zur Abnahme des REM-Schlafes (Hypothese 2)

Bezüglich des REM-Schlafes wurde im Vorfeld postuliert, dass es durch intranasal appliziertes IL-6 zu keiner Abnahme des REM-Schlafes kommt.

Aufgrund der Studienlage und unseres Versuchsaufbaus schien eine Abnahme des REM-Schlafes durch intranasal appliziertes IL-6 unwahrscheinlich, da wir von einer zentralen Wirkweise des IL-6 ausgingen und davon, dass die beim Menschen beobachtete Abnahme des REM-Schlafes nach systemischer IL-6-Gabe (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) ein durch erhöhtes Kortisol vermittelter Effekt ist (Born *et al.* 1989). Somit kann der REM-Schlaf durch intranasal appliziertes IL-6 unbeeinflusst bleiben oder zunehmen. Zentral appliziertes (i.c.v.) IL-6 führte bei Ratten zu keiner Beeinflussung des REM-Schlafes (Hogan *et al.* 2003). Für eine Zunahme des REM-Schlafes spricht zum einen die Studie von Dimitrov (Dimitrov *et al.* 2006), die eine erhöhte Verfügbarkeit des löslichen IL-6-Rezeptors s-IL-6-R und der Transsignalingkapazität in der zweiten Nachthälfte beschreibt, die positiv mit dem REM-Schlaf korreliert, und zum anderen die Arbeit von May (May *et al.* 2009), die eine Zunahme des REM-Schlafes nach Hyper-IL-6-Gabe belegt.

Arbeiten, die IL-6 einen schlafstörenden Effekt nachsagen (Hong *et al.* 2005; Mills *et al.* 2007), beschreiben bei endogen erhöhtem IL-6 eine Zunahme der REM-Latenz.

Die Auswertung der Daten erbrachte, dass der Anteil des REM-Schlafes in beiden Versuchsbedingungen auch für die jeweiligen Nachthälften vergleichbar ist. Auch die genauere Untersuchung des Leistungsspektrums weist keine signifikanten Unterschiede der parietalen Theta-Aktivität während des REM-Schlafes auf. Ferner kam es zu keiner Zunahme der REM-Latenz.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Hogan überein (Hogan *et al.* 2003), da es nach i.c.v. IL-6-Applikation bei Ratten ebenfalls zu keiner Beeinflussung des REM-Schlafes kam. Aufgrund dieser Tatsache kann man davon ausgehen, dass die intranasale

Applikation, die unserer Studie zugrunde lag, ähnliche Effekte wie die intracerebroventrikuläre Applikation hervorruft und zentral wirkt (wenn auch mit zeitlicher Variabilität (s.4.1)).

Ein schlafstörender Effekt des intranasal applizierten IL-6 in Form einer verzögerten REM-Latenz kann nicht dargestellt werden. Arbeiten, bei denen dieses Phänomen beobachtet werden konnte, beruhen auf nur einer Blutentnahme zur Messung des endogenen IL-6 Spiegels (Hong *et al.* 2005; Mills *et al.* 2007). Da IL-6 einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, sind mehrere Blutentnahmen sinnvoll, um genauere Aussagen über den Einfluss von IL-6 auf die Schlafarchitektur treffen zu können.

Aber auch Späth-Schwalbe wies nach subkutaner Applikation von IL-6 beim Menschen eine verzögerte REM-Latenz nach. Dies könnte, wie auch die verzeichnete Abnahme des REM-Schlaf-Anteils, im Einklang mit unseren Ergebnissen auf eine periphere, mit erhöhten Kortisol-Spiegeln einhergehende Wirkung des IL-6 hindeuten - passend zu vorherigen Arbeiten, die einen Zusammenhang von erhöhten nächtlichen Kortisolspiegeln und einer Abnahme des REM-Schlafes feststellten (Born *et al.* 1989).

Eine Zunahme des REM-Schlafes, wie er nach Injektion von Hyper-IL-6 bei Ratten beobachtet wurde (May *et al.* 2009), kann mit unseren Ergebnissen nicht untermauert werden. Bei diesen unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen muss beachtet werden, dass sich die ausgeprägte Zunahme des REM-Schlafes in der o.g. Studie erst 18-20 Stunden nach der Hyper-IL-6-Injektion manifestierte. Unsere EEG-Aufzeichnungen dauerten nur bis ca. 11 Stunden nach Applikation an. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass die Ratten kein IL-6, sondern Hyper-IL-6 erhielten, mit dem man künstlich das Transsignaling induziert. Dies scheint ein wesentlichen Unterschied auszumachen, da die i.c.v. Applikation von IL-6 bei Ratten zu keinerlei Beeinflussung des REM-Schlafes führte (Hogan *et al.* 2003).

Wenn angenommen wird, dass es durch die beobachtete Zunahme des s-IL-6-R in der zweiten Nachthälfte auch zu einer Zunahme des Transsignalings kommt (s.o.), so kann man aufgrund unserer Ergebnisse spekulieren, dass das Transsignaling beim Menschen in der zweiten Nachthälfte zu keiner Beeinflussung des REM-Schlafes führt, aber zu einer Modifikation des NREM-Schlafes (s.o.). Da wir aber IL-6 intranasal applizierten und nicht Hyper-IL-6 intracerebroventrikulär, bleibt dies eine Spekulation und könnte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Durch unsere Ergebnisse zeigt sich, dass intranasal appliziertes IL-6 beim Menschen, wie es auch schon für zentral wirkendes IL-6 bei Ratten gezeigt werden konnte (Hogan *et al.* 2003), keinen Einfluss auf den REM-Schlaf besitzt. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse für beide Spezies scheint eine zentrale Wirkweise des IL-6 nach intranasaler Applikation sehr wahrscheinlich.

### 4.3 IL-6 verbessert die Schlaffeffizienz (Hypothese 3)

Die dritte Hypothese dieser Arbeit besagt, dass es durch die intranasale IL-6-Gabe zu einer verbesserten Schlaffeffizienz kommt. Da wir von einem förderlichen Effekt auf Schlaf durch zentral wirksames IL-6 ausgehen (s. Hypothese 1+2), muss folglich auch die Schlaffeffizienz, definiert als die im Schlaf verbrachte Zeit geteilt durch die im Bett verbrachte Zeit, verbessert sein.

Es liegen wenige Studien vor, die die Schlaffeffizienz explizit untersucht haben, und ob IL-6 förderlich auf den Schlaf wirkt, wird kontrovers diskutiert (s. 1.3.3).

Unsere Hypothese wird von einem interessanten Gedanken von Vgontzas (Vgontzas *et al.* 2005) unterstützt, der besagt, dass IL-6 ohne Aktivierung der HPA-Achse zu erhöhter Schläfrigkeit und Zunahme der Schlaffeffizienz führt. Kommt es jedoch im Rahmen der IL-6-Zunahme ebenfalls zu einer Aktivierung der HPA-Achse, resultieren hieraus Ermüdungserscheinungen kombiniert mit einer verminderten Schlafqualität.

Die Arbeit von Hong (Hong *et al.* 2005) postuliert dagegen eindeutig eine negative Korrelation zwischen morgendlich erhöhten IL-6-Werten und der Schlaffeffizienz in der darauffolgenden Nacht. Auch bei Insomnie-Patienten wurden nachts vor allem während der zweiten Nachthälfte erhöhte IL-6-Werte (Burgos *et al.* 2006) und im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Schlaffeffizienz gemessen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Schlaffeffizienz durch IL-6 deutlich verbessert ist und die Probanden nach intranasaler IL-6 Applikation weniger wach sind. Zusätzliche Analysen, die die individuellen Unterschiede der Probanden für die beiden Versuchsbedingungen verglichen, weisen eine signifikante Korrelation zwischen den Änderungen der SWA und dem Anstieg der Schlaffeffizienz auf ( $P < 0,02$ ,  $r = 0,61$ ; Spearman-Rang-Korrelation). Dies unterstützt unsere Hypothese, dass IL-6 einen schlaffördernden Effekt hat. Da wie bereits beschrieben keine erhöhten peripheren Kortisolwerte nachgewiesen werden konnten, kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Aktivierung der HPA-

Achse gekommen ist. Diese Tatsache unterstützt die von Vgontzas formulierte Hypothese.

Die von Hong erhobenen Daten (Hong *et al.* 2005) stehen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, wobei der unterschiedliche Versuchsaufbau (s. 4.2) Beachtung finden muss und die konträren Ergebnisse erklären kann. Es ist ebenfalls schwierig, die Daten, die Burgos bei Insomnie Patienten sammelte, mit denen unserer Arbeit direkt zu vergleichen, da wir jungen gesunden Männern IL-6 zentral zugeführt haben. Die Autorin dieser Studie gibt selbst zu bedenken, dass es schwierig ist, zu differenzieren, woher das peripher gemessene IL-6 stammt. Da die Insomnie auch mit einer Aktivierung der sympathischen Stressachse einhergeht, könnte es auch zu einer vermehrten IL-6-Produktion beispielsweise durch Adipozyten kommen, womit es schwieriger wird zu beurteilen, ob die verminderte Schlaffeffizienz bei Insomnie-Patienten ein durch zentralwirksames IL-6 vermittelter Effekt ist. Weiterhin konnte in Burgos Arbeit nicht klar abgegrenzt werden, inwieweit Schlaf und IL-6 durch eventuelle Einnahme von Schlafmedikamenten beeinflusst wurden.

Wir konnten mit unserer Arbeit schlaffördernde Effekte von IL-6, vermutlich als zentralen Wirkmechanismus, darlegen. Weiterhin konnte erstmalig eine positive Beeinflussung der Schlaffeffizienz durch IL-6 festgehalten werden.

#### **4.4 Periphere Wirkungen von IL-6 (Hypothese 4)**

Aufgrund des bei dieser Studie gewählten Applikationsmodus wurde die Hypothese formuliert, dass sich der periphere IL-6-Spiegel und die peripheren IL-6-Wirkungen (einschließlich der peripheren Kortisolkonzentration) nicht signifikant von der Placebobedingung unterscheiden.

Wir wählten die intranasale Applikation für IL-6, da vorangegangene Studien ergeben hatten, dass applizierte Moleküle auf diesem Wege schnell und direkt hohe zentrale Dosen erreichen (Born *et al.* 2002; Fehm *et al.* 2000) und es dadurch auch zu verstärkten zentralen Effekten kommt (Pietrowsky *et al.* 1996) (s.1.3.4).

IL-6 wurde bis jetzt bei Menschen noch nicht intranasal appliziert, so dass es zu prüfen galt, ob dieser Applikationsmodus für IL-6 geeignet ist. Bei Ratten hatte die intranasale Applikation von IL-6 zu erhöhten Konzentrationen im Frontallappen geführt (Kalueff *et al.* 2004).

Die Auswertungen der Blutentnahmen ergaben, dass es nach intranasaler IL-6-Applikation vor allem in der ersten Nachthälfte zu einem Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration kam. Die Serumkonzentration des Kortisol blieb durch die IL-6-Gabe unbeeinflusst. Auch genauere Korrelationsanalysen zeigten keinerlei Beeinflussung der systemischen Parameter wie CRP- und Kortisol-Konzentrationen durch das periphere IL-6.

Die anhaltend gesteigerte IL-6-Plasmakonzentration (erst um 6 Uhr wurden Placebo-Konzentrationen erreicht) macht einen kontinuierlichen, minimalen Übertritt des IL-6 in die Zirkulation sehr wahrscheinlich. Da die HPA-Achse in der Regel sehr sensitiv und schnell auf erhöhte IL-6-Plasmakonzentrationen reagiert (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) und die Kortisolserumkonzentration nicht beeinflusst wurde, führt uns diese Befundkonstellation zu dem Schluss, dass trotz des Übertritts der Substanz in die Peripherie keine ausreichend hohen Dosen erreicht wurden, um die HPA-Achse zu stimulieren. Dafür spricht auch, dass die CRP-Werte für beide Bedingungen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Für eine zentrale Anreicherung von IL-6 nach intranasaler Applikation spricht die Zunahme des SWS/SWA in der zweiten Nachthälfte und die Zunahme der Schlafeffizienz (s. 4.1 und 4.3), da Zytokine zentral neuromodulatorische Fähigkeiten besitzen (Krueger & Majde 2003). Außerdem führte die i.c.v.-Applikation von IL-6 bei Ratten zu annähernd übereinstimmenden Ergebnissen (s.4.1 und 4.2). Bei Ratten, denen humanes IL-6 intranasal appliziert wurde, konnte eine Anreicherung von IL-6 im Frontallappen nachgewiesen werden (Kalueff *et al.* 2004). Eine genaue Konzentrationsbestimmung im Hirngewebe verbietet sich beim Menschen aus ethischen Gründen. Zusammengefasst deutet aber alles darauf hin, dass sich die zentrale Konzentration von IL-6 trotz dessen beachtlicher Molekülgröße von 26 000 Dalton auch beim Menschen erhöhte.

Erstaunlicherweise zeigte sich sonst auf zentraler Ebene kein wesentlicher Einfluss des IL-6. Es kam weder zu einem Temperaturanstieg, noch zu vermehrter Schläfrigkeit. Bei Ratten kam es durch zentral appliziertes IL-6 zuerst zu einer Temperaturerhöhung und erst durch höhere Dosen zu einer Beeinflussung der Schlafarchitektur (Hogan *et al.* 2003). Die Körpertemperaturmessung und die Beurteilung der empfundenen Müdigkeit wurden bei unserem Studiendesign nur bis zum Einschlafen dokumentiert, so dass verspätete Änderungen möglich gewesen wären.

Zusammenfassend konnte die intranasale Applikation von IL-6 glaubwürdige zentrale Wirkungen hervorrufen, ohne dabei störende periphere Wirkungen hervorzurufen, so dass diese Methode als nichtinvasiver zentraler Applikationsmodus geeignet ist.

#### 4.5 Diskussion der Methoden

Die intranasale Applikation stellt sich wie in 4.4. diskutiert als guter nichtinvasiver zentraler Zugangsweg dar. Die intranasale Darreichung ist zur Untersuchung zentraler Wirkungen geeigneter als periphere subkutane oder intravenöse Injektionen, aber eine genaue Aussage über die Höhe der zentral tatsächlich erreichten Dosis ist ohne direkte Messung der Liquorkonzentration oder Untersuchung von Hirngewebe nicht zu treffen. Weiterhin muss es bei dieser Applikationsform, wenn auch ohne ersichtliche weitere Auswirkungen, zu einem geringen Übertritt in die Peripherie gekommen sein, worauf die erhöhten Plasmakonzentrationen des IL-6 hindeuten. Bei weiteren Studien sollten deswegen die direkte intracerebroventrikuläre Applikation und auch die Konzentrationsmessung via Liquor in Erwägung gezogen werden, um noch sicherer von einer zentralen Wirkung der applizierten Substanz ausgehen zu können.

Die Hypothese, dass Änderungen der IL-6-Konzentration eher durch erhöhte Konzentrationen im Bereich liegender intravenöser Katheter zur Blutentnahme als durch physiologische Änderungen im Sinne einer zirkadianen Rhythmik zustande kommen (Haack *et al.* 2002), kann mit unseren Ergebnissen widerlegt werden. Für die IL-6-Bedingung zeigen sich im Vergleich zur Placebokontrolle signifikant erhöhte IL-6-Plasmakonzentrationen, obwohl bei beiden Bedingungen über liegende intravenöse Katheter Blut entnommen wurde. Diese Hypothese konnte wie in 1.3.3 beschrieben auch von anderen Autoren bereits entkräftet werden (Guan *et al.* 2005; Vgontzas *et al.* 2005).

In vorangehenden Studien zeigten sich teilweise erst verspätet durch IL-6 vermittelte Effekte auf die Schlafarchitektur oder periphere Parameter. Bei der Studie von May (May *et al.* 2009) beispielsweise manifestierte sich die ausgeprägte Zunahme des REM-Schlafes erst 18-20 Stunden nach Injektion des Hyper-IL-6. Nach subkutaner Gabe erreichte der CRP-Anstieg erst 12,5 Stunden später sein Maximum (Späth-Schwalbe *et al.* 1998). Wir haben in unserer Studie nur 11 Stunden nach IL-6-Applikation Blutuntersuchungen und EEG-Aufzeichnungen durchgeführt. Auch im Hinblick auf die ca. 24 Stunden dauernde zirkadiane Rhythmik könnten in zukünftigen Studien längere Kontrollen dieser Parameter zu weiteren Erkenntnissen führen.

Gleiches gilt für den Verlauf der Körpertemperatur. Da bei Ratten schon geringe zentrale Dosen von IL-6 Auswirkungen auf die Körpertemperatur hatten, noch bevor es zur Modifikation der Schlafarchitektur kam (Hogan *et al.* 2003), hätte man die Körpertemperatur unserer Probanden mit einer rektal fixierten Temperatursonde über die Nacht hinweg verfolgen können um hierzu genauere Daten zu sammeln.

Das gewählte Studiendesign weist Grenzen auf, trotzdem erscheint die intranasale Applikation als geeignet, nichtinvasiv zentrale Wirkungen zu erzielen.

## 4.6 Ausblick

Insgesamt zeigt sich durch unsere Ergebnisse, dass IL-6 nur durch zentral vermittelte Effekte zu einer Zunahme des SWS/SWA führt, der REM-Schlaf dadurch unbeeinflusst bleibt und die Schlafeffizienz verbessert wird. Dabei hat sich die intranasale Applikation als verlässlicher nichtinvasiver zentraler Zugangsweg dargestellt. Weitergehend kann man vermuten, dass die Zunahme der SWA durch eine erhöhte Transsignaling-Kapazität in der zweiten Nachthälfte entsteht.

Die Ergebnisse belegen weiterhin, dass IL-6 ein Kriterium der „Sleep Regulatory Substances“ (SRS) erfüllt, indem IL-6 zu einer Zunahme des NREM-Schlafes führt. Durch die Daten anderer Arbeiten konnten bereits gezeigt werden, dass weitere Kriterien erfüllt werden, z.B. dass für IL-6 eine zirkadiane Rhythmik besteht und Peaks des IL-6 zu Beginn und während des Schlafes mit der Schlafneigung korrelieren (Redwine *et al.* 2000; Seres *et al.* 2004; Vgontzas *et al.* 1999), oder dass IL-6 erhöhte Konzentrationen bei Schlafstörungen aufweist (Burgos *et al.* 2006; Vgontzas *et al.* 2005). Eine Reduktion von Schlaf durch Hemmung von IL-6 gilt es in weiteren Arbeiten zu prüfen (s.u.). Die Erfüllung des letzten Kriteriums, nämlich dass es durch IL-6 zur direkten Einwirkung auf Schaltkrie-se des Schlafes kommt, konnte noch nicht demonstriert werden. Aber man geht mittlerweile davon aus, dass Schlaf lokal in kleinen Neuronenverbänden entsteht, die auch mit benachbarten Neuronenverbänden vernetzt sind und sich so synchronisieren können (Krueger *et al.* 2007). Weitergehend wird vermutet, dass dieser lokale Schlaf durch die SRS, wie beispielsweise IL-1 und TNF, ausgelöst werden kann, indem es zu einer aktivitätsabhängigen Produktion der SRS in beanspruchten Hirnarealen kommt, diese dann lokal auf benachbarte Neurone einwirken und somit lokalen Schlaf beeinflussen können. Für IL-6 konnte zum einen auch eine erhöhte Sekretion nach Beanspruchung eines Hirnareals nachgewiesen werden (Balschun *et al.* 2004), so dass es durch auto-und parakrine

Vorgänge dann wiederum direkt auf Nervenzellen, wenn auch nur in Anwesenheit des s-IL-6-R, einwirken könnte (März *et al.* 1998; März *et al.* 1999). Auf diesem Wege wäre auch eine Schlafinduktion möglich. Somit besteht die Möglichkeit, dass IL-6 in Verbindung mit s-IL-6-R als SRS lokalen Schlaf induzieren könnte.

Um in Zukunft zentrale Effekte noch klarer erfassen zu können, sollte zum einen die intracerebroventrikuläre Applikation betrachtet werden und zum anderen die in 4.5. diskutierten Verbesserungen berücksichtigt werden. Bei menschlichen Probanden ist das Maximum der invasiven Untersuchungsmöglichkeiten die Liquoruntersuchung. Um weitere Informationen über die Wirkungen des IL-6 zu erhalten, könnte auch eine zentrale IL-6-Blockade bei Menschen in Betracht gezogen werden. Dazu könnte man mit Antikörpern wie bei Balschun (Balschun *et al.* 2004) arbeiten und untersuchen, wie sich die gezielte IL-6-Blockade auf die Schlafarchitektur auswirkt. Noch interessanter wäre es, gezielt das Transsignaling mit dem löslichen sgp 130 zu antagonisieren (Rose-John 2003). Durch eine solche Blockade könnte die Hypothese, dass die Zunahme von SWS/SWA in der zweiten Nachthälfte mit dem Anstieg des s-IL-6-R in Verbindung mit einer Zunahme des Transsignalings zusammenhängt, überprüft und weitere Erkenntnisse darüber gesammelt werden, ob IL-6 den Kriterienkatalog der SRS erfüllt.

Zusammengefasst folgen aus dieser Studie neue Erkenntnisse über den neuromodulatorischen Effekt von IL-6, die einen förderlichen Einfluss auf den Schlaf vom Menschen betonen, und über das Zusammenspiel von Immunsystem und zentralem Nervensystem.

## 5 Zusammenfassung

Man geht von vielfältigen Interaktionen zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem während des Schlafes aus. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Interleukine (IL). Auch Interleukin 6 (IL-6) hat neuromodulatorische Einflüsse. Bei dieser Arbeit wurde der Einfluss von IL-6 auf Schlaf und die assoziierte hirnelektrische Aktivität untersucht. Hierfür wurde ein intranasaler Applikationsmodus gewählt um genauer zwischen peripheren und zentralen Effekten des IL-6 zu unterscheiden.

Das IL-6 führte in der zweiten Nachthälfte zu einer deutlichen Zunahme des Tiefschlafanteils (SWS,  $P < 0,05$ ), sowie zu einem Anstieg der elektroenzephalographischen Slow Wave Activity (SWA (0,5-4 Hz),  $P < 0,01$ ). Diese Ergebnisse sprechen für eine zentrale Wirkweise des IL-6 und könnten mit der Fähigkeit des IL-6 zum Transsignaling in der zweiten Hälfte des nächtlichen Schlafes erklärt werden. Die zweite Nachthälfte ist üblicherweise von Rapid-Eye-Movement Schlaf (REM-Schlaf) dominiert. Der REM-Schlaf zeigte jedoch keine wesentliche Beeinflussung durch intranasal appliziertes IL-6, so dass die in einer vorherigen Studie (Späth-Schwalbe *et al.* 1998) beobachtete Abnahme von REM-Schlaf durch subkutan appliziertes IL-6 am ehesten als dessen indirekte periphere Wirkung zu sehen ist, indem es zu Kortisolserhöhungen kommt. Weiterhin konnte durch IL-6 eine deutliche Zunahme der Schlafeffizienz und somit eine schlaffördernder zentraler Effekt von IL-6 verzeichnet werden. Bei der vorliegenden Studie kam es nach intranasaler Applikation im Vergleich zu Placebo zu einer Zunahme der peripheren IL-6-Konzentrationen ohne signifikante Beeinflussung der Kortisolkonzentrationen oder sonstigen peripheren Wirkungen des IL-6. Somit deutet alles darauf hin, dass die intranasale Darreichung eine gute Möglichkeit bietet, trotz der erheblichen Molekülgröße des IL-6, hohe zentrale Wirkspiegel zu erzielen und machen den Anstieg des SWS und der SWA in der zweiten Nachthälfte als zentral vermittelten Effekt des IL-6 sehr wahrscheinlich.

Diese Studie stärkt somit die Hinweise auf das Zusammenspiel von Immunsystem und zentralem Nervensystem durch den nachgewiesenen Einfluss von IL-6 auf Schlaf und hirnelektrische Aktivität.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aschenbrenner S., Tucha O., & Lange K. (2000) Regensburger Wortflüssigkeitstest. Hogrefe Verlag für Psychologie, Göttingen.
- Aserinsky E. & Kleitman N. (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274.
- Balschun D., Wetzel W., Del Rey A., Pitossi F., Schneider H., Zuschratter W., & Besedovsky H. O. (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J.* 18: 1788-1790.
- Born J. & Fehm H. L. (1998) Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp Clin.Endocrinol.Diabetes* 106: 153-163.
- Born J., Lange T., Hansen K., Molle M., & Fehm H. L. (1997) Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J.Immunol.* 158: 4454-4464.
- Born J., Lange T., Kern W., McGregor G. P., Bickel U., & Fehm H. L. (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat.Neurosci.* 5: 514-516.
- Born J., Rasch B., & Gais S. (2006) Sleep to remember. *Neuroscientist.* 12: 410-424.
- Born J., Spath-Schwalbe E., Schwakenhofer H., Kern W., & Fehm H. L. (1989) Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 68: 904-911.
- Breuninger L. M., Dempsey W. L., Uhl J., & Murasko D. M. (1993) Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 69: 205-214.
- Brunner D. P., Dijk D. J., & Borbely A. A. (1993) Repeated partial sleep deprivation progressively changes in EEG during sleep and wakefulness. *Sleep* 16: 100-113.
- Burgos I., Richter L., Klein T., Fiebich B., Feige B., Lieb K., Voderholzer U., & Riemann D. (2006) Increased nocturnal interleukin-6 excretion in patients with primary insomnia: a pilot study. *Brain Behav Immun.* 20: 246-253.
- Buzsaki G. (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31: 551-570.
- Chen X. Q., Fawcett J. R., Rahman Y. E., Ala T. A., & Frey II W. H. (1998) Delivery of Nerve Growth Factor to the Brain via the Olfactory Pathway. *J Alzheimers.Dis.* 1: 35-44.
- Christensen P. & Guilford J. (1958) Word Fluency, Form A. CA:Sheridan Supply., Beverly Hills.
- Contreras D. & Steriade M. (1995) Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. *J Neurosci* 15: 604-622.
- de Quervain D. J., Roozendaal B., Nitsch R. M., McGaugh J. L., & Hock C. (2000) Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat.Neurosci.* 3: 313-314.

- Diekelmann S. & Born J. (2010) The memory function of sleep. *Nat.Rev.Neurosci.* 11: 114-126.
- Dimitrov S., Lange T., Benedict C., Nowell M. A., Jones S. A., Scheller J., Rose-John S., & Born J. (2006) Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J.* 20: 2174-2176.
- Dinges D. F., Pack F., Williams K., Gillen K. A., Powell J. W., Ott G. E., Aptowicz C., & Pack A. (1997) Cumulative sleepiness, mood disturbance, and psychomotor vigilance performance decrements during a week of sleep restricted to 4-5 hours per night. *Sleep* 20: 267-277.
- Fehm H. L., Perras B., Smolnik R., Kern W., & Born J. (2000) Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: a novel approach to neuropharmacology? *Eur.J Pharmacol.* 405: 43-54.
- Frei K., Malipiero U. V., Leist T. P., Zinkernagel R. M., Schwab M. E., & Fontana A. (1989) On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur.J Immunol.* 19: 689-694.
- Gadient R. A. & Otten U. (1994) Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 637: 10-14.
- Gadient R. A. & Otten U. H. (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog.Neurobiol.* 52: 379-390.
- Gais S., Lucas B., & Born J. (2006) Sleep after learning aids memory recall. *Learn.Mem.* 13: 259-262.
- Guan Z., Vgontzas A. N., Omori T., Peng X., Bixler E. O., & Fang J. (2005) Interleukin-6 levels fluctuate with the light-dark cycle in the brain and peripheral tissues in rats. *Brain Behav.Immun.* 19: 526-529.
- Haack M., Kraus T., Schuld A., Dalal M., Koethe D., & Pollmacher T. (2002) Diurnal variations of interleukin-6 plasma levels are confounded by blood drawing procedures. *Psychoneuroendocrinology* 27: 921-931.
- Hogan D., Morrow J. D., Smith E. M., & Opp M. R. (2003) Interleukin-6 alters sleep of rats. *J Neuroimmunol.* 137: 59-66.
- Hong S., Mills P. J., Lored J. S., Adler K. A., & Dimsdale J. E. (2005) The association between interleukin-6, sleep, and demographic characteristics. *Brain Behav Immun.* 19: 165-172.
- Jones S. A., Richards P. J., Scheller J., & Rose-John S. (2005) IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res.* 25: 241-253.
- Jones S. A., Scheller J., & Rose-John S. (2011) Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 121: 3375-3383.
- Jostock T., Müllberg J., Özbek S., Atreya R., Blinn G., Voltz N., Fischer M., Neurath M. F., & Rose-John S. (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 268: 160-167.

- Juttler E., Tarabin V., & Schwaninger M. (2002) Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist*. 8: 268-275.
- Kalueff A. V., Lehtimäki K. A., Ylinen A., Honkaniemi J., & Peltola J. (2004) Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. *Neurosci Lett*. 365: 106-110.
- Krueger J. M. & Majde J. A. (2003) Humoral links between sleep and the immune system: research issues. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 992: 9-20.
- Krueger J. M., Rector D. M., & Churchill L. (2007) Sleep and cytokines. *sleep med clin*. 2: 161-169.
- Lange T., Dimitrov S., & Born J (2010) Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1193: 48-59.
- Lange T., Dimitrov S., Fehm H. L., & Born J (2006) Sleep-like concentrations of growth hormone and cortisol modulate type1 and type2 in-vitro cytokine production in human T cells. *Int Immunopharmacol*. 6: 216-225.
- MacLean A. W., Fekken G. C., Saskin P., & Knowles J. B. (1992) Psychometric evaluation of the Stanford Sleepiness Scale. *J.Sleep Res*. 1: 35-39.
- Marshall L. & Born J. (2002) Brain-immune interactions in sleep. *Int.Rev.Neurobiol*. 52: 93-131.
- Marshall L., Derad I., Strasburger J., Fehm H. L., & Born J (1999) A determinant factor in the efficacy of GHRH administration in promoting sleep: high peak concentration versus recurrent increasing slopes. *Psychoneuroendocrinology* 24: 363-370.
- März P., Cheng J. G., Gadiant R. A., Patterson P. H., Stoyan T., Otten U., & Rose-John S. (1998) Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95: 3251-3256.
- März P., Heese K., Dimitriades-Schmutz B., Rose-John S., & Otten U. (1999) Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia* 26: 191-200.
- May U., Schifflholz T., Baier P. C., Krueger J. M., Rose-John S., & Scheller J. (2009) IL-6-trans-signalling increases rapid-eye-movement sleep in rats. *Eur.J Pharmacol*. 613: 141-145.
- Mills P. J., Von Kanel R., Norman D., Natarajan L., Ziegler M. G., & Dimsdale J. E. (2007) Inflammation and sleep in healthy individuals. *Sleep* 30: 729-735.
- Mölle M., Marshall L., Gais S., & Born J. (2002) Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 22: 10941-10947.
- Mölle M., Yeshenko O., Marshall L., Sara S. J., & Born J. (2006) Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J Neurophysiol*. 96: 62-70.
- Mullington J., Korth C., Hermann D. M., Orth A., Galanos C., Holsboer F., & Pollmacher T. (2000) Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278: R947-R955.

- Perras B., Marshall L., Köhler G., Born J., & Fehm H. L. (1999) Sleep and endocrine changes after intranasal administration of growth hormone-releasing hormone in young and aged humans. *Psychoneuroendocrinology* 24: 743-757.
- Pietrowsky R., Struben C., Molle M., Fehm H. L., & Born J. (1996) Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biol.Psychiatry* 39: 332-340.
- Rechtschaffen A. & Kales A. (1968) A Manual Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep of Human Subjects. United States Government Printing Office, Washington DC.
- Redwine L., Hauger R. L., Gillin J. C., & Irwin M. (2000) Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85: 3597-3603.
- Rodenbeck A., Binder R., Geisler P., Danker-Hopfe H., Lund R., Raschke F., Weeß H. G., & Schulz H. (2006) A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition according to Rechtschaffen and Kales. *Somnologie - Schlaforschung und Schlafmedizin* 10: 159-175.
- Rose-John S. (2003) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors. *Acta Biochim.Pol.* 50: 603-611.
- Sallmann S., Juttler E., Prinz S., Petersen N., Knopf U., Weiser T., & Schwaninger M. (2000) Induction of interleukin-6 by depolarization of neurons. *J.Neurosci.* 20: 8637-8642.
- Scheller J. & Rose-John S. (2006) Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med.Microbiol.Immunol.* 195: 173-183.
- Schöbitz B., Pezeshki G., Pohl T., Hemmann U., Heinrich P. C., Holsboer F., & Reul J. M. (1995) Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J.* 9: 659-664.
- Seres J., Herichova I., Roman O., Bornstein S., & Jurcovicova J. (2004) Evidence for daily rhythms of the expression of proopiomelanocortin, interleukin-1-beta and interleukin-6 in adenopituitaries of male long-evans rats: effect of adjuvant arthritis. *Neuroimmunomodulation.* 11: 316-322.
- Sirota A., Csicsvari J., Buhl D., & Buzsaki G. (2003) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 2065-2069.
- Späth-Schwalbe E., Hansen K., Schmidt F., Schrezenmeier H., Marshall L., Burger K., Fehm H. L., & Born J. (1998) Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 1573-1579.
- Steriade M. (1999) Cellular substrates of brain rhythms. In: *Electroencephalography: Basic principles, clinical applications and related fields* (eds Niedermeyer E and Lopes da Silva F) pp. 28-75. Lippincott Williams & Wilkens, Baltimore.
- Steriade M., Nunez A., & Amzica F. (1993a) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13: 3252-3265.

- Steriade M., Nunez A., & Amzica F. (1993b) Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J Neurosci* 13: 3266-3283.
- Suzuki S., Tanaka K., Nagata E., Ito D., Dembo T., & Fukuuchi Y. (1999a) Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 262: 117-120.
- Suzuki S., Tanaka K., Nogawa S., Nagata E., Ito D., Dembo T., & Fukuuchi Y. (1999b) Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb.Blood Flow Metab* 19: 1256-1262.
- Thomas K. S., Motivala S., Olmstead R., & Irwin M. R. (2011) Sleep depth and fatigue: role of cellular inflammatory activation. *Brain Behav Immun.* 25: 53-58.
- Tononi G. & Cirelli C. (2006) Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med.Rev.* 10: 49-62.
- van Gool J., van Vugt H., Helle M., & Aarden L. A. (1990) The relation among stress, adrenalin, interleukin 6 and acute phase proteins in the rat. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 57: 200-210.
- Vgontzas A. N., Bixler E. O., Lin H. M., Prolo P., Trakada G., & Chrousos G. P. (2005) IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuroimmunomodulation.* 12: 131-140.
- Vgontzas A. N. & Chrousos G. P. (2002) Sleep, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and cytokines: multiple interactions and disturbances in sleep disorders. *Endocrinol.Metab Clin.North Am* 31: 15-36.
- Vgontzas A. N., Papanicolaou D. A., Bixler E. O., Lotsikas A., Zachman K., Kales A., Prolo P., Wong M. L., Licinio J., Gold P. W., Hermida R. C., Mastorakos G., & Chrousos G. P. (1999) Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84: 2603-2607.

## 7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abb. 1 Typischer Verlauf der einzelnen Schlafphasen und – zyklen .....	4
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schlafstadien_einer_nacht.png)	
Abb. 2 Strukturmodell Interleukin 6 .....	9
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PDB_1il6_EBI.jpg)	
Abb. 3 Schematische Anordnung des Versuchsablaufs .....	23
Abb. 4 EEG-Leistung der Slow Wave Activity (SWA; 0,5-4 Hz) für die 2. Nachthälfte .....	30
Abb. 5 EEG-Leistungsspektrum für die gesamte Nacht an Fz.....	31
Abb. 6 Plasmakonzentration von IL-6 .....	32
Abb. 7 Serumkonzentration von Kortisol .....	33

### Tabellen

Tab. 1 Zeitlicher Versuchsablauf.....	21
Tab. 2 Polysomnographische Charakteristika .....	29

## 8 Anhang

### Stanford-Schläfrigkeits-Skala

Probanden-Nr.:

Datum:

abends/ morgens

Im Folgenden soll der Grad der Schläfrigkeit („Wie wach fühlen Sie sich?“) erhoben werden:

Kreuzen Sie bitte das entsprechende Kästchen an.

Schläfrigkeitsgrad	Punktwert
Ich fühle mich aktiv, lebhaft, aufmerksam oder sehr wach	1
Ich kann konzentriert arbeiten, habe aber kein Leistungshoch	2
Ich fühle mich wach, entspannt und aufnahmefähig aber nicht voll konzentriert	3
Ich fühle mich irgendwie träge	4
Ich fühle mich träge, verlangsamt, und könnte mich hinlegen	5
Ich fühle mich schläfrig, benebelt, kämpfe gegen die Müdigkeit und würde mich lieber hinlegen	6
Ich bin kurz vor dem Einschlafen und habe bereits Traumdeutungen	7
Ich schlafe	8

## Symptom-Rating Skala

Symptom:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	schwach			mittel				stark		
1. <b>A</b> ngst	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2. <b>S</b> chwitzen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3. <b>K</b> örperliches Unwohlsein	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4. <b>I</b> nnere Unruhe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5. <b>K</b> ribbelgefühl	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6. <b>Z</b> ittern	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
7. <b>H</b> unger	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8. <b>H</b> erzklopfen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
9. <b>V</b> erschwommenes Sehen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10. <b>K</b> onzentrationsfähigkeit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
11. <b>D</b> urst	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
12. <b>Ä</b> rger	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
13. <b>K</b> opfschmerzen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14. <b>S</b> attheit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15. <b>Ü</b> belkeit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16. <b>T</b> raurigkeit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
17. <b>A</b> tembeschwerden	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
18. <b>F</b> reude	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
19. <b>M</b> üdigkeit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
20. <b>S</b> chwindel	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
21. <b>N</b> ervosität	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
22. <b>A</b> ppetit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
23. <b>J</b> uckreiz	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
24. <b>S</b> chwäche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25. <b>W</b> ärme	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
26. <b>A</b> ktivität	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
27. <b>V</b> öllegefühl	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

**Anlage zum Antrag an die Ethikkommission der MUL „Die Wirkung von Il-6 nach intranasaler Applikation“**

Name: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

**EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG**

Ich nehme freiwillig und gegen Bezahlung von Euro 150,- an einer Studie teil, welche die Wirkung von Interleukin-6, das als Nasenspray eingenommen wird, auf die schlafabhängige Gedächtniskonsolidierung untersucht.

Ich wurde über den Inhalt, die Vorgehensweise und die Risiken der Studie informiert. Auch eine Kopie der Probandeninformation habe ich erhalten. Meine Fragen wurden ausreichend und verständlich beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit, mich gegen die Teilnahme an der Studie zu entscheiden und willige hiermit in die Teilnahme ein.

Mir ist bekannt, daß ich jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne persönliche Nachteile vom Versuch zurücktreten kann und für die Teilnahme anteilmäßig bezahlt werde.

Ich leide, soweit mir bekannt ist, nicht an Krankheiten des Herzens, der Gefäße, des Magen-Darm-Trakts, der Leber und Nieren, der endokrinen Organe, der Blutbildung und des Nervensystems. Entzündliche und rheumatologische Erkrankungen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen sind mir nicht bekannt. Ich hatte in den letzten drei Monaten keine Infektionen, größere Verletzungen, Impfungen, Operationen (auch größere Zahnbehandlungen) und in den letzten 4 Wochen keine größeren geistigen oder körperlichen Belastungen. Ich bin zur Zeit schmerzfrei und nehme keine Medikamente ein.

-----

Lübeck, den

-----

Unterschrift

## Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck



## Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn  
Dipl. oec. troph. Benedict  
Institut für Neuroendokrinologie

im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann  
Telefon: (0451) 500- 4639  
Fax: (0451) 500- 3026  
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Datum: 16.02.06

Aktenzeichen:  
(immer angeben!) 06-008

nachrichtlich:  
Herrn Prof. Dr. Born  
Direktor des Institutes für Neuroendokrinologie

**Sitzung der Ethik-Kommission am 08. Februar 2006****Antragsteller: Herr Benedict / Herr Prof. Born****Titel: Modulation der schlafabhängigen Gedächtnisverarbeitung durch intranasal verabreichtes Interleukin-6**

Sehr geehrter Herr Benedict,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Die Nennung der Aufwandsentschädigung im Antrag unter Punkt 3.7 von 80,00 € und im Aushang von 100,00 € ist anzupassen. Aus welchem Grunde werden Frauen ausgeschlossen? Die Kommission empfiehlt den Abschluß einer Wegeversicherung. In der Aufklärung sind die Zweckbindung, die Vernichtung, die Aufbewahrung und der Datenschutz des Biomaterials zu nennen. Die aktuelle Versicherungsformel muß in die Aufklärung eingebracht werden und zwar wie folgt: "Im Falle einer Schädigung haftet das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein nach den allgemeinen gesetzlichen Haftungsgrundsätzen".

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Lucas Wessel  
Stellv. Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe  
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)  
Prof. Dr. F. Hohagen  
(Psychiatrie)  
Prof. Dr. Dominiak  
(Pharmakologie)

Frau H. Müller  
(Pflege)  
 Prof. Wessel  
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)  
Herr Dr. Fieber  
(Richter am Landgericht Lübeck)  
Prof. Schwinger  
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm  
(Medizinische Klinik I)  
 Frau Prof. Dr. M. Schrader  
(Plastische Chirurgie)  
 Herr Dr. Schultz  
(Pädiatrie)  
 Herr D. Stojan  
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

## 9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Born für die Möglichkeit zur Dissertation, sowie der Nutzung der wissenschaftlichen Einrichtungen an dem Institut für Neuroendokrinologie.

Frau Prof. Dr. Lisa Marshall danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die nette Betreuung, die Ratschläge sowie das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse. Auch Herrn Dr. Christian Benedict danke ich für die Betreuung während der experimentellen Phase.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroendokrinologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Probanden für die Teilnahme an der Studie, sowie bei meiner Mitdotorandin Victoria Ulrich für dir gute Zusammenarbeit.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name Nora Manon Jacob  
 Geburtsdatum 21.08.1983  
 Geburtsort Braunschweig  
 Familienstand ledig



### Schulbildung

1988-1990  
 (USA) Primary School El Cerrito, CA  
 1990-1993 Grundschule Lehndorf, Braunschweig  
 1993-1995 Orientierungsstufe Altlehndorf, Braunschweig  
 1995-2002 Gymnasium Hoffmann-von-Fallerleben, Braunschweig  
 06/2002 Abitur

### Außerschulische Bildung

2002-2005 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck  
 2005-2006 Medizinstudium an der Medizinischen Universität Graz  
 2007-2008 Praktisches Jahr, Wahlfach: Gynäkologie,  
 Teilgebiet Chirurgie in Fort-de-France, Martinique  
 11/2008 Beendigung des Medizinstudiums durch die 2. Ärztliche Prüfung

**Dissertation**

02/2007-08/2007	Durchführung der Versuchs Nächte
12/2008-07/2012	Durchführung der Nachversuche und Verfassen der Dissertation

**Beruflicher Werdegang**

Seit 07/2009	Assistenzärztin für Pneumologie und Schlafmedizin
--------------	---

**Besondere Kenntnisse**

Fremdsprachen	Englisch in Schrift und Sprache
	Französisch in Schrift und Sprache