

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

**Effekte von Spironolacton auf die Verteilung von
T-Zell-Subtypen im Schlaf**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Timo Günther
aus Urumqi / China

Lübeck 2012

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. rer. soc. Jan Born

2. Berichtserstatter: Priv.- Doz. Dr. rer. Nat. Jürgen Luhm

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2012

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 09.08.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1 Immunsystem	7
1.1.1 Von einer Infektion zur Immunantwort	7
1.1.2 Subtypen der T-Lymphozyten	9
1.2 Schlaf und circadiane Rhythmik	11
1.3 Aldosteron und das neuroendokrine System	13
1.4 Stand der Forschung	14
1.5 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchspersonen	17
2.2 Versuchsablauf	17
2.3 Schlaf	19
2.4 Blutparameter	20
2.4.1 Hormone	20
2.4.2 Subpopulationen der T-Lymphozyten	21
2.5 Statistik	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Schlaf, Schläfrigkeit und Befindlichkeit	23
3.2 Vitalparameter	24
3.3 Hormone	24
3.3.1 Cortisol und ACTH	24
3.3.2 Aldosteron	25
3.3.3 Katecholamine	25
3.4 Subpopulationen der T-Lymphozyten	26
4. Diskussion	28
4.1 Hormone	28
4.1.1 Cortisol und ACTH	28
4.1.2 Aldosteron	29
4.1.3 Katecholamine	30
4.2 T-Lymphozytenzahlen	31
4.3 Mechanismen der Spironolactonwirkung	37
4.4 Klinische Bedeutung	38
	3

5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	43
7. Anhang	52
7.1 Befindlichkeitsfragebogen (MDBF)	52
7.2 Stanford-Schläfrigkeits-Skala (SSS)	54
7.3 Genehmigung der Ethikkommission	55
8. Danksagung	56
9. Lebenslauf	56

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Analysis of Variance = Varianzanalyse
BMI	Body-Mass-Index
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation = Unterscheidungsgruppe
CRH	Corticotropin Releasing Hormone = Corticotropin freisetzendes Hormon
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroencephalogramm/-graphie
EKG	Elektrokardiogramm/-graphie
EMG	Elektromyogramm/-graphie
EOG	Elektrookulogramm/-graphie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting = fluoreszenzaktivierte durchflusszytometrische Zellsortierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GH	Growth Hormone = Wachstumshormon
GR	Glukocortikoid-Rezeptor
HEV	Hochendotheliale Venole
HHN	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie = Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule = interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LFA	Leukozyten-Funktions-Antigen
MDBF	Mehrdimensionaler Befindlichkeitsfragebogen
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten

MR	Mineralocortikoid-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REM	Rapid Eye Movement
SEM	Standard Error of Mean = Standardfehler
SSS	Stanford-Schläfrigkeits-Skala
SWS	Slow Wave Sleep = Tiefschlafstadium mit langsamen Wellen im EEG
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
vs	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung und Fragestellung

Wir verbringen ein gutes Drittel unseres Lebens schlafend und jedem ist die Notwendigkeit zu schlafen unmittelbar bewusst. Die Gründe, weshalb Menschen und auch Tiere schlafen, sind bislang nicht endgültig geklärt.

Welche Funktionen Schlaf im Blick auf das Immunsystem hat und über welche Wege er immunologische Vorgänge beeinflusst, wurde u.a. in vielen Studien an der Universität zu Lübeck beforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von Spironolacton der Einfluss der Hormone Cortisol und Aldosteron auf die nächtlichen Wanderungsbewegungen von Zellen der spezifischen Immunabwehr untersucht.

1.1 Immunsystem

Um sich vor schädlichem Eindringen und Ausbreiten von Krankheitserregern zu schützen, besitzt der menschliche Körper ein ausgeklügeltes, fein balanciertes Schutzsystem, welches in den meisten Fällen in der Lage ist, diese Erreger und auch eigene entartete Zellen zu eliminieren. Dieses Immunsystem besteht aus einer unspezifischen und einer spezifischen Immunabwehr mit jeweils humoralen und zellulären Komponenten. Dabei machen erst das räumliche und zeitliche Zusammentreffen der verschiedenen Zellen, humoralen Faktoren und Botenstoffe eine schnelle und effektive Immunantwort sowie die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses möglich.

1.1.1 Von einer Infektion zur Immunantwort

Anhand eines typischen Ablaufs einer akuten Infektion sollen im Folgenden die für die thematische Einordnung der Fragestellung wichtigen Vorgänge und Komponenten des Immunsystems beispielhaft dargestellt werden. Abhängig vom Erregertyp (bakteriell, viral, parasitär oder mykotisch) und dessen Virulenzfaktoren stehen dabei unterschiedliche Komponenten im Vordergrund (Janeway 2008):

Haben einige Krankheitserreger die Haut- bzw. Schleimhautbarriere überwunden und sich im Gewebe vermehrt, sprechen wir von einer Infektion. Diese hat als erstes eine Entzündung zur Folge, die durch die Aktivierung der Makrophagen und des Komplementsystems hervorgerufen wird und im betroffenen Ge-

webe zu Endothelveränderungen führt. Die Freisetzung von Botenstoffen wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) durch Makrophagen sowie das Erscheinen von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche locken weitere Zellen der unspezifischen Immunabwehr wie neutrophile Granulozyten, natürliche Killer-Zellen und Monozyten an und ermöglichen ihren Übertritt vom Blut in das infizierte Gewebe. Während diese Mechanismen bereits dazu dienen, die Erreger zu eliminieren und ihre Ausbreitung im Gewebe einzudämmen, kommt es parallel zur Aktivierung der spezifischen Immunabwehr, die jedoch mehrere Tage in Anspruch nimmt. Antigenpräsentierende Zellen im infizierten Gewebe nehmen Erregerantigene auf und wandern in die drainierenden Lymphknoten. Dort aktivieren sie über das Antigen in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) Klasse II antigenspezifische naive T-Helferzellen (Th-Zellen) mit dem Oberflächenmarker CD4 (CD= Cluster of differentiation), die über die hochendothelialen Venolen (HEV) in den Lymphknoten gelangt sind, sich in der Folge teilen und zu Effektorzellen und weiteren T-Zellsubtypen ausreifen. Diese verlassen zum großen Teil den Lymphknoten, zirkulieren im Blutkreislauf und werden durch die bereits erwähnten Endothelveränderungen am Infektionsort zum Übertritt in das Gewebe veranlasst. Erkennen die Effektorzellen ihr Antigen, setzen sie lokal Zytokine wie TNF- α frei und locken damit weitere Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr an und aktivieren diese. Im Lymphknoten stimulieren einige Th-Effektorzellen auch B-Lymphozyten, die für das gleiche Antigen spezifisch sind, und ermöglichen damit deren Vermehrung und Differenzierung zu Plasmazellen, die dann durch Antikörperproduktion an der Elimination der Erreger mitwirken. Außerdem unterstützen sie Antigen-spezifische cytotoxische T-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD8. Ist eine Körperzelle beispielsweise durch ein Virus infiziert und präsentiert Virusantigen über MHC I auf ihrer Oberfläche, kann eine cytotoxische T-Zelle, die dieses Antigen erkennt, die Zelle töten und damit der Ausbreitung des Virus entgegenwirken. Th-Zellen interagieren über ihr CD4 mit MHC II exprimierenden dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, die als antigenpräsentierende Zellen zusammengefasst werden und auch mit anderen T-Lymphozyten. Ein Teil der naiven Lymphozyten differenziert sich zu Gedächtniszellen, die im Falle einer

späteren erneuten Exposition mit demselben Antigen rasch zu Effektorzellen werden können und damit eine schnelle und gezielte Immunantwort ermöglichen.

Die Reifung der Lymphozyten zu funktionsfähigen naiven T- und B-Zellen erfolgt in den primären lymphatischen Organen Thymus (T-Zellen) und Knochenmark (B-Zellen). Als sekundäre lymphatische Gewebe werden die Lymphknoten, Milz und die schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe bezeichnet (Janeway 2008, Lüllmann-Rauch 2003).

1.1.2 Subtypen der T-Lymphozyten

Th-Zellen und cytotoxische T-Zellen stellen heterogene Gruppen dar, die sich in Funktion, Wanderungsverhalten sowie im Teilungs- und Differenzierungsvermögen unterscheiden. Dies lässt sich an der Zytokinfreisetzung und Expression von verschiedenen CD-Markern zeigen, die u.a. Adhäsionsmoleküle oder Zytokinrezeptoren darstellen. Das Auswandern aus dem Blut in die unterschiedlichen Körpergewebe wird dabei durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen der T-Zellen mit denen der Endothelzellen ermöglicht (Sackstein 2005). Eine bereits verwendete Einteilung mithilfe der Oberflächenmarker

Oberflächenmarker	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻
CD62L ⁺	Naive T-Zellen	zentrale Gedächtniszellen
CD62L ⁻	Effektor-T-Zellen	Effektor-Gedächtniszellen

Tabelle 1 Subtypenunterscheidung von Th-Zellen und cytotoxischen T-Zellen mithilfe von Unterscheidungsgruppen (CD).

CD62L und CD45RA ist in Tabelle 1 dargestellt (Hamann et al 1997, Sallusto et al 2004, Campbell et al 2009, Dimitrov et al 2009).

CD62L, auch L-Selectin genannt, dient neben dem CC-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) dem Homing in die Lymphknoten und ist daher auf naiven T-Zellen und zentralen Gedächtniszellen vorhanden, die bis zum Erkennen ihres Antigens zwischen Blut und sekundärem lymphatischen Gewebe zirkulieren (von Andrian und Mempel 2003, Pulendran und Ahmed 2006). Effektorzellen haben kein L-Selectin und entfalten ihre Wirkung vorwiegend am Infektionsort, wohin sie z.B. durch CD44-vermitteltes Homing gelangen (Román et al 2002, von Andrian und Mempel 2003). CD45RA, eine Isoform des CD45, wird von nai-

ven und Effektor T-Zellen exprimiert und moduliert die Signalweitergabe des T-Zell-Rezeptors (Sallusto et al 2004, Janeway 2008). Für die Interaktion mit B-Lymphozyten und anderen antigenpräsentierenden Zellen sind auch die auf naiven T-Zellen und einigen Gedächtniszellen exprimierten Rezeptoren CD27 bzw. CD28 von großer Bedeutung. Auch diese Unterscheidungsgruppen wurden bereits zur Einteilung von T-Zellsubtypen verwendet (Sallusto et al 2004, Campbell et al 2009). Effektor-Gedächtniszellen weisen weder CD45RA noch CD62L auf und zirkulieren in Blut und Gewebe bis sie bei spezifischem Antigenkontakt rasche Effektorfunktionen ausführen können. Sie stellen also eine schnelle und spezifische Abwehr dar, die jedoch bei anhaltender Antigenbelastung schnell erschöpflich ist, während zentrale Gedächtniszellen ein größeres Teilungspotential aufweisen und zu Effektorzellen differenzieren können (Sallusto et al 2004, Pulendran und Ahmed 2006). SALLUSTO et al (2004) zeigen in ihrem Modell, dass die Differenzierung von naiven T-Zellen in die verschiedenen Subtypen beim Menschen abhängig ist von der Stärke und Dauer der Stimulation durch Zytokine und den T-Zell-Rezeptor beim ersten Antigenkontakt, wobei diese Stimulation im sekundären lymphatischen Gewebe erfolgt. Dies verdeutlicht, dass das Ausmaß des räumlichen und zeitlichen Aufeinandertreffens von naiven T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen Einfluss auf die Immunantwort und das immunologische Gedächtnis hat (Sallusto et al 2004, Pulendran und Ahmed 2006, Dimitrov et al 2009).

1.2 Schlaf und circadiane Rhythmik

Schlaf ist ein Ruhezustand, der zur Veränderung der Bewusstseinslage und vieler messbarer Vitalparameter führt. So sinken die Körpertemperatur und der Energieverbrauch bei vermehrtem Zellwachstum während des Schlafes (Oswald 1976, Berger und Phillips 1995). Dass Schlaf ein sehr differenzierter Vorgang mit verschiedenen Phasen ist, lässt sich durch polysomnographische Aufzeichnungen veranschaulichen (siehe Abbildung 1).

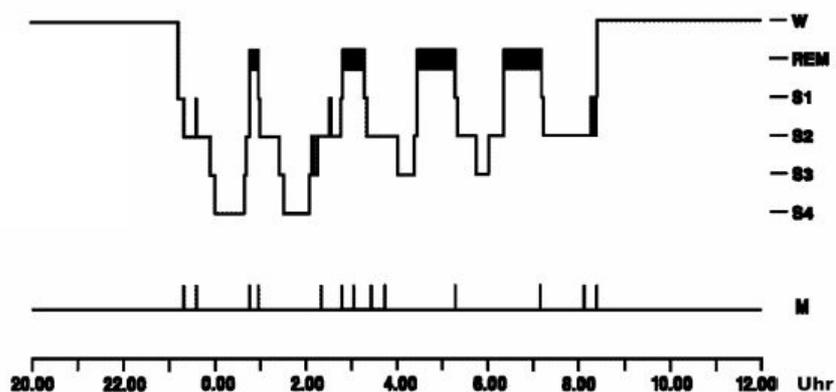


Abbildung 1 Schlafstadien eines gesunden Probanden.
W = wach, REM = Rapid Eye Movement, S1-4 = Schlafstadien 1-4, M = Movement,
(aus Marshall und Born 2002).

Dabei lassen sich fünf Schlafstadien abgrenzen, mit den Stadien 1 bis 4 (zunehmende Schlaftiefe) und dem Rapid Eye Movement (REM)-Schlaf. In der ersten Nachthälfte tritt vermehrt Tiefschlaf, auch Slow Wave Sleep (SWS) genannt, auf, der die Schlafstadien 3 und 4 umfasst, während in der zweiten Nachthälfte der Anteil des REM-Schlafes zunimmt und nur noch wenig Tiefschlaf zu verzeichnen ist. Die Schlafstadien werden dabei im Verlauf einer Nacht in 4-5 Zyklen durchlaufen.

Auch wenn viele Funktionen des Schlafes noch unbekannt sind, konnte beispielsweise die Bedeutung von Schlaf bei der Gedächtnisbildung vielfach aufgezeigt werden. So unterstützen sowohl der SWS als auch REM-Schlaf entscheidend die Gedächtnisbildung (Diekelmann und Born 2010). Schlaf dient außerdem der Förderung der Immunabwehr (Bryant et al 2004, Lange et al 2010, Besedovsky et al 2011) und umgekehrt führt eine Aktivierung des Immunsystems zu vermehrtem Schlafbedürfnis und zu Veränderungen in der Schlafarchitektur (Imeri und Opp 2009).

Circadiane Rhythmen helfen unserem Körper, sich auf täglich wiederkehrende Phänomene einzustellen. Es treten beispielsweise Veränderungen der körperlichen Aktivität und damit des Energiebedarfs, aber auch eine schwankende Exposition gegenüber Krankheitserregern auf. Schlaf und das circadiane System beeinflussen sich dabei gegenseitig. Schlaf ist ein Zeitgeber für die „master clock“ im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus, die wiederum über verschiedene Effektormechanismen die Körperzellen und ihre Funktionen synchronisiert (Dijk und von Schantz 2005, Schmidt und Lang 2007, Hastings et al 2008, Trepel 2008).

Viele Blutparameter weisen circadiane Tag-Nacht-Rhythmen auf, die auch bei kurzfristigem Schlafentzug bestehen bleiben. Dies trifft auch für die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Cortisol- und Lymphozytenkonzentrationen im Blut zu, wobei meist eine leichte Abschwächung der Amplituden oder zeitliche Verschiebungen der Rhythmen bei Schlafentzug zu beobachten sind (Born et al 1997b, Charloux et al 2001). Wie in Abbildung 2 dargestellt, sind Aldosteronkonzentrationen im Blut hingegen stärker schlafabhängig als circadian reguliert (Charloux et al 1999, 2001).

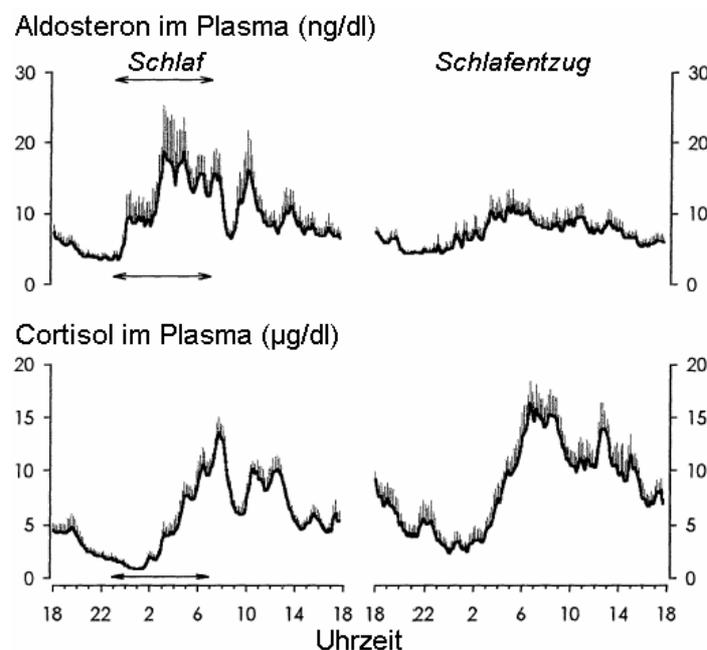


Abbildung 2 Effekt von Schlafentzug auf die 24-Stunden-Profile von Aldosteron und Cortisol im Plasma in 8 Probanden (modifiziert aus: Charloux et al 2001).

Während Aldosteron und die meisten T-Zell-Subtypen ein nächtliches Maximum aufweisen, zeigen das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), Cortisol, die

Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sowie cytotoxische Effektor-T-Zellen ein nächtliches Minimum mit einem Anstieg im Blut gegen Morgen (Charloux et al 2001, Marshall und Born 2002, Hurwitz et al 2004, Dimitrov et al 2009).

1.3 Aldosteron und das neuroendokrine System

In der Nebennierenrinde werden u.a. das Mineralokortikoid Aldosteron und das Glukokortikoid Cortisol gebildet. Die Cortisolfreisetzung erfolgt pulsatil durch die Wirkung von ACTH aus der Hypophyse, welches wiederum nach Abgabe von Corticotropin freisetzendem Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus ausgeschüttet wird. Diese Konstellation wird als Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) bezeichnet, wobei eine negative Rückkopplung mit Inhibition der jeweils übergeordneten Steuerungshormone besteht (Gwinup 1967). Cortisol entfaltet über Aktivierung des cytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor (GR) seine Wirkungen auf zahlreiche Stoffwechselfvorgänge, den Kreislauf und das Immunsystem. Letzteres beinhaltet insbesondere eine Hemmung der Lymphozytenbildung und der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Zur Aldosteronfreisetzung kommt es nach Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), bei erhöhter Kaliumkonzentration im Blut sowie durch Wirkung von ACTH (Bataillard et al 1992, Charloux et al 2001). Aldosteron spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Blutvolumen und Elektrolythaushalt, indem es über den cytosolischen Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) auf die distalen Nephronen in der Niere wirkt. Außerdem stimuliert Aldosteron über Aktivierung von T-Lymphozyten und Förderung der Zytokinproduktion das Immunsystem (Weber 2003, Brown 2008, Herrada et al 2010).

Neben der HHN-Achse stellt auch das vegetative Nervensystem mit sympathischen und parasympathischen Anteilen ein wichtiges vom Hypothalamus integriertes System dar, das über Innervation fast aller Körperorgane und Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark ein Träger vielfältiger Funktionen ist (Schmidt und Lang 2007).

1.4 Stand der Forschung

Das Immunsystem reagiert im tageszeitlichen Verlauf unterschiedlich auf äußere Einflüsse. So konnte HALBERG zeigen, dass Mäuse während ihrer Ruheperiode am Tage mit einer höheren Letalitätsrate auf eine Endotoxininjektion reagierten als in ihrer nächtlichen Aktivitätsperiode (Halberg et al 1960). Bei Ratten führte die Gabe des T-Zell-stimulierenden Concavalin A während der Ruheperiode zu einer stärkeren Zellproliferation in den Lymphknoten als in der aktiven Phase (Bonacho et al 2001). Ob nach Antigenexposition geschlafen wird oder nicht, hat beim Menschen Einfluss auf die immunologische Reaktion nach einer Hepatitis-A Impfung. Nach Schlafentzug ließen sich nur halb so hohe Antikörpertiter und halb so viele antigenspezifische Th-Zellen im Blut messen (Lange et al 2003, 2011). Als messbare Korrelate des Einflusses von Tageszeit und Schlaf auf das Immunsystem konnten Rhythmen von Immunzellzahlen, Hormon- und Zytokinkonzentrationen im peripheren Blut identifiziert werden (Born et al 1997b, Haus und Smolensky 1999, Marshall und Born 2002, Dimitrov et al 2004, 2007, 2009). Die circadian schwankenden Lymphozytenzellzahlen im Blut sind Ausdruck von Wanderungsbewegungen zwischen Knochenmark, Blut und dem sekundären lymphatischen Gewebe (Fauci 1975, Ottaway und Husband 1992, von Andrian und Mempel 2003, Dimitrov et al 2009). Beim Menschen weisen T-Lymphozyten dabei ein frühes nächtliches Maximum ihrer Zahl im Blut mit einem Abfall um annähernd 40% bis zum Minimum um die Mittagszeit auf (Born et al 1997, Haus und Smolensky 1999, Dimitrov et al 2009). DIMITROV et al (2009) konnten in ihrer Humanstudie zeigen, dass der beobachtete Abfall der T-Zellzahlen bei den naiven Subtypen am ausgeprägtesten ist. Cortisol induziert vermutlich über den GR ein Homing von T-Zellen in das Knochenmark und führt damit zum Absinken der Zellzahlen im Blut (Ottaway und Husband 1992, Janeway 2008, Dimitrov et al 2009). In letztgenannter Studie ergab sich jedoch auf naiven T-Zellen eine im Vergleich zu anderen Subtypen geringere Expression des GR, obwohl sie durch Cortisol besonders stark erniedrigt wurden, was die Frage nach weiteren Steuerungsmechanismen aufwirft. Im Rahmen des starken morgentlichen Cortisolanstiegs kann von einer Abwanderung der T-Lymphozyten in das Knochenmark ausgegangen werden, wobei durch den erhöhten Cortisolspiegel gleichzeitig ein Homing in das sekundäre lymphatische Gewebe verhindert wird (Ottaway und

Husband 1992, 1994, Sackstein und Borenstein 1995, Lange et al 2010). Trotz niedrigerem Cortisolspiegel bei normalem Nachtschlaf vs. Schlafentzug kam es jedoch bei BORN et al zu einem vermehrten nächtlichen Absinken der Th-Zellzahlen im Blut in der Schlafbedingung (Born et al 1997b). Das frühe nächtliche Absinken der naiven T-Zellen könnte zugunsten des sekundären lymphatischen Gewebes geschehen. So kommt es bei Schafen während des Schlafes zu einer Verminderung der Flussrate und der Lymphozytenzahlen in efferenten Lymphgefäßen, was zu einer nächtlichen Akkumulation von Lymphozyten in den Lymphknoten führen könnte (Dickstein et al 2000).

Es gibt also Hinweise, dass ein schlafabhängiger Mechanismus die nächtliche Umverteilung von Lymphozyten beeinflusst. Aldosteron- bzw. MR-abhängige Wirkungen könnten hierbei eine Rolle spielen (McEwen et al 1997). Bei Ratten führte die 7-tägige Gabe von Aldosteron zu einem Abfall der Lymphozytenzahlen, insbesondere der Th-Zellen im Blut, wobei sowohl der MR als auch der GR auf den Leukozyten exprimiert wird (Miller et al 1994). Auf menschlichen Lymphozyten sind ebenfalls beide Rezeptortypen vorhanden (Armanini et al 1988). Durch MR-Blockade konnten starke Veränderungen in der Zytokinproduktion von T-Zellen beobachtet werden (Dimitrov et al 2004). Ebenfalls beim Menschen konnte gezeigt werden, dass akuter Schlafentzug erstens zu einem deutlich verminderten nächtlichen Aldosteronanstieg und zweitens zu einem späteren Abfall der T-Zellzahlen im Blut führt (Born et al 1997b, Charloux et al 2001). Da Cortisol bzw. Corticosteron eine deutlich höhere Affinität zum MR als zum GR aufweist, wäre eine physiologische nächtliche Aktivierung des MR auch durch geringe Cortisolkonzentrationen im Blut möglich, was das Verhältnis der MR/GR-Aktivierung zugunsten des MR verschieben würde (Spencer et al 1993, Funder 1997, McEwen et al 1997, Schmidt und Lang 2007). Akute Effekte einer MR-Blockade auf den Verlauf der Lymphozytenzahlen im Blut waren bislang nicht Gegenstand der Forschung. Ob und wie eine Blockade des MR beim Menschen die nächtliche Migration von T-Zellen beeinflusst, soll durch die vorliegende Studie untersucht werden.

1.5 Fragestellung

Die ausgeprägte circadiane Rhythmik der T-Zellzahlen im Blut ist, wie bereits erläutert, am ehesten Ausdruck von Wanderungsbewegungen zwischen Blut, Knochenmark und sekundärem lymphatischem Gewebe. Hierbei ist Cortisol besonders für die naiven T-Zellen von zentraler Bedeutung. Welche Rolle Aldosteron- bzw. MR-abhängige Mechanismen bei der nächtlichen Umverteilung von T-Zellen aus dem Blut spielen, ist bislang noch nicht untersucht worden. So könnte die nächtliche Belegung des MR durch niedrige Cortisol- bzw. hohe Aldosteronspiegel zu einem Homing der naiven T-Zellen in die Lymphknoten führen. Die Gabe des MR-Antagonisten Spironolacton sollte dieses frühe nächtliche Abwandern der T-Zellen aus dem Blut entsprechend unterdrücken, was sich durch höhere Zellzahlen in der ersten Nachthälfte zeigen würde. Dieser Einfluss der MR-Blockade ist in erster Linie für naive T-Zellen und zentrale T-Gedächtniszellen zu erwarten, da nur diese Subtypen durch ihre Oberflächenmoleküle zum Homing in das sekundäre lymphatische Gewebe in der Lage sind.

Folgende Fragen sollen gestellt werden:

- (a) Welche Auswirkungen hat die akute Gabe von Spironolacton versus Placebo auf den nächtlichen Abfall der T-Zellzahlen im Blut?
- (b) Werden naive, zentrale Gedächtnis-, Effektor-Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen unterschiedlich beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchspersonen

An der Studie nahmen 16 gesunde Männer im Alter von 18-27 Jahren (Mittleres Alter 20 Jahre) teil, wobei aus organisatorischen Gründen nur bei 11 Probanden eine Messung der T-Zellzahlen erfolgte. Ein weiterer Doktorand und ich führten eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung ergänzt durch eine Blutentnahme mit Routinelabor durch, um akute oder chronische Erkrankungen auszuschließen. Infektionen, Rauchen oder Medikamenteneinnahme führten zum Ausschluss von der Studie. Die Probanden waren normalgewichtig (BMI zwischen 20 und 25 kg/m²), hatten einen regelmäßigen Schlaf-Wach-Rhythmus und wurden gebeten, in der Woche vor Versuchsbeginn nur zwischen 23 und 7 Uhr zu schlafen. Ferner sollten sie an den Versuchstagen keinen Alkohol und ab 12 Uhr keine koffeinhaltigen Getränke zu sich nehmen. Alle Probanden verbrachten mindestens eine Eingewöhnungsnacht im Schlaflabor. Hierbei wurde eine Venenverweilkanüle gelegt und Elektroden zur polysomnographischen Aufzeichnung aufgeklebt.

Die Probanden wurden vor Untersuchungsbeginn über den Ablauf der Studie und mögliche Nebenwirkungen des eingesetzten Medikamentes informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde vor Beginn der Versuche durch die Ethikkommission der Universität Lübeck genehmigt (siehe Anhang 7.3)

2.2 Versuchsablauf

Das Studiendesign wurde von Prof. Jan Born, Ulrike Rimmele, Flurina Meier und Dr. Tanja Lange entwickelt und von einem weiteren Doktoranden und mir feinabgestimmt und durchgeführt. Die Studie wurde placebokontrolliert, randomisiert und doppelt verblindet angelegt. Die Experimente der Studie fanden von August bis Dezember 2008 in den Schlaflaboren des neuroendokrinen Institutes statt. Im Rahmen der Versuche der Studie wurden neben den Auswirkungen von Spironolacton auf Schlaf und immunologische Parameter auch Einflüsse auf Gedächtnisfunktionen untersucht, weshalb zusätzlich zum unten beschriebenen Ablauf umfangreiche Gedächtnistests mit einem Lern-

vormittag jeweils 2 Tage vor den Experimentalnächten sowie verschiedene psychologische Tests durchgeführt wurden. Diese sollen hier nur insoweit erwähnt werden, wie sie von Bedeutung für die von mir behandelte Fragestellung sind oder als Störgrößen einen Einfluss haben könnten.

Die Probanden wurden während zweier Experimentalnächte, die 14 Tage auseinanderlagen, von 22.30 Uhr an für 11.5 Stunden untersucht, wobei in balancierter Reihenfolge an einem der Termine Spironolacton und am anderen Termin Placebo gegeben wurde. Die Tabelle 2 zeigt den Ablauf einer Experimentalnacht.

Zeitpunkt	Prozedur
21.30 Uhr	Ankunft der Probanden
Anschließend	Legen der Venenverweilkanüle, Kleben der EEG-Elektroden
23.00 Uhr	Erste Gabe von Placebo/Spironolacton; Licht aus Erste Blutabnahme vor Medikamentengabe, dann: <u>halbstündlich</u> Blutabnahme für Cortisol, ACTH; <u>1.5-stündliche</u> Blutabnahme für T-Lymphozyten, Katecholamine, Aldosteron
04.00 Uhr	Zweite Gabe von Placebo/Spironolacton; sofort danach Licht aus
07.00 Uhr	Wecken der Probanden Ab hier: Katecholamine ebenfalls halbstündlich
10.00 Uhr	Ende der Experimentalnacht

Tabelle 2 Ablauf einer Experimentalnacht. EEG = Elektroenzephalogramm; ACTH = Adrenocorticotropes Hormon; Katecholamine: Adrenalin und Noradrenalin.

Die Gabe von Placebo bzw. Spironolacton erfolgte in Form einer Kapsel (Firma Ratiopharm, Ulm, Deutschland), wobei aus pharmakokinetischen Gründen an den beiden Zeitpunkten (23.00 und 04.00 Uhr) jeweils 200 mg des Verums gegeben wurden. Die zweite Gabe erfolgte hierbei unter Berücksichtigung des psychologischen Teils der Experimente, um morgens und vormittags ausreichend hohe Konzentrationen im zentralen Nervensystem (ZNS) zu erreichen. Spironolacton ist ein Aldosteron-Antagonist, der kompetitiv den Mineralocorticoid-Rezeptor hemmt. Lange Zeit wurde es als Diuretikum bei der Blutdruckeinstellung verwendet und kommt heute besonders bei der Behandlung der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz zum Einsatz.

Die Blutentnahmen führten wir über eine Venenverweilkanüle am Unterarm durch, die über einen dünnen Perfusorschlauch mit einem Dreiwegehahn und Infusionssystem im Nebenraum verbunden war. Dadurch blieben die nächtlichen Blutentnahmen von den Probanden unbemerkt. Im Laufe einer Experimentalnacht wurden insgesamt 155 ml Blut abgenommen. Die so gewonnenen Proben wurden direkt nach den Abnahmen bearbeitet (siehe Kapitel 2.4). Um eine Thrombosierung der Kanüle zu verhindern, haben wir über 11.5 Stunden ca. 700 ml isotonische Kochsalzlösung infundiert.

Um schon erste Anzeichen einer schweren Unverträglichkeitsreaktion auf Bestandteile des Medikamentes zu erkennen, wurden zwei Elektroden für ein EKG-Monitoring auf der Brustwand befestigt. Ferner wurde um 23.00 Uhr und ab 07.00 Uhr alle 30 min der Blutdruck gemessen.

Zur Erfassung von Wachheit, Aufmerksamkeit und Befindlichkeit haben die Probanden am Morgen nach den Experimentalnächten einen mehrdimensionalen Befindlichkeitsfragebogen (MDBF; Steyer et al 1997) sowie die Stanford-Schläfrigkeits-Skala (Hoddes et al 1973), die den Grad der Schläfrigkeit abfragt, ausgefüllt (siehe Anhang). Außerdem wurden die Probanden am Morgen nach den Experimentalnächten mittels eines Fragebogens nach aufgetretenen Nebenwirkungen der Medikamentengabe und nach ihrer Einschätzung, ob sie Placebo oder Verum erhalten haben, befragt.

2.3 Schlaf

Von 23.00 bis 07.00 Uhr wurde der Schlaf polysomnographisch mithilfe der Elektroenzephalographieschreiber Neurofax (Nihon Khoden, Japan) oder Brain Amp (Brain Products, Gilching, Deutschland) digital aufgezeichnet. Es wurden ein Elektroenzephalogramm (EEG), ein Elektrookulogramm (EOG) sowie ein Elektromyogramm (EMG) abgeleitet. Die dabei verwendeten gesinterten Silber/Silber-Chloridelektroden wurden für die Ableitung des EEGs (Positionen C3 und C4) nach dem 10:20-System nach JASPER (1958) und für das EOG und EMG basierend auf den Anleitungen von RECHTSCHAFFEN und KALES (1968) platziert. Die Übergangswiderstände der Elektroden blieben dabei stets unter 5k Ω . Die Auswertung der polysomnographischen Daten erfolgte nach Beendigung aller Experimente mithilfe einer Software zur EEG-Auswertung (Schlaf-Aus 1.5, Steffen Gais, 2005) nach den Kriterien von RECHTSCHAFFEN und KA-

LES (1968). Hierbei ordneten wir jedem 30-Sekundenintervall ein Schlafstadium zu. Die Hauptkriterien der Schlafstadieneinteilung sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Schlafstadien	Wach	REM	1	2	3	4
EEG	α *	θ	θ , $\alpha < 50\%$	θ	$\delta > 20\%$	$\delta > 50\%$
Amplitude μV	20–50				> 75	> 75
Frequenz Hz	8–13	4–7	4–7	4–7	0.5–2	0.5–2
Besonderheiten		Sägezahnwellen		K-Komplex, Schlafspindeln		
EOG	Blickbewegungen	schnelle Bewegungen	Augenrollen	kaum messbar		
EMG	Aktiv	kaum messbar	mit zunehmender Schlafentiefe abnehmend			

Tabelle 3 Merkmale der Schlafstadien. EEG = Elektroenzephalogramm: α = alpha-, θ = theta-, δ = delta-Aktivität. * bei geschlossenen Augen. Sägezahnwellen = Sägezahnförmige Wellen im θ -Bereich; K-Komplex = biphasische, initial negative Welle mit einer Frequenz von 0.5–2 Hz; Schlafspindeln = 12–14 Hz-Spindel mit wechselnder Amplitude; EOG = Elektrookulogramm, EMG = Elektromyogramm, REM = Rapid Eye Movement (modifiziert aus: Lange 2003).

2.4 Blutparameter

2.4.1 Hormone

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Cortisol und Aldosteron wurden die Blutentnahmen mit Serum-Monovetten und für die Messung von ACTH mit EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden sofort nach Abnahme zentrifugiert und der Überstand bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Mit den Blutproben zur Katecholaminbestimmung wurde ebenso verfahren, für die Abnahme kamen jedoch RECIPE-Röhrchen zum Einsatz (RECIPE Chemicals, München, Deutschland). Die Hormon-Messungen wurden im neuroendokrिनologischen Labor durchgeführt. Tabelle 4 gibt Auskunft über die dabei verwendeten Assays und deren Leistungsdaten.

Hormon	Bestimmung in:	Assay	analytische Sensitivität; Interassayvariationskoeffizient	Hersteller (des Assays bzw. der Geräte)
Cortisol	Serum	Cortisol IMMULITE (Immunoassay)	0.2 µg/dl; < 10%	Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA
ACTH	Plasma	ACTH IMMULITE (Immunoassay)	9 pg/ml; < 9.5%	
Aldosteron	Serum	Coat-A-Count Aldosteron (Radioimmunoassay)	11 pg/ml; < 16%	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
Adrenalin	Plasma	Standard HPLC	15 pg/ml; < 6.5%	Chromsystems, München, Deutschland
Noradrenalin			15 pg/ml; < 6%	

Tabelle 4 Hormonbestimmungen. ACTH = Adrenocortikotropes Hormon; HPLC = Hochleistungs-Flüssigchromatographie

2.4.2 Subpopulationen der T-Lymphozyten

Die Bestimmung der T-Lymphozytenzahlen erfolgte, wie in Tabelle 2 dargestellt, von 23.00 bis 09.30 Uhr alle 90 Minuten, wobei jeweils 1 ml Blut in Natriumheparin-Vacutainer (BD Bioscience, San Jose, USA) gefüllt wurde. Die Proben wurden von Alexander Tschulakow (Dipl. Biologe) sofort nach jeder Abnahme abgeholt und analysiert. Die absoluten Zahlen der CD3⁺ T-Zellen, der CD4⁺ Th-Zellen und der CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen in den entnommenen Proben wurden unter Verwendung eines sogenannten „lyse no-wash“-Verfahrens mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Hierbei wurden die Th-Zellen und cytotoxischen T-Zellen jeweils in folgende Subtypen unterteilt: Naive (CD62L⁺/CD45RA⁺), Zentrale Gedächtnis- (CD62L⁺/CD45RA⁻), Effektor-Gedächtnis- (CD62L⁻/CD45RA⁻) und terminal differenzierte Effektor- (CD62L⁻/CD45RA⁺) Subpopulationen. Zunächst wurden 50 µl einer unbehandelten Blutprobe mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern in sogenannten Trucount-Röhrchen mit einer definierten Anzahl an Microsperen (Beads) (BD Bioscience, San Jose, USA) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es kamen die Antikörper Anti-CD3/APC-CY7 (Allophycocyanin-Cyanin), Anti-CD4/PE-CY7 (Phycoerythrin-Cyanin), Anti-CD8/PerCP (Peridinin-Chlorophyll Protein), Anti-CD62L/FITC (Fluorescein Isocyanat) und Anti-CD45RA/PE (alle von BD Bioscience, San Jose, USA) zum Einsatz. Da-

nach wurde die Probe mit 0.45 ml Lysierungsmittel für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) (BD Bioscience, San Jose, USA) für weitere 15 min inkubiert um die Erythrozyten zu lysieren. Um einen Verlust von Beads zu vermeiden, wurde auf das Waschen der Probe verzichtet. Mindestens 10 000 T-Zellen wurden so je Probe mit einem FACS-Zytometer (Canto, BD Bioscience, San Jose, USA) unter Benutzung von DIVA-Software (BD Bioscience, San Jose, USA) analysiert und die absoluten Zellzahlen für die einzelnen T-Zell-Subpopulationen errechnet.

2.5 Statistik

Die Präsentation der Daten erfolgt als arithmetisches Mittel mit dem zugehörigen Standardfehler (standard error of mean, SEM). Die Kontrollvariablen Befindlichkeit, Müdigkeit und Blutdruck wurden mithilfe des t-Tests auf Bedingungsunterschiede hin analysiert.

Die Hormonwerte und T-Zellzahlen wurden mithilfe der Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) untersucht und signifikante Ergebnisse mit paarweisen t-Tests analysiert. Als Faktoren für die ANOVA gingen die Bedingung (Spironolacton vs. Placebo), die Werte der ersten versus zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraums (mit jeweils 4 Messzeitpunkten: 23.00-3.30 Uhr vs. 5.00-9.30 Uhr: Faktor Hälfte) sowie die einzelnen Messzeitpunkte (Faktor Zeit) ein. Die Freiheitsgrade wurden nach Greenhouse-Geisser korrigiert.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Schlaf, Schläfrigkeit und Befindlichkeit

Die Ergebnisse der polysomnographischen Auswertung und der Stanford-Schläfrigkeits-Skala wurden für die beiden Bedingungen Spironolacton und Placebo miteinander verglichen. Dabei ließen sich, wie in Tabelle 5 dargestellt, keine signifikanten Unterschiede in der Schläfrigkeit, der Einschlaf latenz, der Schlafdauer und dem Anteil der Schlafstadien an der Gesamtschlafdauer feststellen. Das gleiche gilt für die Ergebnisse des mehrdimensionalen Befindlichkeitsfragebogens. Es traten keine behandlungsbedürftigen Nebenwirkungen auf. Entsprechend war bei allen Probanden die reguläre Beendigung der Experimente ohne vorzeitigen Abbruch möglich. Die Versuchspersonen konnten nicht zwischen Verum- und Placebogabe unterscheiden.

	Spironolacton		Placebo		p
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Polysomnografische Auswertung:					
Einschlaf latenz (min)	14.50	3.48	19.00	4.49	0.238
Schlafdauer (min)	445.70	5.50	444.80	5.95	0.693
Wach (%)	1.90	0.34	1.27	0.43	0.389
Schlafstadium 1 (%)	8.22	1.24	7.93	0.74	0.940
Schlafstadium 2 (%)	53.25	1.61	52.18	3.09	0.719
Tiefschlaf (%)	17.25	2.03	18.95	1.79	0.718
REM-Schlaf (%)	19.11	1.74	19.36	1.22	0.759
Psychologische Kontrolltests:					
Schläfrigkeit (SSS)	3.55	0.39	3.30	0.42	0.279
Gute Stimmung (MDBF)	14.90	1.09	15.10	1.06	0.785
Wachheit (MDBF)	11.50	0.89	12.60	1.16	0.154
Ruhe (MDBF)	16.00	0.83	15.70	1.87	0.496

Tabelle 5 Schlaf, Schläfrigkeit und Befindlichkeit. Tiefschlaf (=slow wave sleep, SWS) bestehend aus Schlafstadien 3 und 4; SEM = Standardfehler; SSS = Stanford-Schläfrigkeits-Skala: Die Schläfrigkeit wurde von den Probanden auf einer Skala von 1 („Ich fühle mich aktiv, lebhaft, aufmerksam oder sehr wach“) bis 8 („Ich schlafe“) kurz nach dem Aufstehen angegeben.; MDBF = mehrdimensionaler Befindlichkeitsfragebogen: Die drei aufgelisteten Parameter wurden aus einem Fragebogen mit 24 Aspekten/Fragen errechnet und konnten Werte zwischen 5 und 20 (einem Punktwert von 20 entspricht: sehr gute Stimmung, sehr wach, sehr ruhig) annehmen.

3.2 Vitalparameter

Auch wenn im Rahmen der Studie nur 400 mg Spironolacton, verteilt auf zwei dicht beieinander liegende Zeitpunkte, gegeben wurden, sollte die Messung des Blutdrucks einen eventuell eintretenden Kreislauffeffekt ausschließen. Wie erwartet, waren der systolische und diastolische Blutdruck in der Placebo- versus Spironolactongruppe, wie in Tabelle 6 dargestellt, vergleichbar.

	Spironolacton		Placebo		p
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
systolischer Blutdruck (mmHg)	116.8	1.65	117.5	1.95	0.70
diastolischer Blutdruck (mmHg)	69.9	2.07	70.1	1.88	0.93

Tabelle 6 Blutdruckwerte. SEM = Standardfehler, Blutdruckwerte über alle morgentlichen Messzeitpunkte gemittelt.

3.3 Hormone

3.3.1 Cortisol und ACTH

Die Cortisolkonzentrationen im Serum zeigten in beiden Bedingungen den typischen Verlauf mit einem Minimum in der ersten Nachthälfte und maximalen Werten am Morgen (Abbildung 3).

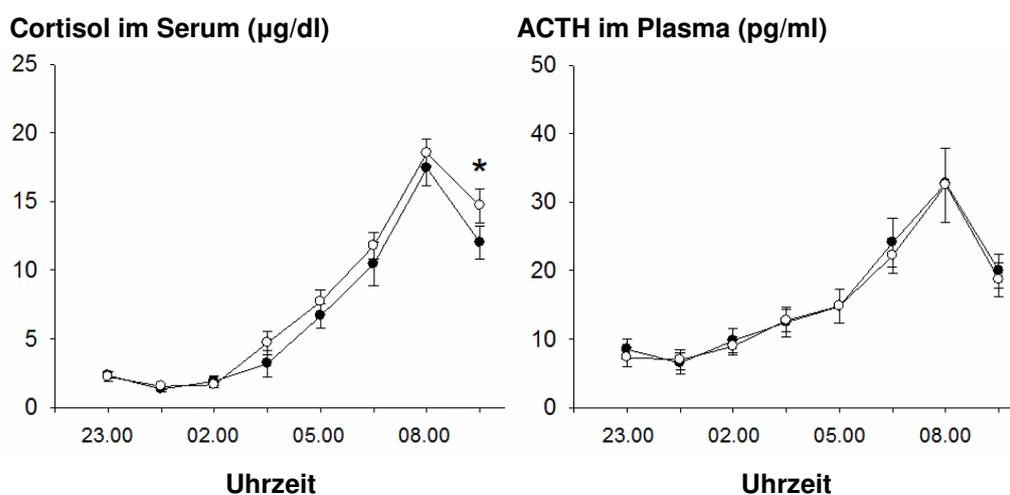


Abbildung 3 Cortisol und Adrenocortikotropes Hormon (ACTH) in Spironolacton- (○) vs. Placebogruppe (●). (*) = $p < 0.05$

Bei Betrachtung der halbstündlichen Messwerte fällt ein kleiner Peak um 4.30 Uhr auf (in Abbildung 3 sind zur Vergleichbarkeit mit den Lymphozytenzahlen nur die 1.5-stündliche Werte berücksichtigt), der sich durch das kurze Wecken zur Medikamentengabe um 4.00 Uhr erklären lässt. Die ANOVA ergab bezüglich Cortisol einen Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Bedingung x Hälfte. Nachfolgender t-Test ergab um 9.30 Uhr ein signifikant höherer Cortisolwert bei Spironolactongabe ($p = 0.026$). Die ACTH-Konzentrationen im Plasma zeigten ebenfalls den charakteristischen Verlauf, der die Rolle des ACTH als Steuerhormon für Cortisol widerspiegelt. Es ist ebenfalls ein nächtliches Minimum und ein morgentlicher Anstieg mit einem Maximum um 7.30 Uhr sowie ein kleiner Peak um 4.30 Uhr zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen sind für ACTH nicht festzustellen (p stets > 0.1).

3.3.2 Aldosteron

Die Aldosteronkonzentrationen im Serum weisen ihr Minimum in der frühen Nacht auf, steigen dann an und erreichen ihr Maximum nach dem Erwachen (siehe Abbildung 4). Von 0.30 bis 8.00 Uhr ließen sich in der Spironolactonbedingung etwas höhere Aldosteronwerte messen, wobei die ANOVA einen Trend für den Interaktionseffekt Bedingung x Zeit x Hälfte zeigt ($p = 0.073$).

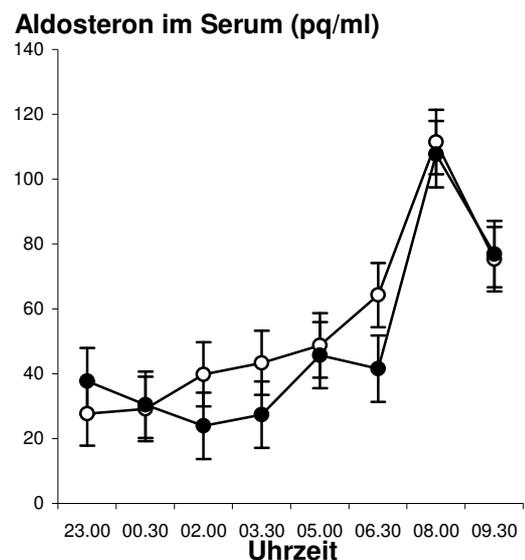


Abbildung 4 Aldosteronkonzentrationen in der Spironolacton- (○) vs. Placebogruppe (●)

3.3.3 Katecholamine

Bei den Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen sind über die gesamte Dauer der Ruhephase hinweg niedrige Werte mit nur geringen Schwankungen festzustellen. Erst nach dem morgentlichen Wecken kommt es zum Anstieg der

Katecholamine im Blut. Signifikante Bedingungsunterschiede sind zu keinem Zeitpunkt festzustellen (p stets > 0.1).

3.4 Subpopulationen der T-Lymphozyten

Die mithilfe der FACS-Analyse ermittelten absoluten T-Zellzahlen sind in Abbildung 5 dargestellt. Betrachtet man die T-Zellen insgesamt (A), zeigt sich in der Placebobedingung ein Peak um 0.30 Uhr mit einem fast kontinuierlichen Abfall bis zur letzten Messung um 9.30 Uhr, der durch einen kleinen Anstieg

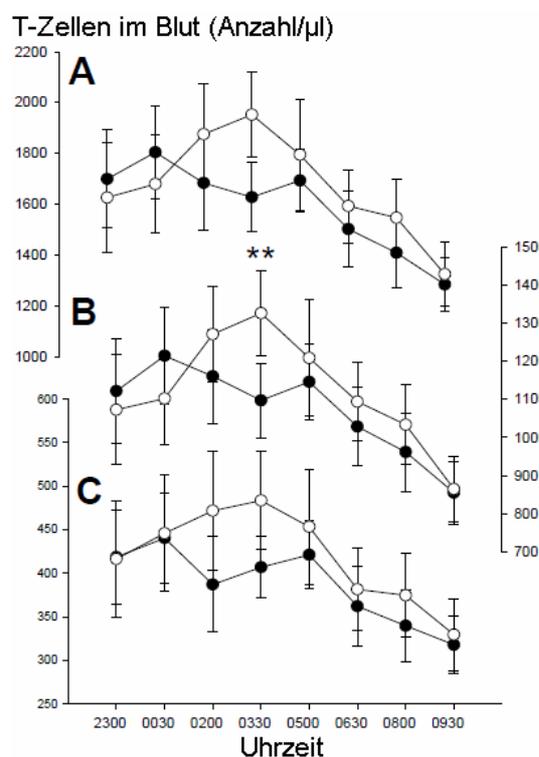


Abbildung 5 T-Zellzahlen im peripheren Blut. A = alle T-Zellen (CD3+), B = T-Helferzellen (CD4+), C = cytotoxische T-Zellen (CD8+), (**) = $p < 0.01$, in der Spironolacton- (○) vs. Placebogruppe (●)

von 3.30 bis 5.00 Uhr unterbrochen wird. Nach Spironolacton-Gabe ließ sich ein stärkerer Anstieg bis 3.30 Uhr mit darauffolgendem Absinken der T-Zellzahlen um über 30% bis zum Morgen beobachten. Die Th-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einer Verschiebung des Maximums um drei Stunden von 0.30 Uhr bei Placebo- auf 3.30 Uhr bei Verum-Gabe. Um 3.30 Uhr waren in der Placebobedingung signifikant weniger Th-Zellen im Blut zu verzeichnen ($p < 0.01$) während für die Gesamt-T-Zellen in der ANOVA ein

Trend festzustellen war. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Subtypen (siehe Abbildung 6) war dieser Effekt bei den naiven Th-Zellen um 3.30 Uhr signifikant. Die Zahlen der zentralen Th-Gedächtniszellen und der naiven cytotoxischen T-Zellen wiesen in der ANOVA einen ähnlichen Trend auf, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

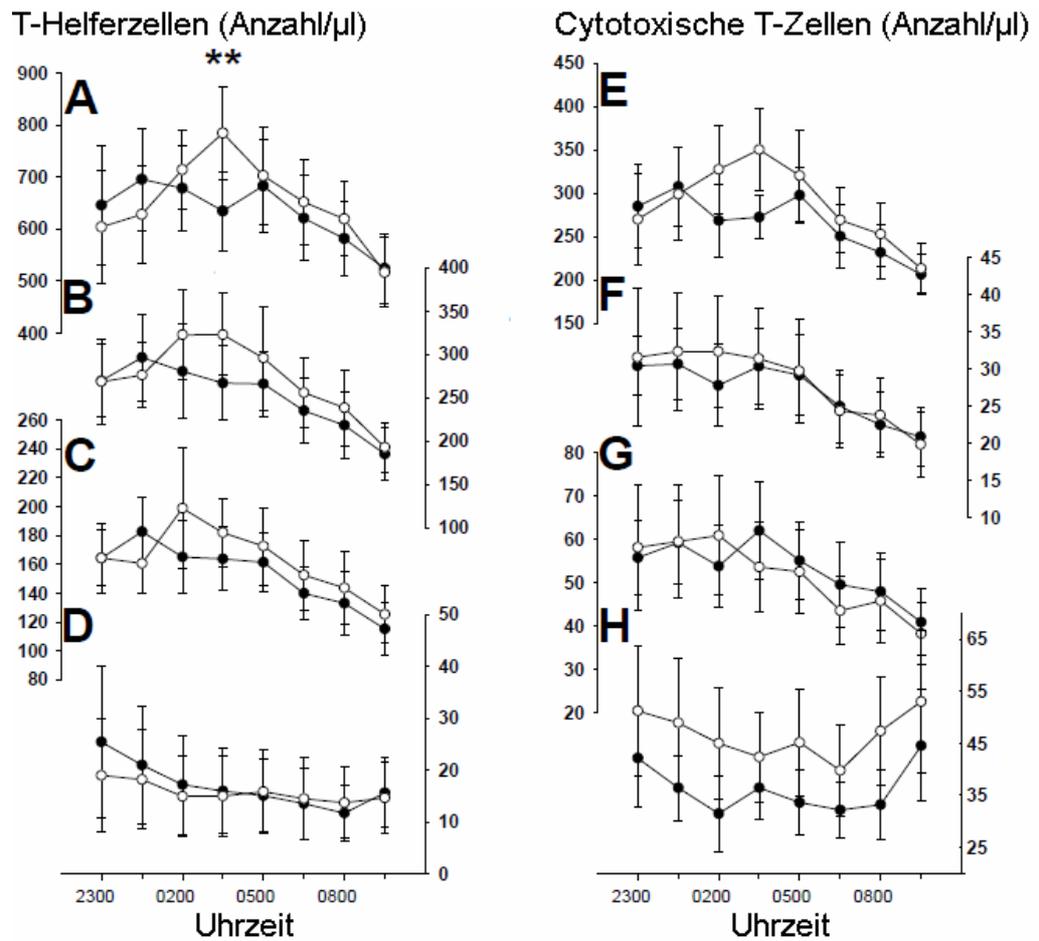


Abbildung 6 Subtypen der T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen.
A/E = Naive T-Zellen (CD45RA⁺CD62L⁺), **B/F** = zentrale Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD62L⁺),
C/G = Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD62L⁻), **D/H** = Effektor T-Zellen (CD45RA⁺CD62L⁻),
 (**) = p < 0.01, in der Spironolacton- (○) vs. Placebogruppe (●)

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die naiven und zentralen Gedächtnis-Th-Zell-Subtypen in ihrem Anteil an den Gesamt-T-Zellzahlen mit über zwei Drittel stark ins Gewicht fallen. Bis auf die Subpopulation der cytotoxischen Effektor-T-Zellen zeigten alle Subtypen einen nächtlichen Zellzahlabfall mit Beginn innerhalb der ersten Nachthälfte.

4. Diskussion

Ziel der Experimente war es, herauszufinden, ob und wie der MR-Antagonist Spironolacton die nächtliche Umverteilung der T-Zellen aus dem Blut beeinflusst. Dazu untersuchten wir im Schlaflabor 11 gesunde männliche Probanden und konnten im Einklang mit unserer Hypothese feststellen, dass sich der frühe nächtliche Abfall der T-Zellzahlen im Blut durch Gabe von 200 mg Spironolacton kurz vor dem nächtlichen Schlaf unterdrücken ließ, wobei die Differenzierung nach T-Zellsubtypen einen signifikanten Effekt bei den naiven Th-Zellen zeigte.

4.1 Hormone

Schlaf, neuroendokrines System und das Immunsystem zeigen vielfältige wechselseitige Beziehungen (Besedovsky und Sorkin 1977, Ottaway und Husband 1994, Marshall und Born 2002, Lange et al 2010). Deshalb wurden im Rahmen der Experimente dieser Arbeit der Schlaf und die wichtigsten, für ihren Einfluss auf das Immunsystem bekannten Hormone mituntersucht. Während wir beim Schlaf keine Unterschiede zwischen Placebo- und Spironolactonbedingung feststellen konnten (siehe Tabelle 5), zeigten sich bei den Hormonmessungen teils signifikante Unterschiede, die im Folgenden zusammen mit den nächtlichen Konzentrationsverläufen diskutiert werden sollen.

4.1.1 Cortisol und ACTH

Das in der Nebennierenrinde produzierte Cortisol unterliegt genau wie sein Steuerungshormon ACTH aus der Hypophyse einer ausgeprägten circadianen Rhythmik (Marshall und Born 2002, Schmidt und Lang 2007). Diese konnten wir in ihrem nächtlichen Verlauf in unserer Arbeit nachvollziehen.

Da sich die Konzentrationen zwischen Placebo- und Spironolactonbedingung nicht wesentlich unterschieden, sollen sie zunächst gemeinsam betrachtet und mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen verglichen werden. Bei der Einordnung der in Abbildung 3 aufgezeigten Ergebnisse ist zu bedenken, dass die pulsatile Ausschüttung durch die Darstellung des arithmetischen Mittels der Hormonwerte aller Probanden nicht erkennbar ist (Hellman et al 1970, Marshall und Born 2002). Die ACTH- und Cortisol-Werte zeigen den typischen

aus der Literatur bekannten Verlauf (Born et al 1997b, Kronfol et al 1997, Dimitrov et al 2009). Ein kleiner Peak um 4.30 Uhr unterbricht den ansonsten kontinuierlichen Anstieg der Hormonkonzentrationen im Blut und ist wohl auf das kurze Wecken um 4.00 Uhr zur 2. Medikamentengabe zurückzuführen. Durch den mit der Weckreaktion verbundenen kurzzeitigen Stress könnte es zur Aktivierung der HHN-Achse gekommen sein (Kudielka et al 2004).

Bei der Differenzierung zwischen Spironolacton- und Placebogruppe sind die um ca. 10% höheren Cortisolwerte in der Verumgruppe ab 3.30 Uhr mit signifikantem Unterschied zu einem Zeitpunkt zu diskutieren. Mineralocorticoidrezeptoren im ZNS, insbesondere im Hippocampus, spielen eine wesentliche Rolle bei der negativen Rückkopplung von Cortisol auf die übergeordneten Stationen der HHN-Achse (De Kloet et al 1998). Eine Blockade dieser Rezeptoren führt daher zu einer verminderten Hemmung und damit zum Anstieg von ACTH und Cortisol, wobei der Anstieg von ACTH geringer ausfällt und nicht in allen Studien signifikant war (Dodt et al 1993, Born et al 1997a, De Kloet et al 1998, Deuschle et al 1998, Giordano et al 2006, Atkinson et al 2008, Berardelli et al 2010). BORN et al konnten hierbei zeigen, dass die frühe nächtliche Suppression der HHN-Achse schlafabhängig über MR-Wirkung im ZNS erfolgt (Born et al 1997a). ARVAT et al (2001) stellten nach der intravenösen Gabe von Canrenon, einem aktiven Metaboliten von Spironolacton, an gesunden Probanden einen signifikanten Anstieg von Cortisol und ACTH fest, der bereits 60 Minuten nach Medikamentengabe einsetzte. Wie in unseren Experimenten fiel auch hier der reaktive ACTH-Anstieg geringer aus als der des Cortisols, was von ARVAT et al als bereits einsetzende negative Rückkopplung des ansteigenden Cortisols über den GR auf die ACTH-Sekretion diskutiert wurde (Arvat et al 2001).

4.1.2 Aldosteron

Die Aldosteronkonzentrationen im Blut wiesen in beiden Bedingungen einen Anstieg gegen Morgen mit einem Peak um 8.00 Uhr auf (siehe Abbildung 4). Im Vergleich hierzu zeigten andere Studien eine pulsatile Ausschüttung mit einem Anstieg über die Nacht, welcher dem Cortisolanstieg vorausging und mit den höchsten Werten während des Schlafes in den frühen Morgenstunden einherging (Armbruster et al 1975, Katz et al 1975, Charloux et al 2001, Hur-

witz et al 2004). Letztgenannte Studie fand bei stündlichen Messungen einen Peak um 5.39 Uhr, wobei die Probanden von 22.00-6.00 Uhr, also im Vergleich zu unserer Studie um eine Stunde nach vorne verlagert, geschlafen haben. HURWITZ et al betonen, dass die Maxima der Aldosteronkonzentrationen des Cortisols stets vorausgehen. Dies erlaubt neben der dreifach kürzeren Halbwertszeit des Aldosterons im Vergleich zum Cortisol eine zeitliche Differenzierung des nächtlichen Besatzes von GR und MR (Hurwitz et al 2004). Der spätere Aldosteronanstieg in unserer Arbeit, der besonders in der Placebobedingung zu beobachten war, könnte eine zu niedrige Messfrequenz und nach dem Wecken einen Anstieg durch Orthostase zur Ursache haben. Geringere Messabstände oder eine längere Messdauer hätten zur besseren Einschätzung der Aldosteronrhythmik beitragen können.

In Bezug auf die etwas höheren Aldosteronwerte in der Spironolactonbedingung ist die Studienlage uneinheitlich. Während die Cortisolkonzentration nach MR-Blockade durch die wegfallende negative Rückkopplung innerhalb von einer Stunde anstieg, konnten ARVAT et al (2001) dies für Aldosteron nicht zeigen. Hier wurden die Hormone bis 4 Stunden nach Gabe von Canrenon unter fortlaufender Canrenon-Infusion bestimmt, während BORN et al (1991) 6.5 Stunden nach zweimaliger Canrenongabe erhöhte Aldosteronkonzentrationen gemessen haben. An 10 gesunden jungen Männern konnten ABSHAGEN et al (1976) erst ab 3 Tagen nach Spironolactongabe in normaler Dosierung einen deutlichen Aldosteronanstieg verzeichnen und erklären dies mit der initialen Inhibition der Aldosteronsynthese durch Spironolacton, die bereits in anderen Studien beschrieben wurde (Lammintausta und Erkola 1979, Ye et al 2009).

4.1.3 Katecholamine

Die Katecholaminwerte zeigen gemeinsam mit den Ergebnissen der polysomnographischen Auswertung, den psychologischen Kontrolltests (siehe Tabelle 5) und den Blutdruckmessungen, dass die Probanden durch die Experimentalsituation nicht in Schlaf und vegetativem System beeinträchtigt waren (Schmidt und Lang 2007). Entsprechend konnten YEE et al (2001) nach 4-wöchiger Spironolactonbehandlung bei Herzinsuffizienzpatienten zwar eine leichte Reduktion der Herzfrequenz, nicht jedoch signifikante Unterschiede im Noradrenalinprofil feststellen.

4.2 T-Lymphozytenzahlen

Durch die 1.5-stündlichen Messungen der T-Zellzahlen im Blut ließen sich deren nächtliche Veränderungen gut darstellen. Bei den durchgeführten Recherchen fanden sich keine Studien, die die nächtlichen Blutzellzahlen nach akuter MR-Blockade untersucht haben. Der natürliche nächtliche Verlauf der T-Zellzahlen war jedoch vielfach Gegenstand von Studien. BORN et al (1997b) untersuchten im Rahmen einer Schlafentzugsstudie u.a. die Lymphozytenzahlen im Blut über 2 Tage und konnten bei normalem Schlaf einen Anstieg der Th- und der cytotoxischen T-Zell-Zahlen bis 23.00 Uhr mit anschließend deutlichem Abfall bis zum Vormittag beobachten. Die Ergebnisse dieser Zellzahlen in der Placebogruppe unserer Studie unterscheiden sich hiervon nur insofern, als wir einen etwas späteren Abfall ab 0.30 Uhr und einen weiteren kleinen Peak um 5.00 Uhr feststellen konnten. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Blutabnahmen in der oben genannten Studie alle 3 Stunden erfolgten und damit der genaue Zeitpunkt des Maximums schwieriger zu ermitteln ist. Dies erschwert auch den Vergleich mit der Arbeit von SUZUKI et al (1997), die bei 4-stündlicher Messung für die Th-, nicht jedoch für die cytotoxischen T-Zellen, ein nächtliches Maximum aufzeigt. KRONFOL et al (1997) fanden bei 2-stündlichen Messungen für Th- und cytotoxischen T-Zellen Maxima um 22 bzw. 23 Uhr mit konsekutiven Abfall bis zum Vormittag, welcher, wie in der Placebogruppe unserer Studie, durch einen kleinen zweiten Peak um 4.00 Uhr unterbrochen wurde. In der Arbeit von DIMITROV et al (2009) wurden bei einem Studiendesign, welches dem unsrigen sehr ähnlich war, Zellzahlen aller acht auch von uns untersuchten T-Zellsubtypen ermittelt. Die nächtlichen Blutentnahmen erfolgten bei 14 Probanden alle 1.5 Stunden. Die Maxima der Gesamt-T-Zellen und Th-Zellen traten hier um ca. 2.00 Uhr und damit etwas später als in unseren Ergebnissen auf. Dies erklärt sich durch die Zusammenfassung der Ergebnisse für die beiden in der Studie untersuchten Bedingungen Schlaf und Schlafentzug, da Schlafentzug, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, zu einem späteren nächtlichen Maximum der T-Zellzahlen führt (Born et al 1997b, Dimitrov et al 2009). Insgesamt zeigten sich in der Studie von DIMITROV et al (2009) im Vergleich mit unserer Arbeit jedoch sehr ähnliche Verläufe der Zellzahlen.

In der bereits erwähnten Arbeit von BORN et al (1997b) ist auch die Betrachtung der Auswirkungen von Schlafentzug auf die Th-Zellzahlen von Interesse. Schlafentzug führte hier nämlich, wie die MR-Blockade in unserer Studie, zu einem späteren Abfall der Zellzahlen mit signifikant höheren Werten um 2.00 Uhr als in der Gruppe mit normalem nächtlichen Schlaf. Schlafentzug bewirkt außerdem einen deutlich geringeren nächtlichen Aldosteronanstieg (Charloux et al 2001).

In Bezug auf die möglichen MR-abhängigen Mechanismen, die T-Zellzahlen zu beeinflussen, ist die Unterscheidung zwischen chronischen und akuten Effekten wichtig. MILLER et al (1994) konnten an Ratten nach Nebennierenentfernung feststellen, dass 7-tägige Aldosterongaben in physiologischen Konzentrationen zu einem Absinken der Lymphozytenzahlen, und zwar besonders der Th-Zellen, führten. Bei Dosiserhöhungen des Aldosterons ließen sich diese Effekte nicht wesentlich verstärken, was mit der im Vergleich zum GR relativ geringen MR-Dichte erklärt wurde (Lowy 1989, Spencer et al 1991). Auch beim Menschen ist die MR-Dichte auf Lymphozyten deutlich niedriger als die des GR (Armanini et al 1988). Bei akuter subkutaner Aldosterongabe an Ratten, denen die Nebenniere entfernt wurde, konnte der akute, unter Placebogabe auftretende Anstieg der Lymphozytenzahlen verhindert werden (Dhabhar et al 1996). Dies war sowohl bei B-Lymphozyten als auch bei Th- und cytotoxische T-Zellen festzustellen, wobei die Versuchsbedingungen und Messzeitpunkte jedoch kaum Rückschlüsse auf eine physiologische nächtliche Aldosteronwirkung beim Menschen zulassen. MILLER et al (1993) zeigten bei Ratten einen supprimierenden Einfluss der MR-Aktivierung durch Aldosteron auf die GR-Rezeptordichte in Immunzellen der Milz auf, was Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Zellen haben könnte.

Die in unseren Experimenten beobachteten nächtlichen Veränderungen der T-Zellzahlen sind am ehesten Ausdruck einer Umverteilung zwischen den Kompartimenten Blut, sekundärem lymphatischem Gewebe und dem Knochenmark (Fauci 1975, Ottaway und Husband 1992, Born et al 1997b, Marshall und Born 2002, Lange et al 2010). Im Folgenden sollen unsere Ergebnisse im Blick auf die dabei stattfindenden Wanderungsbewegungen der T-Zellsubtypen diskutiert werden.

In der zweiten Nachthälfte gleichen sich trotz höherer Aldosteronkonzentrationen in beiden Bedingungen die Kurven aller T-Zellsubtypen zwischen den Bedingungen an. Dies geht jedoch auch mit einem Cortisolanstieg einher und wird maßgeblich auf diesen zurückzuführen sein. Cortisol ist wesentlich an der Umverteilung von T-Zellen aus dem Blut in das Knochenmark beteiligt und führt damit zu deren Abfall in der zweiten Nachthälfte und am Morgen, wobei Th-Zellen hiervon am stärksten betroffen sind (Fauci und Dale 1975, Kawate et al 1981, Ottaway und Husband 1994, Dimitrov et al 2009). DIMITROV et al (2009) konnten zeigen, dass beim Abfall der T-Zellzahlen im Blut die Cortisol-vermittelte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 wesentlich beteiligt ist. Dies führt über eine Interaktion der T-Zellen mit CXCL12, welches u.a. auf dem Endothel im Knochenmark exprimiert wird, zu einer vermehrten Diapedese (Janeway 2008).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass dieser Abfall in der zweiten Nachthälfte wohl MR-unabhängig ist und dementsprechend auch nicht über eine Cortisolwirkung auf den MR vermittelt wird. Cortisol kann in Abhängigkeit vom Vorhandensein des Enzyms 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in den Zielzellen mit hoher Affinität an den MR binden und ihn aktivieren (de Kloet et al 1998, Dimitrov et al 2004). ZHANG et al (2005) konnten in murinen Th- und cytotoxischen T-Zellen die Expression von 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 nachweisen, während der Typ 2 in T-Zellen nicht gefunden wurde (Tao et al 2011). Der Typ 1 des Enzyms wandelt im Gegensatz zum Typ 2 die inaktiven 11-Keto-Metabolite der Glukocortikoide in aktive Metabolite um und bietet damit einen weiteren, vom Zielgewebe abhängigen, jedoch von den Cortisolkonzentrationen im Plasma weitgehend unabhängigen Regulationsmechanismus (Zhang et al 2005). Eine MR-Blockade, wie wir sie durchgeführt haben, trifft jedoch alle Aktivoren des MR und unterstützt im Ergebnis damit die Schlussfolgerungen, dass der starke Abfall der T-Zellzahlen gegen Morgen Cortisol-GR-vermittelt ist. Die Durchführung unserer Experimente, jedoch mit Gabe eines GR-Antagonisten, wäre hierbei aufschlussreich. Das frühe, nach unserer Hypothese MR-vermittelte Absinken der T-Zellzahlen sollte hier nicht beeinträchtigt werden. Der stärkere Abfall in der zweiten Nachthälfte und am Morgen müsste jedoch verhindert werden. BERTAGNA et al (1988) konnten

zeigen, dass die Dexamethason-induzierte Senkung der Lymphozytenzahlen im Blut durch den GR-Antagonisten RU-486 verhindert wird.

Während die Cortisol-vermittelte Umverteilung der T-Zellen in das Knochenmark seit längerem als wesentlicher Faktor der beobachteten circadianen Schwankungen der T-Zellzahlen bekannt ist, sind die übergeordneten Regulationsmechanismen des Homings von T-Zellen in das sekundäre lymphatische Gewebe bislang weniger gut untersucht (Ottaway und Husband 1992, Lange et al 2010). Glucocorticoide hemmen dabei unter anderem über Effekte auf die hochendothelialen Venolen das Homing der Lymphozyten in die Lymphknoten (Buerki et al 1976, Sackstein und Borenstein 1995, Bauer et al 2002). Auch bei akutem Stress, der mit einer Aktivierung der HPA-Achse einhergeht, verminderte sich die Anreicherung radioaktiv markierter T-Zellen in den Lymphknoten bei gleichzeitig vermehrter Akkumulation im Knochenmark (Stefanski et al 2003).

Niedrige Cortisolspiegel, wie sie in der ersten Nachthälfte zu beobachten sind, könnten also die Voraussetzungen für die Umverteilung von T-Zellen in das sekundäre lymphatische Gewebe verbessern. Für eine nächtliche Akkumulation von Lymphozyten in das sekundäre lymphatische Gewebe sprechen die Ergebnisse von DICKSTEIN et al (2000). Sie konnten bei Schafen während des Schlafes eine Verminderung von Flussrate und Lymphozytenzahlen in efferenten Lymphgefäßen beobachten, was zu einer Akkumulation der Lymphozyten in den Lymphknoten führte. Bei Ratten verläuft der prozentuale Anteil der T-Zellzahlen im Blut parallel zu dem Anteil in den Lymphknoten mit maximalen Werten während der Ruhephase (Esquifino et al 1996 und Bonacho et al 2001 in Lange et al 2010). Hierbei beträgt die Aufenthaltsdauer fluoreszenzmarkierter Lymphozyten im Blutkreislauf bis zum Homing in das lymphatische Gewebe nur ca. 30 Minuten (Westermann et al 1988, Pabst 1988 in von Andrian und Mempel 2003). Entsprechend könnte die bei niedrigen nächtlichen Cortisolspiegeln mögliche Freisetzung von T-Zellen aus dem Knochenmark über erhöhte Zellzahlen im Blut zu einer vermehrten Verfügbarkeit in den Lymphknoten führen. Die komplexen Mechanismen, über die T-Zellen in die Lymphknoten gelangen, unterstreichen auch die Bedeutung der Unterscheidung von T-Zell-Subtypen. Zum Beispiel weisen OTTAWAY und HUSBAND (1992) auf die doppelt so hohe T-Zell-Clearance vom Blut in das lymphatische Gewebe

für Th-Zellen im Vergleich zu cytotoxischen T-Zellen hin. Dies könnte erklären, weshalb wir nur bei den naiven Th-Zellen, nicht aber bei den naiven cytotoxischen T-Zellen einen späteren Abfall der Zellzahlen im Blut mit signifikantem Effekt der MR-Blockade feststellen konnten. Während naive T-Zellen vor allem über die HEV in die Lymphknoten gelangen, konnten MACKAY et al (1990) bei Schafen für zentrale T-Gedächtniszellen auch eine Anreicherung über die afferenten Lymphwege feststellen. Dies könnte erklären, weshalb für die zentralen Th-Gedächtniszellen nur ein Trend für den Effekt der MR-Blockade beobachtet werden konnte.

Das Homing der naiven T-Zellen in die Lymphknoten erfolgt in erster Linie an den HEV über mindestens vier Schritte (von Andrian und Mempel 2003, Janeway 2008): Als erstes „rollen“ die naiven T-Zellen auf dem Endothel der HEV. Hierfür binden sie mit L-Selectin (=CD62L) an den Selektinliganden „peripheres (Lymph-) Knoten Adressin“ (PNAD) des Endothels. Im nächsten Schritt aktivieren Endothelzellen der HEV über Interaktion ihres Chemokinliganden CCL21 und CCL19 mit CCR7 die Integrine der bereits an der Endotheloberfläche rollenden naiven T-Zellen. Über Interaktion von Leukozyten-Funktions-Antigen 1 (LFA-1) auf den T-Zellen mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf dem Endothel kommt es dann zur Adhäsion und im letzten Schritt schließlich zur Diapedese durch das Endothel und weiteren Migration innerhalb des lymphatischen Gewebes. Die Abfolge der ersten drei Schritte ist also vom Vorhandensein ganz bestimmter Oberflächenmoleküle abhängig und macht deutlich, weshalb nur manche T-Zellsubtypen aus dem Blut in die Lymphknoten gelangen (von Andrian und Mempel 2003, Tanaka et al 2004, Janeway 2008). Auch wenn es Ausnahmen von dieser strengen Abfolge zu geben scheint (Scimone et al 2004, Sackstein 2005), würde dies doch in Zusammenschau mit unserer Hypothese erklären, weshalb nur bei L-Selectin-positiven Subtypen ein signifikanter Effekt der MR-Blockade aufgetreten ist. Wenn das nächtliche Homing in das sekundäre lymphatische Gewebe durch MR-Aktivierung der T-Zellen oder des Endothels gefördert wird, so ist doch die Expression von L-Selectin auf den T-Zellen dafür eine notwendige Bedingung. Auch der auf naiven T-Zellen und zentralen T-Gedächtniszellen vorhandene CCR7 spielt entsprechend eine entscheidende Rolle und kann zur Differenzierung von T-Zell-Subtypen verwendet werden (Dimitrov et al 2009). Das

Vorhandensein und die Dichte der genannten Adhäsionsmoleküle auf einer T-Zelle sind keine statischen Größen, sondern können zeitlich und räumlich variieren (Galkina et al 2007, Dimitrov et al 2009, Klinger et al 2009).

CHIN et al (1991) wiesen an Endothelzellen aus HEV von Ratten *in vitro* eine vermehrte Lymphozyten-Adhäsion durch vorherige Stimulation des Endothels mit TNF- α , IFN- γ und IL-4 nach. Über Veränderungen der Zytokinausschüttung könnte eine MR-Aktivierung also Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit auf das Wanderungsverhalten der T-Zellen nehmen (Loetscher et al 1996). Prinzipiell ist aber auch ein direkter Einfluss des MR auf die Expression von Adhäsionsmolekülen denkbar.

Während in einigen Studien, entsprechend der klinischen Wirkung, ein schneller antiinflammatorischer Einfluss von Spironolacton auf die Zytokinproduktion von Leukozyten beschrieben wurde (Bendtsen et al 2003, Sonder et al 2006), führte bei DIMITROV et al (2004) die MR-Blockade mit Spironolacton bei Th- und cytotoxischen T-Zellen *in vitro* zu einem Anstieg der Produktion von TNF- α , IFN- γ und IL-2. Die Blutzellen für die letztgenannte Untersuchung wurden den Probanden dabei morgens entnommen. Andere *in vitro* Studien zeigten, dass Aldosteron die Leukozytenadhäsion über eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen erhöht. Dies konnte durch Spironolacton verhindert werden (Krug et al 2007, Caprio et al 2008, Jeong et al 2009). In den genannten Experimenten wurden jedoch keine T-Zellen, sondern Granulozyten (Krug et al 2007), Monozyten (Caprio et al 2008) und Promyelozyten (Jeong et al 2009) verwendet. Die Tatsache, dass die Produktion vieler Botenstoffe und deren Konzentrationen im Blut während des nächtlichen Schlafes ihre maximalen Werte erreichen, unterstreicht die immunologische Bedeutung von Schlaf (Petrovsky 2001, Lange et al 2010). Den durchgeführten Recherchen nach gibt es bislang keine Studien, die den akuten Effekt einer MR-Blockade oder -Aktivierung auf die nächtliche Zytokinproduktion untersucht haben.

4.3 Mechanismen der Spironolactonwirkung

Um bei den Probanden eine MR-Blockade zu erreichen, wurden ihnen um 23.00 und 4.00 Uhr je 200 mg Spironolacton als Tablette verabreicht. Die zweite Gabe erfolgte unter Berücksichtigung des psychologischen Teils der Experimente, um morgens und vormittags ausreichend hohe Konzentrationen im ZNS zu erreichen. Außerdem ermöglichte die zweite Gabe die Untersuchung von Effekten auf den morgentlichen cortisolinduzierten Abfall der T-Zellzahlen. Der kompetitive MR-Antagonist Spironolacton wird bei oraler Gabe nahezu vollständig resorbiert und metabolisiert, wobei die meisten entstehenden Metabolite ebenfalls den MR blockieren (Overdiek und Merkus 1987, Bonlokke et al 2001). Zwei Stunden nach oraler Gabe erreicht Spironolacton maximale Plasmakonzentrationen, während die aktiven Metaboliten Serumpeaks nach 3 bis 5 Stunden zeigen (Spironolacton-ratiopharm Fachinformation 2007). Zum Zeitpunkt der signifikanten Effekte auf die T-Zellzahlen kann also von einer ausreichenden MR-Blockade an den Blutzellen ausgegangen werden. Den hierbei sicherlich auftretenden interindividuellen Unterschieden wurde durch das Design als Cross-over-Studie jedoch gut begegnet.

Wollte man den von uns beobachteten Effekt der MR-Blockade auf den Verlauf der nächtlichen T-Zellzahlen verifizieren und den Zeitverlauf präziser darstellen, würde sich eine intravenöse Canrenongabe anbieten, da hier schneller steady-state-Konzentrationen erreicht werden. Interessant wäre es auch, den Effekt einer Aldosterongabe vor dem Zeitpunkt der höchsten T-Zellzahlen zu untersuchen. Hier wäre nach unserer Hypothese mit einem früheren und stärkeren Abfall der T-Zellzahlen zu rechnen.

Spironolacton und dessen Metaboliten binden an den klassischen cytosolständigen MR, der einen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor darstellt. Im Gegensatz zur Bindung durch Aldosteron oder Cortisol kann der MR nun jedoch nicht in den Zellkern gelangen, um dort durch Transkriptionsaktivierung zu den zellspezifischen Effekten zu führen (Funder 2005). Diese Kaskade benötigt eine gewisse Zeit und konnte in verschiedenen Experimente von einer schnellen, nach Minuten einsetzenden, Aldosteronwirkungen abgegrenzt werden, die teilweise nicht durch Spironolacton inhibiert werden konnte (Moura und Worcel 1984, Wehling et al 1992). Ob diese nichtgenomischen Aldosteron-Effekte durch einen bisher nicht isolierten membranständigen Aldosteron-

Rezeptor, einen membranständigen MR oder durch nichtgenomische Signalkaskaden, die vom cytosolischen MR ausgehen, verursacht werden, ist bislang nicht endgültig geklärt (Lösel et al 2004, Funder 2005, 2010, Weber et al 2008, Schrier et al 2010).

Sollten die beschriebenen nichtgenomischen Aldostereffekte einen größeren Einfluss auf die Lymphozytenmigration haben, so ließe sich dies am ehesten bei Aldosterongabe untersuchen, nicht jedoch bei einer alleinigen MR-Blockade. SONDER et al (2006) haben an mononukleären Blutzellen in vitro ausführlich die Aldosteron- und Spironolactoneffekte auf die Genexpression, Zytokinproduktion und Apoptose untersucht. Sie konnten dabei eine starke Verminderung von Gentranskription und Zytokinproduktion durch Spironolacton feststellen, die als zusätzliche, MR-unabhängige und über die Canrenon-Wirkung hinausgehende Genregulierung erklärt wurde. Dass die antiinflammatorischen Spironolacton-Effekte auch in vivo bedeutsam sind, konnten BENDTZEN et al (2003) an Patienten mit Arthritis zeigen. Ein Einfluss MR-unabhängiger Mechanismen auf den verzögerten Abfall der naiven Th-Zellen nach Spironolactongabe lässt sich daher nicht ausschließen.

4.4 Klinische Bedeutung

In der Diskussion unserer Ergebnisse konnte bereits einigen Hinweisen für eine Beteiligung Aldosteron-MR-abhängiger Mechanismen bei der nächtlichen Steuerung der Immunabwehr nachgegangen werden. Dabei sind auch proinflammatorische Aldosteronwirkungen thematisiert worden.

Aldosteron und Spironolacton sind in der Medizin in den letzten beiden Jahrzehnten vor allem in ihrer Bedeutung für die Entstehung und die Behandlung von Herzinsuffizienz und anderen assoziierten Erkrankungen beforscht worden (Pitt et al 1999, Brown 2008, Funder 2010). Dabei konnte u.a. gezeigt werden, dass eine niedrig dosierte Spironolactonbehandlung bei Herzinsuffizienz zu einer deutlichen Reduktion von Morbidität und Mortalität führt (Pitt et al 1999). Aldosteron bewirkt über die Förderung vaskulärer Entzündung einen fibrotischen Umbau von Gefäßwand und Herzmuskel (Weber 2003, Brown 2008). Sowohl das unspezifische als auch das adaptive Immunsystem sind an der Genese von Bluthochdruck und Herzmuskelumbau beteiligt (Usher et al 2010, Harrison et al 2010). Bei genauerer Betrachtung der hierbei beteiligten

immunologischen Prozesse scheint das Zielgewebe vor allem das Gefäßendothel zu sein. Mineralocorticoide induzieren hier in Tierversuchen T-Zell-abhängigen oxidativen Stress sowie eine vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und Zytokinen wie IL-6 (Jaffe und Mendelsohn 2005, Guzik et al 2007, Herrada et al 2010). Dies führt zum vermehrten Einwandern von Lymphozyten und Monozyten, welche die örtliche Gefäßentzündung durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 weiter triggern (Blasi et al 2003, Brown 2008, Jeong et al 2009). Auch am Menschen zeigten sich nach Aldosterongabe erhöhte IL-6-Konzentrationen im Blut. Spironolacton konnte entsprechend einen Angiotensin II induzierten IL-6-Anstieg verhindern (Luther 2006). Ein Mangel an 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 führte bei Mäusen zu den gleichen entzündlichen Veränderungen der Gefäße wie die Gabe von Aldosteron, was die Bedeutung dieses Enzyms für den Schutz vor der MR-Wirkung durch Cortisol in den beteiligten Gefäß- und Immunzellen hervorhebt (Deuchar et al 2011).

MONRAD et al (2008) konnten an Mäusen mit Lupusnephritis zeigen, dass Spironolacton nicht nur den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst, sondern auch die Konzentration von Autoantikörpern im Serum erniedrigt. HERRADA et al (2010) fanden bei Mäusen eine stärkere Progression der autoimmunen Encephalomyelitis unter Aldosterongaben, einhergehend mit einer durch dendritische Zellen vermittelten Differenzierung von Th-Zellen zu einem Th17-Phenotyp. Beim Menschen verbesserten sich nach Spironolactongaben die Symptome von rheumatoider und juveniler Arthritis, was mit niedrigeren TNF- α - und Interferon- γ -Spiegeln einherging (Bendtzen et al 2003). In Mäusen mit MR-defizienten myeloischen Zellen konnten USHER et al (2010) nach Angiotensin II-Gabe eine geringere Gefäßschädigung sowie verminderte circadiane Blutdruckschwankungen beobachten. Zellen des unspezifischen Immunsystems scheinen also MR-abhängig Einfluss auf die circadiane Steuerung wichtiger Vitalparameter zu nehmen (Usher et al 2010).

Hinweise für eine vermehrte Aktivierung adaptiver Immunprozesse im Rahmen eines primären Hyperaldosteronismus konnte ich nicht finden. Bei diesem Krankheitsbild stehen der Bluthochdruck und die Elektrolytverschiebungen im Vordergrund. Auch beim Pseudohypoaldosteronismus, einer seltenen, genetisch bedingten Aldosteronresistenz des MR, spielen in erster Linie die gravie-

renden Elektrolytstörungen eine Rolle (Kino und Chrousos 2004, Zennaro et al 2011). Die Erforschung immunologischer Funktionen in Personen mit diesen Erkrankungen könnte aufschlussreich bei der Frage nach der Bedeutung Aldosteron-MR-abhängiger Mechanismen für die Bildung einer Immunantwort sein.

Während Aldosteron über immunologische Mechanismen an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist und auch bei autoimmunologischen Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint, bleibt die Bedeutung dieses Hormons für das Immunsystem unter physiologischen Bedingungen bislang relativ unklar. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit bereits genannten Ergebnisse verschiedener Studien wie auch der eigenen Ergebnisse spricht einiges für eine nicht unwesentliche Beteiligung von Aldosteron an dem Zustandekommen einer effektiven Immunantwort, auch wenn in den meisten klinisch orientierten Studien eher die für den Organismus schädlichen immunstimulatorischen Wirkungen einer übersteigerten Aldosteronproduktion betrachtet wurden. In dieser Hinsicht von Bedeutung ist die Studie von LEO und BONNEAU (2000). Hier wurde bei Mäusen 5 bis 6 Stunden nach einer Infektion mit Herpes simplex Viren Typ 1 (HSV) eine MR-Blockade mit Spironolacton durchgeführt. Nach 4 Tagen wiesen die aus der Milz der Mäuse isolierten HSV-spezifischen cytotoxischen T-Zellen eine signifikant geringere lytische Aktivität auf als in der Placebogruppe. Für die Beurteilung unserer Hypothese wäre natürlich von Interesse gewesen, wann im Verhältnis zur Ruhephase die Infektion und die akute Spironolactongabe stattgefunden haben, um eventuell vorhandene schlafabhängige Effekte zu ermitteln.

Auf den positiven Einfluss von Schlaf auf die Immunabwehr wurde bereits in Kapitel 1.4 eingegangen. Neben der Bestimmung von Antikörpertitern und antigenspezifischen Th-Zellen nach einer Antigenexposition durch Impfung (Lange et al 2003, 2011) ist auch die Ausbildung klinischer Krankheitszeichen nach einer Rhinovirusexposition ein relevanter Parameter, der die Bedeutung von Schlaf für das menschliche Immunsystem aufzeigen konnte (Cohen et al 2009). Probanden die in den letzten 2 Wochen vor der Exposition weniger als 7 Stunden pro Nacht geschlafen hatten, zeigten fast dreimal häufiger Erkältungssymptome als Probanden mit mehr als 8 Stunden Nachtschlaf. Eine Anwendung ähnlicher Modelle unter MR-Blockade versus Placebo in der Nacht nach

Antigenexposition könnte genaueren Aufschluss über die klinische Relevanz Aldosteron-MR-abhängiger Mechanismen bei der Entwicklung einer Immunantwort geben.

Wir konnten in unseren Experimenten nach einmaliger Spironolactongabe einen verzögerten Abfall der naiven Th-Zellen im Blut beobachten. Wichtig ist, dass dieser Effekt an die erste Nachthälfte gebunden war. Die speziell in diesem Zeitraum herrschenden Bedingungen, insbesondere die minimalen Cortisol- und steigenden Aldosteronspiegel, ermöglichen ein Überwiegen der MR- gegenüber der GR-Wirkung. Sollte diese gesteigerte MR-Wirkung an den naiven T-Zellen bzw. den HEV zu einem vermehrten Homing in das sekundäre lymphatische Gewebe führen, könnte dies erheblichen Einfluss auf die Ausbildung einer effektiven Immunantwort haben. Anzahl und Dauer der Kontakte zwischen naiven T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen in den Lymphknoten könnten so MR-abhängig optimiert werden, bevor der morgentliche Cortisolanstieg in Vorbereitung auf die Belastungen des Tages zu einer Umverteilung der naiven T-Zellen in das Knochenmark führt. Die Berücksichtigung schlafabhängig differenzierter Aldosteron bzw. MR-Wirkungen in der klinischen und experimentellen Forschung könnte weiteren Aufschluss über die Bedeutung von Schlaf bei der Regulation des Immunsystems geben.

5. Zusammenfassung

Die im Blut vorhandenen T-Zellen sind nicht statisch, sondern zirkulieren zwischen verschiedenen Räumen des menschlichen Organismus. Die Zellzahlen der verschiedenen T-Zellsubtypen im Blut weisen daher auch circadiane und schlafabhängige Rhythmen auf, die sich abhängig vom Subtyp unterscheiden. Hormone aus der Nebenniere sind dabei wesentlich an der Regulation der Verteilung von T-Zellsubtypen beteiligt. Während Cortisol über eine Umverteilung der T-Zellen ins Knochenmark zu einem starken Abfall im Blut in der zweiten Nachthälfte führt, ist die Rolle von Aldosteron und dem Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) bislang unklar.

Um den Einfluss MR-abhängiger Mechanismen auf die T-Zellen während des nächtlichen Schlafes zu prüfen, haben wir 11 gesunde männliche Probanden im Schlaflabor untersucht. In zwei Nächten erhielten sie doppelt verblindet je einmal den MR-Antagonisten Spironolacton oder Placebo. Während der Nacht erfolgten regelmäßige Blutabnahmen, um die Konzentrationen der Stresshormone, von Aldosteron sowie die Zellzahlen der T-Zellsubtypen zu bestimmen. Letzteres geschah mithilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung fluoreszierender Antikörper zur Differenzierung von insgesamt 8 Subtypen.

Cortisol und Aldosteron zeigten im Verlauf der Nacht einen deutlichen Anstieg und wurden nur geringfügig durch die Spironolactongabe beeinflusst. Der frühe nächtliche Abfall der T-Zellzahlen im Blut ließ sich durch Spironolactongabe unterdrücken. Bei der Differenzierung nach Subtypen zeigte sich dieser Effekt bei den naiven T-Helferzellen signifikant.

Unsere Ergebnisse deuten an, dass der Mineralocorticoid-Rezeptor an der nächtlichen Umverteilung der naiven T-Lymphozyten beteiligt ist. Dies könnte zugunsten des sekundären lymphatischen Gewebes geschehen. Eine Aldosteron-MR-vermittelte nächtliche Akkumulation der naiven T-Helferzellen und zentralen Gedächtniszellen in den Lymphknoten bei gleichzeitig niedrigem Cortisolspiegel in der ersten Nachthälfte könnte so die Initiation einer adaptiven Immunantwort und die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses fördern.

6. Literaturverzeichnis

1. Abshagen U, Spörl S, Schöneshöfer M, Lage M, Rennekamp H, Oelkers W. Influence of spironolactone on endogenous steroid metabolism in man. *Clin Sci Mol Med Suppl* 3: 307-310, 1976.
2. Armanini D, Endres S, Kuhnle U, Weber PC. Parallel determination of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in T- and B-lymphocytes of human spleen. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118: 479-482, 1988.
3. Armbruster H, Vetter W, Beckerhoff R, Nussberger J, Vetter H, Siegenthaler W. Diurnal variations of plasma aldosterone in supine man: relation to plasma renin activity and plasma cortisol. *Acta Endocrinologica* 80: 95-103, 1975.
4. Arvat E, Maccagno B, Giordano R, Pellegrino M, Broglio F, Gianotti L, Maccario M, Camanni F, Ghigo E. Mineralocorticoid receptor blockade by canrenoate increases both spontaneous and stimulated adrenal function in human. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3176-3181, 2001.
5. Atkinson HC, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Wiles CC, Lightman SL. Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: 1011-1022, 2008.
6. Bataillard A, del Rey A, Klusman I, Arditi GM, Besedovsky HO. Interleukin-1 stimulates aldosterone secretion: involvement of renin, ACTH, and prostaglandins. *Am J Physiol* 263: 840-844, 1992.
7. Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, Shanks N. Dexamethasone-induced effects on lymphocyte distribution and expression of adhesion molecules in treatment-resistant depression. *Psychiatry Res* 113: 1-15, 2002.
8. Bendtzen K, Hansen PR, Rieneck K. Spironolacton inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor-alpha and inteferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. *Clin Exp Immunol* 134: 151-158, 2003.
9. Berardelli R, Karamouzis I, Marinazzo E, Prats E, Picu A, Giordano R, Ghigo E, Arvat E. Effect of acute and prolonged mineralocorticoid receptor blockade on spontaneous and stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *Eur J Endocrinol* 162: 1067-1074, 2010.
10. Berger RJ, Phillips NH. Energy conservation and sleep. *Behav Brain Res* 69: 65-73, 1995.
11. Bertagna X, Basin C, Picard F, Varet B, Bertagna C, Hucher M, Luton JP. Peripheral antigluco-corticoid action of RU 486 in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 28: 537-541, 1988.
12. Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27: 1-12, 1977.
13. Besedovsky L, Lange T, Born J. Sleep and immune function. *Pflugers Arch*: Published online 10. November 2011.
14. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 63: 1791-1800, 2003.

15. Bonacho MG, Cardinali DP, Castrillón P, Cutrera RA, Esquifino AI. Aging-induced changes in 24-rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis. *Exp Gerontol* 36: 267-282, 2001.
16. Bonlokke L, Hovgaard L, Kristensen HG, Knutson L, Lennernas H. Direct estimation of the in vivo dissolution of spironolactone, in two particle size ranges, using the single-pass perfusion technique (Loc-I-Gut) in humans. *Eur J Pharm Sci* 12: 239-250, 2001.
17. Born J, DeKloet ER, Wenz H, Kern W, Fehm HL. Gluco- and antimineralocorticoid effects on human sleep: a role of central corticosteroid receptors. *Am J Physiol* 260: E183-188, 1991.
18. Born J, Steinbach D, Dodt C, Fehm HL. Blocking of Central Nervous Mineralocorticoid Receptors Counteracts Inhibition of Pituitary-Adrenal Activity in Human Sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1106-1110, 1997a.
19. Born J, Lange T, Hansen K, Mölle M, Fehm HL. Effects of Sleep and Circadian Rhythm on Human Circulating Immune Cells. *J Immunol* 158:4454-4464, 1997b.
20. Brown NJ. Aldosterone and Vascular Inflammation. *Hypertension* 51: 161-167, 2008.
21. Bryant PA, Trinder J, Curtis N. Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nat Rev Immunol* 4: 457-467, 2004.
22. Buerki H, Massner B, Cottier H, Chanana AD, Joel DD, Cronkite EP. Effects of lymph diversion versus corticosteroids on blood and lymphocyte pools. *Beitr Pathol* 159: 343-350, 1976.
23. Campbell JP, Riddell NE, Burns VE, Turner M, van Zanten JJ, Drayson MT, Bosch JA. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. *Brain Behav Immun* 23: 767-775, 2009.
24. Caprio M, Newell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res* 102: 1359-1367, 2008.
25. Charloux A, Gronfier C, Lonsdorfer-Wolf E, Piquard F, Brandenberger G. Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans. *Am J Physiol* 276: E43-49, 1999.
26. Charloux A, Gronfier C, Chapotot F, Ehrhart J, Piquard F, Brandenberger G. Sleep deprivation blunts the nighttime increase in aldosterone release in human. *J Sleep Res.* 10: 27-33, 2001.
27. Chin YH, Cai JP, Xu XM. Tissue-specific homing receptor mediates lymphocyte adhesion to cytokine-stimulated lymph node high endothelial venule cells. *Immunology* 74: 478-483, 1991.
28. Cohen S, Doyle WJ, Alper CM, Janicki-Deverts D, Turner RB. Sleep habits and susceptibility to the common cold. *Arch Intern Med* 169: 62-67, 2009.
29. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301, 1998.

30. Deuchar GA, McLean D, Hadoke PW, Brownstein DG, Webb DJ, Mullins JJ, Chapman K, Seckl JR, Kotelevtsev YV. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe^{-/-}mice. *Endocrinology* 152: 236-246, 2011.
31. Deuschle M, Weber B, Colla M, Müller M, Kniest A, Heuser I. Mineralocorticoid receptor also modulates basal activity of hypothalamus-pituitary-adrenocortical system in human. *Neuroendocrinology* 68: 355-360, 1998.
32. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol* 157: 1638-1644, 1996.
33. Dickstein JB, Hay JB, Lue FA, Moldofsky H. The relationship of lymphocytes in blood and in lymph to sleep/wake states in sheep. *Sleep* 23: 185-190, 2000.
34. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11(3): 114-126, 2010.
35. Dimitrov S, Lange T, Fehm HL, Born J. A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 18: 368-374, 2004.
36. Dimitrov S, Lange T, Nohroudi K, Born J. Number and function of circulating human antigen presenting cells regulated by sleep. *Sleep* 30: 401-411, 2007.
37. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* 113: 5134-5143, 2009.
38. Dijk DJ, von Schantz M. Timing and Consolidation of Human Sleep, Wakefulness, and Performance by a Symphony of Oscillators. *J Biol Rhythms* 20(4): 279-290, 2005.
39. Dodt C, Kern W, Fehm HL, Born J. Antimineralocorticoid canrenoate enhances secretory activity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in humans. *Neuroendocrinology* 58: 570-574, 1993.
40. Esquifino AI, Selgas L, Arce A, Maggiore VD, Cardinali DP. Twenty-four-hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen: effect of cyclosporine. *Brain Behav Immun* 10: 92-102, 1996.
41. Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28: 669-680, 1975.
42. Fauci AS, Dale DC. The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46: 235-243, 1975.
43. Funder JW. Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors: Biology and Clinical Relevance. *Annu Rev Med* 48: 231-240, 1997.
44. Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 26: 313-321, 2005.
45. Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 52: 393-400, 2010.

46. Galkina E, Florey O, Zarbock A, Smith BR, Preece G, Lawrence MB, Haskard DO, Ager A. T lymphocyte rolling and recruitment into peripheral lymph nodes is regulated by saturable density of L-selectin (CD62L). *Eur J Immunol* 37: 1243-1253, 2007.
47. Giordano R, Pellegrino M, Picu A, Bonelli L, Balbo M, Berardelli R, Lanfranco F, Ghigo E, Arvat E. Neuroregulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in humans: effects of GABA-, mineralocorticoid-, and GH-secretagogue-receptor modulation. *ScientificWorldJournal* 17: 1-11, 2006.
48. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204: 2449-2460, 2007.
49. Gwinup G. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Calif Med* 106: 159-164, 1967.
50. Halberg F, Johnson EA, Brown BW, Bittner JJ. Susceptibility rhythm to E.coli endotoxin and bioassay. *Proc Soc Exp Biol Med* 103: 142-144, 1960.
51. Hamann D, Baars PA, Rep MHG, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RAW. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 186: 1407-1418, 1997.
52. Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 10: 203-207, 2010.
53. Hastings MH, Maywood ES, Reddy AB. Two decades of Circadian Time. *J Neuroendocrinol* 20: 812-819, 2008.
54. Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 16: 581-622, 1999.
55. Hellman L, Nakada F, Curti J, Weitzman ED, Kream J, Roffwarg H, Ellman S, Fukushima DK, Gallagher TF. Cortisol is secreted episodically by normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 30: 411-422, 1970.
56. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, Amador CA, Gonzales PA, Cortes CM, Riedel CA, Carvajal CA, Figueroa F, Michea LF, Fardella CE, Kalergis AM. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing mediated immunity. *J Immunol* 184: 191-202, 2010.
57. Hoddes E, Zarcone V, Smythe H, Phillips R, Dement WC. Quantification of sleepiness: a new approach. *Psychophysiology* 10(4): 431-436, 1973.
58. Hurwitz S, Cohen RJ, Williams GH. Diurnal variation of aldosterone and plasma rennin activity: timing relation to melatonin and cortisol and consistency after prolonged bed rest. *J Appl Physiol* 96: 1406-1414, 2004.
59. Imeri L, Opp MR. How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat Rev Neurosci* 10:199-210, 2009.

60. Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 96: 643-650, 2005.
61. Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunobiology*. 7. Auflage, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group 2008.
62. Jasper HH. The ten-twenty electrode system of the international federation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 10: 371-375, 1958.
63. Jeong Y, Chaupin DF, Matsushita K, Yamakuchi M, Cameron SJ, Morrel CN, Lowenstein CJ. Aldosterone activates endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3782-3787, 2009.
64. Katz FH, Romfh P, Smith J. Diurnal variation of plasma aldosterone, cortisol and renin activity in supine man. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 125-134, 1975.
65. Kawate T, Abo T, Hinuma S, Kumagai K. Studies of the bioperiodicity of the immune response: II. Co-variations of murine T and B cells and a role of corticosteroid. *J Immunol* 126: 1364-1367, 1981.
66. Kino T, Chrousos GP. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. *Essays Biochem* 40: 137-155, 2004.
67. Klinger A, Gebert A, Bieber K, Kalies K, Ager A, Bell EB, Westermann J. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *Int Immunol* 21: 443-455, 2009.
68. Kronfol Z, Nair M, Zhang Q, Hill EE, Brown MB. Circadian immune measures in healthy volunteers: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and sympathetic neurotransmitters. *Psychosom Med* 59: 42-50, 1997.
69. Krug AW, Kopprasch S, Ziegler CG, Dippong S, Catar RA, Bornstein SR, Morawietz H, Gekle M. Aldosterone rapidly induces leukocyte adhesion to endothelial cells: a new link between aldosterone and arteriosclerosis? *Hypertension* 50: 156-157, 2007.
70. Kudielka BM, Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Acute HPA axis responses, heart rate, and mood changes to psychosocial stress (TSST) in humans at different times of day. *Psychoneuroendocrinology* 29: 983-992, 2004.
71. Lammintausta R, Erkkola R. Effect of spironolactone treatment on the rennin-aldosterone system during pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 17: 294-298, 1979.
72. Lange T. *Schlafeffekte auf Leukozyten und Zytokine des Menschen unter Berücksichtigung circadianer und endokriner Einflüsse*. Med Diss. Lübeck, 2003.
73. Lange T, Perras B, Fehm HL, Born J. Sleep Enhances the Human Antibody Response to Hepatitis A Vaccination. *Psychosom Med* 65: 831-835, 2003.
74. Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1193: 48-59, 2010.

75. Lange T, Dimitrov S, Bollinger T, Diekelmann S, Born J. Sleep after vaccination boosts immunological memory. *J Immunol* 187: 283-290, 2011.
76. Leo NA, Bonneau RH. Mechanisms underlying chemical sympathectomy-induced suppression of herpes simplex virus-specific cytotoxic T lymphocyte activation and function. *J Neuroimmunol* 110: 45-56, 2000.
77. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184: 569-577, 1996.
78. Lösel R, Schultz A, Wehling M. A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 217: 137-141, 2004.
79. Lowy MT. Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Res* 503: 191-197, 1989.
80. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 1. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag: 248-279, 2003.
81. Luther JM, Gainer JV, Murphey LJ, Yu C, Vaughan DE, Morrow JD, Brown NJ. Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism. *Hypertension* 48: 1050-1057, 2006.
82. Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naïve and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 171: 801-817, 1990.
83. Marshall L, Born J. Brain-Immune interactions in sleep. *Int Rev Neurobiol* 52: 93-131, 2002.
84. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Rev* 23: 79-133, 1997.
85. Miller AH, Spencer RL, Husain A, Rhee R, McEwen BS, Stein M. Differential expression of type I adrenal steroid receptors in immune tissues is associated with tissue-specific regulation of type II receptors by aldosterone. *Endocrinology* 133: 2133-2140, 1993.
86. Miller AH, Spencer RL, Hassett J, Kim C, Rhee R, Ciurea D, Dhabhar F, McEwen B, Stein M. Effects of selective Typ I and II Adrenal Steroid Agonists on Immune Cell Distribution. *Endocrinology* 135: 1934-1944, 1994.
87. Miyawaki T, Taga K, Nagaoki T, Seki H, Suzuki Y, Taniguchi N. Circadian changes of T lymphocyte subsets in human peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 55: 618-622, 1984.
88. Monrad SU, Killen PD, Anderson MR, Bradke A, Kaplan MJ. The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 10: R5, 2008.
89. Moura AM, Worcel M. Direct action of aldosterone on transmembrane ^{22}Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 6: 425-430, 1984.
90. Oswald I. The function of sleep. *Postgrad Med J* 52: 15-18, 1976.

91. Ottaway CA, Husband AJ. Central Nervous System Influences on Lymphocyte Migration. *Brain Behav Immun* 6: 97-116, 1992.
92. Ottaway CA, Husband AJ. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 15: 511-517, 1994.
93. Overdiek HW, Merkus FW. The metabolism and biopharmaceutics of spironolactone in man. *Rev Drug Metab Drug Interact* 5: 273-302, 1987.
94. Pabst R. The spleen in lymphocyte migration. *Immunol Today* 9: 43-45, 1988.
95. Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 79: 350-357, 2001.
96. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-717, 1999.
97. Pulendran B, Ahmed R. Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development. *Cell* 124: 849-863, 2006.
98. Rechtschaffen A, Kales A. A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep of Human Subjects. National Institutes of Health, publication 204 ed. Washington DC: United States Government Printing Office, 1968.
99. Román E, Miller E, Harmsen A, Wiley J, von Andrian U, Huston G, Swain SL. CD4 Effector T Cell Subsets in the Response to Influenza: Heterogeneity, Migration, and Function. *J Exp Med* 196(7): 957-968, 2002.
100. Sackstein R, Borenstein M. The effects of corticosteroids on lymphocyte recirculation in humans: analysis of the mechanism of impaired lymphocyte migration to lymph node following methylprednisolone administration. *J Investig Med* 43: 68-77, 1995.
101. Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol* 12: 444-450, 2005.
102. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-763, 2004.
103. Schmidt RF, Lang F. *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage, Heidelberg: Springer Verlag: 203-222, 440-473, 2007.
104. Schrier RW, Masoumi A, Elhassan E. Aldosterone: Role in Edematous Disorders, Hypertension, Chronic Renal Failure, and Metabolic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 1132-1140, 2010.
105. Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, von Andrian UH, Weninger W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 199: 1113- 1120, 2004.

106. Sonder SU, Mikkelsen M, Rieneck K, Hedegaard CJ, Bendtzen K. Effects of spironolactone on human blood mononuclear cells: mineralocorticoid receptor independent effects on gene expression and late apoptosis induction. *Br J Pharmacol* 148: 46-53, 2006.
107. Spencer RL, Miller AH, Stein M, McEwen BS. Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res* 549: 236-246, 1991.
108. Spencer RL, Miller AH, Moday H, Stein M, McEwen BS. Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology* 133: 1941-1950, 1993.
109. Spironolacton-ratiopharm Fachinformation. Ratiopharm GmbH Graf-Arco-Str. 3, 89079 Ulm. Dezember 2007.
110. Stefanski V, Peschel A, Reber S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *J Neuroimmunol* 138: 17-24, 2003.
111. Steyer R, Schwenkmezger P, Notz P, Eid M. Der Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen (MDBF). Handanweisung. Göttingen: Hogrefe, 1997.
112. Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, Tada T, Tsukahara A, Hai T, Minagawa M, Maruyama S, Hatakeyama K, Endoh K, Abo T. Circadian rhythm of leukocytes and lymphocyte subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin Exp Immunol* 110: 500-508, 1997.
113. Tanaka T, Ebisuno Y, Kanemitsu N, Umemoto E, Yang BG, Jang MH, Miyasaka M. Molecular determinants controlling homeostatic recirculation and tissue-specific trafficking of lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 134: 120-134, 2004.
114. Tao Y, Shi JM, Zhang YX, Gao L, Zhan FH. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in lymphoblastic cells and its relationship to glucocorticoid sensitivity. *Zhongguo Shi yan Xue Ye Xue Za Zhi* 19: 109-113, 2011.
115. Trepel M. Neuroanatomie. 4.Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag: 196-214, 2008.
116. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN, Mortensen RM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* 120: 3350-3364, 2010.
117. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3: 867-878, 2003.
118. Weber KT. A Neuroendocrine-Immune Interface, The Immunostimulatory State of Aldosteronism. *Herz* 28: 692-701, 2003.
119. Weber M, Wehling M, Lösel R. Proteins interact with the cytosolic mineralocorticoid receptor depending on the ligand. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H361-365, 2008.
120. Wehling M, Eisen C, Christ M. Aldosterone-specific membrane receptors and rapid nongenomic actions of mineralocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 90: C5-9, 1992.

121. Westermann J, Puskas Z, Pabst R. Blood transit and recirculation kinetics of lymphocyte subsets in normal rats. *Scand J Immunol* 28: 203-210, 1988.
122. Ye P, Yamashita T, Pollock DM, Sasano H, Rainey WE. Contrasting effects of eplerenone and spironolactone on adrenal cell steroidogenesis. *Horm Metab Res* 41: 35-39, 2009.
123. Yee KM, Pringle SD, Struthers AD. Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37: 1800-1807, 2001.
124. Zennaro MC, Hubert EL, Fernandes-Rosa FL. Aldosterone resistance: Structural and functional considerations and new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* [ahead of print] 2011.
125. Zhang TY, Xiaohong D, Daynes RA. The Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol* 174: 879-889, 2005.

7. Anhang

7.1 Befindlichkeitsfragebogen (MDBF)

MDBF

Code/ Name:

Datum: Alter: Jahre

Geschlecht: w m

Instruktion

Im folgenden finden Sie eine **Liste von Wörtern**, die **verschiedene Stimmungen** beschreiben.

Bitte gehen Sie die Wörter der Liste nacheinander durch und kreuzen Sie bei **jedem Wort** das Kästchen an, das die **augenblickliche Stärke** Ihrer Stimmung am besten beschreibt.

Ein Beispiel:

Im Moment fühle ich mich

	überhaupt nicht				sehr
	1	2	3	4	5
wohl	<input type="radio"/>				

Angenommen, Sie würden sich momentan äußerst wohl fühlen, dann würden Sie den Kreis unter Ziffer 5 ankreuzen

Im Moment fühle ich mich

	überhaupt nicht				sehr
	1	2	3	4	5
wohl	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

Bitte beachten Sie dabei folgende Punkte:

- In der Liste sind mehrere Adjektive enthalten, die möglicherweise dieselbe oder eine ähnliche Stimmung beschreiben. Lassen Sie sich dadurch nicht verwirren, und **geben Sie Ihre Antwort bei jedem Adjektiv unabhängig davon, wie Sie bei einem anderen Adjektiv geantwortet haben.**
- Beurteilen Sie nur, wie Sie sich **augenblicklich** fühlen, nicht wie Sie sich im allgemeinen oder gelegentlich fühlen.
- Wenn Ihnen die Antwort schwerfallen sollte, geben Sie die Antwort, die am **chesten** zutrifft.

Geben Sie bitte bei **jedem Wort** ein Urteil ab und lassen Sie keines der Wörter aus.

MDBF-Kurzform A

Datum und Uhrzeit

Im Moment fühle ich mich	überhaupt					sehr
	nicht	1	2	3	4	
1. zufrieden	<input type="radio"/>					
2. ausgeruht	<input type="radio"/>					
3. ruhelos	<input type="radio"/>					
4. schlecht	<input type="radio"/>					
5. schlapp	<input type="radio"/>					
6. gelassen	<input type="radio"/>					
7. müde	<input type="radio"/>					
8. gut	<input type="radio"/>					
9. unruhig	<input type="radio"/>					
10. munter	<input type="radio"/>					
11. unwohl	<input type="radio"/>					
12. entspannt	<input type="radio"/>					

GS

WM

RU

7.2 Stanford-Schläfrigkeits-Skala (SSS)

Stanford-Schläfrigkeits-Skala

Probanden-Nr.: Datum: 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



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

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

Herrn
Prof. Dr. med. Born
Direktor des Institutes für Neuroendokrinologie
im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de
Datum: 05.09 .2008
Aktenzeichen:
(immer angeben !) 08-107

Sitzung der Ethik-Kommission am 16. Juli 2008 – Ihr Schreiben vom 22. August 2008

Antragsteller: Herr Prof. Born

Titel: Einfluß eines Glukocortikoid- und Mineralokortikoid-Antagonisten auf den Freien Gedächtnisabruf und auf Rekognition

Sehr geehrter Herr Prof. Born,

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

Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

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 Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Prof. Dr. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
 Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)
 Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

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

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

8. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Jan Born für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Schlaflabore des Instituts für Neuroendokrinologie zu nutzen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Tanja Lange für die Einarbeitung und Unterstützung beim immunologischen Studienteil, die statistische Auswertung der T-Zell-Daten, die guten Tipps und hilfreichen Korrekturen beim Entstehen dieser Arbeit.

Flurina Meyer danke ich für die Einführung in den Ablauf der Experimente und die praktische Hilfe bei den ersten Probenächten.

Danken möchte ich auch Luciana Besedovsky für die Durchführung der ANOVA und ihre guten Ratschläge und Korrekturen beim Fertigstellen dieser Arbeit. Bei Alexander Tschulakow bedanke ich mich für die Durchführung der nächtlichen FACS-Analysen. Ulrike Rimmele danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung. Bei Susanne Diekelmann bedanke ich mich für die gute Einweisung in die Auswertung von Schlaf-EEGs. Allen Mitarbeitern des Institutes für Neuroendokrinologie danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Anja Niepelt und Anja Otterbein für die Hilfe bei organisatorischen Fragen und der Materialbesorgung. Für die Bestimmung der Hormone danke ich den MTAs des neuroendokrinologischen Labors, Ingrid von Lützu, Heidi Ruf und Christiane Otten.

Besonders bedanke ich mich bei Jonas Klameth. Es hat Spass gemacht, gemeinsam die Experimente durchzuführen und wir konnten uns mit unseren Begabungen sehr gut ergänzen. Bei Lars Graeve bedanke ich mich für die Hilfe bei der Darstellung der Grafiken und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für die Unterstützung während des Studiums und das Interesse an dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Frau Irina für ihre Geduld und Ermutigung während der Experimente, für die Kekse nach einer durchwachten Nacht und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich auch Gott danken, dessen wunderbare Schöpfung ich untersuchen durfte.