

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie und  
Verhaltensneurobiologie Tübingen

**Einfluss einer auditorischen closed-loop Stimulation  
von langsamen EEG-Oszillationen auf zirkulierende  
Natürliche Killerzellen und Granulozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Büttner, Samuel

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Born

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. E. Autenrieth

Tag der Disputation: 15.05.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Elektrophysiologie des Schlafes .....	2
1.1.1	Schlafphasen und Schlafablauf .....	2
1.1.2	Langsame Oszillationen (Slow Oscillations) .....	6
1.1.3	Polysomnographie .....	6
1.2	Modulation des Tiefschlafs (SWS).....	10
1.3	Immunsystem .....	13
1.3.1	Granulozyten .....	13
1.3.1.1	Neutrophile Granulozyten.....	14
1.3.1.2	Weitere Granulozytenpopulationen .....	15
1.3.2	Natürliche Killerzellen .....	16
1.4	Schlaf und Immunsystem .....	17
1.5	Fragestellung und Hypothese.....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1	Probanden.....	20
2.2	Studienaufbau und Studienablauf.....	21
2.2.1	Allgemeiner Studienaufbau .....	21
2.2.2	Studienablauf .....	21
2.2.2.1	Probenacht.....	21
2.2.2.2	Experimentalsitzung.....	22
2.3	Methoden der Datenerhebung.....	25
2.3.1	Polysomnographie .....	25
2.3.2	Closed-loop-Stimulation.....	28
2.3.3	Immunparameter .....	30
2.3.3.1	Blutprobenentnahme und Aufbereitung.....	30
2.3.3.2	Durchflusszytometrische Messung (FACS).....	31
2.4	Auswertung.....	33
2.4.1	Polysomnographie und Spektralanalyse.....	33
2.4.2	Akustisch evozierte Potentiale .....	34
2.4.3	Offline-Detektion von SOs .....	34

2.4.4 FACS und Bestimmung der absoluten Zellzahl .....	35
2.4.5 Statistische Analyse.....	36
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1 Akustisch-evozierte Potentiale (AEP) .....	37
3.2 EEG-Power-Spektrum und SO-Eigenschaften .....	38
3.3 Schlafarchitektur .....	40
3.4 FACS .....	42
3.4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen .....	42
3.5 Einfluss der Stimulation auf die Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen.....	46
3.5.1 Granulozyten.....	46
3.5.2 NK-Zellen .....	48
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1 Effekte der closed-loop Stimulation auf den Schlaf .....	51
4.2 Stimulationseffekte auf die Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen.....	54
4.2.1 Effekte auf NK-Zellen.....	55
4.2.2 Effekte auf Granulozyten .....	58
4.2.3 Mögliche Einflüsse der Stimulation auf Regulations- mechanismen .....	60
4.2.4 Ausblick .....	64
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9 Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>80</b>
<b>10 Danksagung .....</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Arousal
AASM	American Academy of Sleep Medicine
AB	Augenbewegungen
AEP	Akustisch evoziertes Potential
ANOVA	Analysis of variance
AUC	Area under the curve
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
EKG	Elektrokardiographie
EMG	Elektromyographie
EOG	Elektrookulographie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting / scanning
FFT	Fast- Fourier-Transformation
FSC	Forward scatter
GH	Growth Hormone = Wachstumshormon = Somatotropin
HLA	Human Leukocyte Antigen = MHC
MA	Movement Arousal
MHC	Major Histocompatibility Complex = HLA
MPO	Myeloperoxidase
MT	Movement Time
N1-N3	Schlafstadium 1 - 3 (nach AASM)
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NREM	Non-rapid-eye-movement
PANAS	Positive and Negative Affect Schedule
PAP	Präaurikularer Punkt
pVK	Peripherer Venenverweilkatheter

REM	Rapid-eye-movement = R
S1-S4	Schlafstadium 1 - 4 (Rechtschaffen und Kales)
SEM	Standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwerts
SHAM	Kontrollnacht/-bedingung
SO	Slow oscillation (dt. langsame Oszillation)
SSC	Side scatter
STIM	Stimulationsbedingung
SWA	Slow-wave-activity
SWS	Slow-wave-sleep
tDCS	Transcranial direct current stimulation
TMS	Transkranielle magnetische Stimulation
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSD	Total sleep deprivation
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TST	Total sleep time
W	Wachzustand
WASO	Wake after sleep onset

# 1 Einleitung

Schlaf wird im Allgemeinen als reversibler Zustand beschrieben, der mit einer reduzierten Interaktionsfähigkeit mit der Umwelt und einer verminderten Reaktion auf Umgebungsreize einhergeht (Pape, 2014). Er ist essentieller Bestandteil vieler Lebewesen und variiert in der Dauer je nach Lebewesen (Campbell and Tobler, 1984). Für den erwachsenen Menschen wurden als Richtlinie für die empfohlene Dauer an Schlaf pro Tag 7-9 h angegeben (Hirshkowitz et al., 2015, Watson et al., 2015). In diesem Zustand ist die Muskel- und Stoffwechselaktivität reduziert und wir Menschen können im Schlaf unsere Effizienz bzw. Funktionalität, auch von Körper- bzw. Gedächtnisfunktionen, wie z.B. die Konsolidierung von neu erlernten Informationen, in der aktiven Wachphase steigern (Siegel, 2009, Diekelmann and Born, 2010). In dieser Zeitperiode finden nicht nur die bereits erwähnten Prozesse statt, sondern auch Veränderungen im Immunsystem, wie z.B. Veränderungen in der Anzahl zirkulierender Immunzellen. In der vorliegenden Studie wurde die spezifische Rolle des Tiefschlafs bei der Vermittlung des Effekts von Schlaf auf die Anzahl bestimmter Immunzellen der angeborenen Abwehr untersucht. Hierbei erfolgte eine spezifische Verstärkung von Tiefschlaf mittels einer auditorischen Stimulation. Im Folgenden wird zunächst auf die Physiologie von Schlaf und bisherige Studien zur Einflussnahme auf den Tiefschlaf (SWS) eingegangen. Im weiteren Verlauf werden dann die in dieser Studie betrachteten Immunzellen genauer beschrieben. Am Ende der Einleitung findet sich Literatur zum Zusammenhang von Schlaf und dem Immunsystem.

## 1.1 Elektrophysiologie des Schlafes

### 1.1.1 Schlafphasen und Schlafablauf

Schlaf wird subjektiv als Zeitpunkt des Bewusstseinsverlustes definiert, beginnt jedoch mit der sogenannten hypnagogen Phase, die u.a. durch vermehrte Müdigkeit, Gähnen, Konzentrationsverlust und Minderung kognitiver Leistungen gekennzeichnet ist, und endet nach dem Erwachen mit der sogenannten hypnopompischen Phase, die sich anhand von kurzzeitiger Desorientiertheit und kognitiver Verlangsamung charakterisiert (Zschocke and Hansen, 2012). Dazwischen existieren die von Rechtschaffen und Kales im Jahre 1968 beschriebenen Schlafphasen. Diese lassen sich grob in Non-REM- (= Schlafphasen S1 - S4) und REM-Phasen unterteilen (Zschocke and Hansen, 2012). Die Zuordnung zu den einzelnen Schlafphasen erfolgt durch gemeinsame Interpretation der EEG-, EOG- und EMG-Signale je Epoche von 30 s Dauer. Der Goldstandard bei der Messung von Schlaf ist die Polysomnographie, die in Kapitel 1.1.3 näher beschrieben ist.

Als wach wird ein Zustand bezeichnet, der mit einer  $\alpha$ -Aktivität (Hirnwellen mit einer Frequenz von 8 – 13 Hz; > 50 % pro Epoche bei geschlossenen Augen) einhergeht und zusätzlich häufig gemischte EEG-Frequenzen aufweist. Zudem zeigt sich ein hochamplitudiges EMG und, bei offenen Augen, Lidartefakte sowie meist zahlreiche Augenbewegungen im EOG (Rechtschaffen et al., 1968).

Der Übergang zum Schlafstadium 1 (= S1) ist durch den Abfall der  $\alpha$ -Aktivität auf unter 50 % der Epochendauer definiert. Das EEG zeigt eine insgesamt Verlangsamung auf 2 – 7 Hz und es fehlen K-Komplexe sowie Schlafspindeln, deren Definition im nächsten Abschnitt dargestellt wird. Langsame rollende Augenbewegungen können zusätzlich auftreten (Rechtschaffen et al., 1968).

Das Schlafstadium 2 (= S2) wird durch das Auftreten von Schlafspindeln und K-Komplexen charakterisiert. Schlafspindeln sind durch eine transiente Frequenz von 12 – 14 Hz gekennzeichnet, wohingegen K-Komplexe zu Beginn eine stark negative Auslenkung, gefolgt von einer positiven, aufweisen.



Im Schlafstadium 3 (= S3) finden sich charakteristische Oszillationen mit niedriger Frequenz ( $< 2$  Hz) und hoher Amplitude ( $> 75 \mu\text{V}$ ), welche auch als  $\delta$ -Wellen bezeichnet werden. Sie machen in diesem Schlafstadium einen Epochenanteil von mehr als 20%, aber weniger als 50% aus (Rechtschaffen et al., 1968). Als tiefstes Schlafstadium lässt sich das Stadium 4 (= S4) anhand eines Anteils von  $\geq 50\%$  an  $\delta$ -Wellen definieren (Rechtschaffen et al., 1968). Die Stadien S3 und S4 werden als sog. SWS (engl. Slow Wave Sleep) zusammengefasst und stellen gemeinsam den Tiefschlaf dar. Von besonderem Interesse ist hierbei die im SWS auftretende Slow-Wave-Activity (= SWA), ein Maß für die Menge an niederfrequenten  $\delta$ -Wellen im Frequenzspektrum von 0,5 Hz – 4,0 Hz (Greene and Frank, 2010, Davis et al., 2011). Die SWA zeigt ein verstärktes Auftreten zu Beginn der Nacht und anschließend einen zunehmenden Abfall im Verlauf sowie eine erhöhte Frequenz und Amplitude je länger die vorherige Wachzeit betrug (Belleli et al., 2014). Im REM-Schlafstadium zeigt sich eine eher flache, variierende EEG-Aktivität - ähnlich dem Stadium S1 - mit zum Teil vorhandener  $\alpha$ -Aktivität, die häufig 1-2 Hz langsamer auftritt. Zudem erreicht die EMG-Amplitude den niedrigsten Zustand während des Schlafs, es sind die typischen schnellen Augenbewegungen (engl. REM) detektierbar und sog. Sägezahnwellen können auftreten (Rechtschaffen et al., 1968).

Bewegungen des Probanden, einhergehend mit EEG- bzw. EOG-blockierenden muskulären oder anderen Artefakten, welche mehr als 50% einer Epoche einnehmen und beidseits von Schlafstadien flankiert werden, werden als sogenannte „Movement Time“ (= MT) bezeichnet. Davon sind „Movement arousals“ (= MA) abzugrenzen, die sich über einen i.d.R. kurzzeitigen Anstieg im EMG-Kanal sowie einer damit zusammenhängenden Veränderung des Musters in einem zusätzlichen Kanal definiert sind und nicht als separates Stadium abgegrenzt werden (Rechtschaffen et al., 1968). Die Charakteristika der einzelnen Schlafstadien sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 1: Darstellung der Definitionskriterien der einzelnen Wach- und Schlafstadien**

Stadium		Rhythmus	Frequenz	Eigenschaften	EMG	EOG
<b>Wach</b>	Denken	$\gamma$	30 – 80 Hz	-	Hoch	-
	Augen geöffnet	$\beta$	14 – 30 Hz	$\alpha$ -Blockade	Hoch	Scharfe AB, Artefakte
	Augen geschlossen	$\alpha$	8 – 13 Hz	$\alpha > 50 \% /$ Epoche	Hoch	Scharfe AB, Artefakte
<b>NON-REM</b>	S1 / N1	$\theta$	4 – 7 Hz	$\alpha < 50 \% /$ Epoche	Niedriger	Rollende AB
	S2 / N2	Gemischt	Gemischt	Schlafspindeln / K-komplexe	Niedriger	Wenig bis keine AB
	S3 / N3	$\delta$	< 4 Hz	$50 \% > \delta > 20\%$	Niedriger	Wenig bis keine AB
	S4 / N3	$\delta$	< 4 Hz	$\delta > 50 \%$	Niedriger	Wenig bis keine AB
<b>REM (R)</b>		Gemischt	Gemischt	Sägezahnwellen	Flach	Scharfe AB

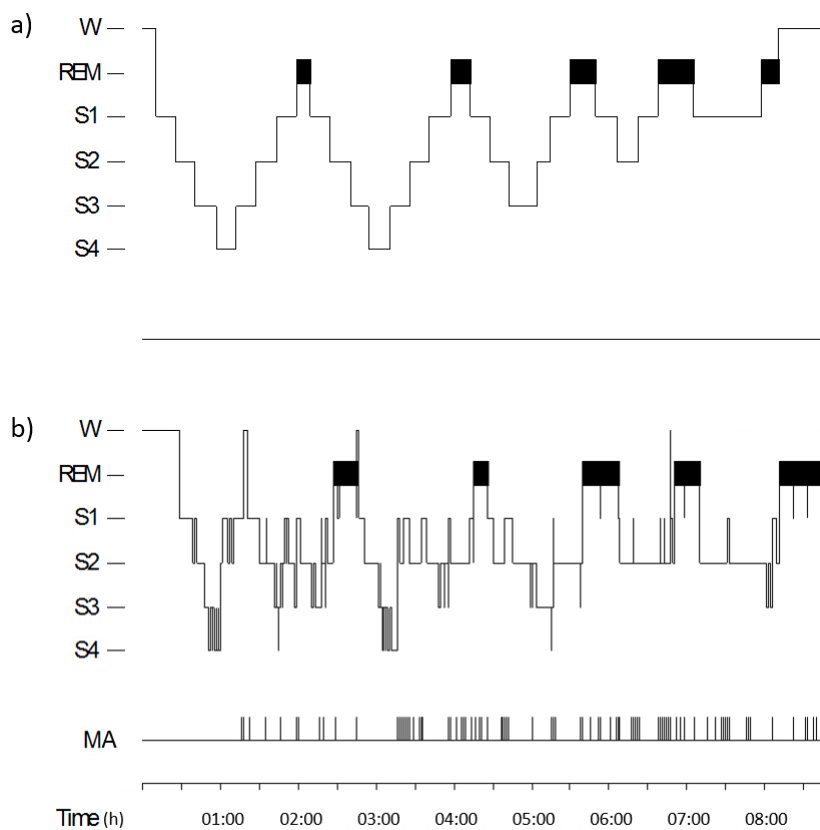
Die Tabelle beinhaltet mehrere Gesichtspunkte bzw. Definitionskriterien der einzelnen Wach- bzw. Schlafstadien mit den entsprechenden EEG-Rhythmen bzw. -Frequenzen sowie Angabe der jeweiligen Eigenschaften / Besonderheiten und Veränderungen der EMG- und EOG-Signale. Die Nomenklatur der Schlafstadien beinhaltet sowohl die von Rechtschaffen und Kales definierte (W, S1, S2, S3, S4, REM), als auch die der American Academy of Sleep Medicine (W, N1, N2, N3, R). AB = Augenbewegungen (Behrends et al., 2017, Rechtschaffen et al., 1968, Zschocke and Hansen, 2012)

Die im Jahre 2007 von der American Academy of Sleep Medicine (AASM) neu eingeführte Scoring-Richtlinie empfiehlt eine leicht veränderte Vorgehensweise bei der Zuteilung zu den einzelnen Schlafstadien. Hierbei entsprechen die Schlafstadien S1 und S2 den neuen Stadien N1 und N2. Die Tiefschlafphasen S3 und S4 werden unter N3 zusammengefasst, das REM-Stadium als R-Stadium gekennzeichnet sowie das Stadium der „Movement Time“ abgeschafft. (Moser et al., 2009)

In dieser Studie soll nach dem Scoring-System von Rechtschaffen und Kales vorgegangen werden, da insgesamt der Fokus auf einer detaillierten Analyse des SWS, also der Stadien S3 und S4, liegt.

Während des Nachtschlafes zeigt sich ein klassisches Muster im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Schlafstadien, typischerweise einhergehend mit rhythmischen Wechseln zwischen Non-REM- und REM-Phasen (Zschocke and Hansen, 2012). Dieser Non-REM/REM-Zyklus wird durchschnittlich alle 90 min mit einer Häufigkeit von ca. 4 – 6 Mal pro Nacht durchlaufen (Hartmann, 1968, Zschocke and Hansen, 2012). In der NonREM-Phase werden normalerweise die

vier bereits beschriebenen Schlafstadien (S1-S4) nacheinander durchschritten, was als orthodoxer Schlaf bezeichnet wird und charakteristisch eine erhöhte Aktivität des Parasympathikus aufweist (Behrends et al., 2017). Im Anschluss daran werden typischerweise die Schlafstadien in umgekehrter Reihenfolge erneut durchlaufen, bis sie im REM-Stadium, welches zwischen 10 - 50 min andauert, münden (Behrends et al., 2017). REM-Phasen nehmen in der Länge über die Nacht hin zu und werden zusätzlich insgesamt stabiler, wohingegen der Tiefschlaf i.d.R. in der ersten Nachthälfte überwiegt und zum Morgen hin abnimmt (Zschocke and Hansen, 2012). Der schematische Ablauf eines klassischen Nachtschlafes ist zur Verdeutlichung in Abbildung 1a, ein tatsächlicher Verlauf in Abbildung 1b, in Form von sog. Hypnogrammen dargestellt.



**Abbildung 1: Hypnogramm einer prototypischen Nacht (a) und einer tatsächlichen Versuchsnacht (b) in Stunden nach Start der Aufzeichnung**

a) Im oberen Hypnogramm ist ein schematisches Schlafprofil dargestellt. Es werden nacheinander die einzelnen Schlafstadien S1 – S4 durchschritten und im Anschluss in umgekehrter Reihenfolge bis zum Eintritt des REM-Schlafes durchlaufen. Dieser Zyklus wiederholt sich mehrfach pro Nacht und geht mit einer Zunahme des REM-Schlafes und einer Abnahme des Tiefschlafes einher.

b) Das Schlafprofil einer tatsächlichen Versuchsnacht unterscheidet sich strukturell von der schematischen Darstellung mit stärkeren Schwankungen in der Dauer und Abfolge einzelner Schlafphasen. Zudem sind im EEG häufig „Movement Arousals“ (= MA = Bewegungsartefakte) detektierbar.

### 1.1.2 Langsame Oszillationen (Slow Oscillations)

SWS ist, wie bereits eingangs erwähnt, durch langsame  $\delta$ -Wellen charakterisiert. Diese langsamen EEG-Wellen (engl. Slow Waves) können weiter unterteilt werden. Sehr langsame, zyklische Wellen mit einer Frequenz von  $\leq 1$  Hz werden dabei als langsame Oszillation (bzw. engl. Slow Oscillation = SO) bezeichnet (Neske, 2015, Sanchez-Vives, 2013). Die Entstehung der SO erfolgt zum einen hauptsächlich durch sogenannte Schrittmacherzellen in Schicht V des Kortex, zum anderen werden deren Eigenschaften auch durch subkortikale Strukturen, wie den Thalamus, reguliert (Neske, 2015). Die möglichen bisher postulierten Funktionen der SOs umfassen zum einen die Synchronisation von höher frequenten Oszillationen, zum anderen die Gedächtniskonsolidierung sowie die Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase (Diekelmann and Born, 2010, Neske, 2015). Zudem wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Power im SO-Bereich und der Entstehung von Immunantworten nach Impfungen gezeigt (Lange et al., 2011), wobei die genaue Rolle von SOs im Immunsystem bislang kaum erforscht ist.

### 1.1.3 Polysomnographie

Unter dem Begriff Polysomnographie versteht man die Registrierung und Aufzeichnung von physiologischen Veränderungen während des Schlafes. Dabei eingeschlossen sind sowohl elektroenzephalographische (= EEG, Gehirnaktivität), als auch elektromyographische (= EMG, Muskelaktivität) und elektrookulographische (= EOG, Augenbewegungen) Signale.

#### Elektroenzephalographie (EEG)

Die Entwicklung des EEGs begann in den 1920er Jahren mit dem Psychiater Hans Berger der Universität Jena, welcher dieses als erster beschrieben hatte (Pape, 2014). Mithilfe des Elektroenzephalogramms können Hirnströme bzw. elektrische Potentialschwankungen an der Oberfläche des Kopfes, der Kopfhaut, abgeleitet werden (Pape, 2014). Diese Potentialänderungen entstehen durch

Verschiebungen von elektrischen Ladungsträgern (Ionen) im Rahmen von transmembranösen Transportvorgängen (Wellach, 2015). Anatomisch gesehen handelt sich bei den potenzialgenerierenden Strukturen um Neuronen des Kortex, deren Summenpotential abgeleitet und registriert werden kann (Pape, 2014). Einfluss auf diese kortexnahen Neuronen bzw. Pyramidenzellen nehmen unter anderem auch subkortikale Strukturen wie der Thalamus, die Formatio reticularis und der Nucleus reticularis (Wellach, 2015). Der Thalamus übernimmt hierbei vornehmlich eine sogenannte aktivierende, vigilanzsteigernde „Schrittmacherfunktion“ und fungiert als Relais-, Transfer- und Filterstelle bei der Verarbeitung von afferenten Signalen (Wellach, 2015). Werden Neuronenpopulationen synchron und rhythmisch aktiviert, ergeben sich rhythmische Potentiale mit hoher Amplitude, wohingegen sich bei desynchronisierter Aktivität niedrigamplitudige und arrhythmische Potentiale im EEG detektieren lassen (Pape, 2014). Es werden somit unterschiedliche Rhythmen im EEG gefunden (siehe Tabelle 2).

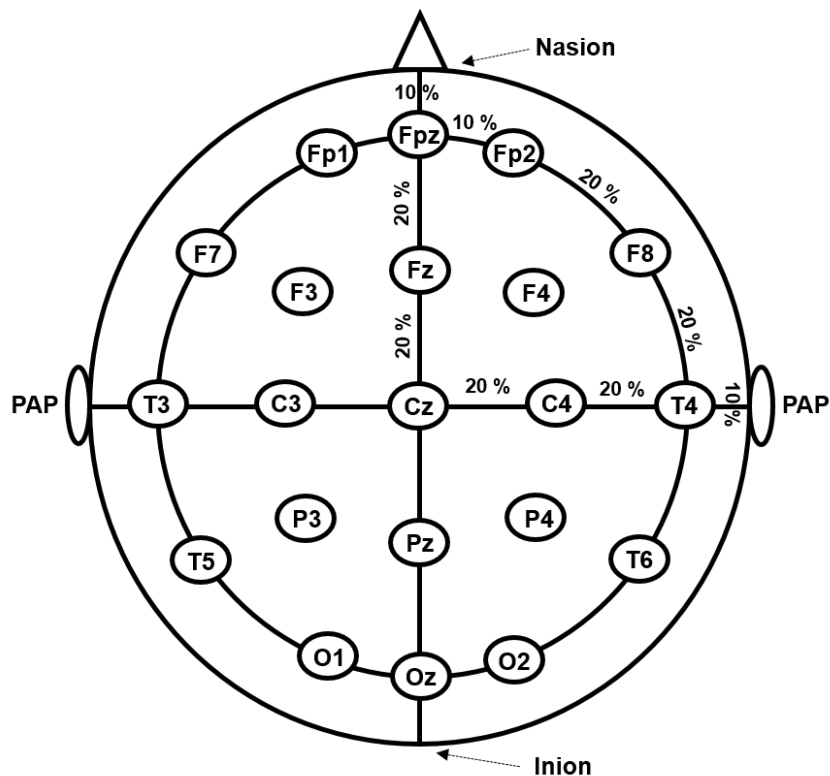
**Tabelle 2: Darstellung der EEG-Rhythmen mit dem dazugehörigen Frequenzbereich**

Rhythmus	Frequenzbereich
Gamma ( $\gamma$ )	30 – 80 Hz
Beta ( $\beta$ )	14 – 30 Hz
Alpha ( $\alpha$ )	8 – 13 Hz
Theta ( $\theta$ )	4 – 8 Hz
Delta ( $\delta$ )	< 4 Hz

Die linke Spalte der Tabelle gibt die Bezeichnung des EEG-Rhythmus, die rechte Spalte den dazugehörigen Frequenzbereich an (Behrends et al., 2017).

Die Ableitung der elektrischen Signale erfolgt entsprechend dem international gültigen 10-20-System, dessen Elektrodenpositionen in Abbildung 3 dargestellt sind. Als Orientierung gelten verschiedene anatomische Landmarken. Ventral liegt hierbei das Nasion (Nasenwurzel), dorsal das Inion (Praetuberantia occipitalis externa) und jeweils die lateral gelegene Vertiefung vor dem Tragus (Fossa praeauricularis) (Wellach, 2015). Im Schnittpunkt der Verbindungslinien zwischen Nasion und Inion bzw. beiden präaurikularen Punkten (PAPs), nach jeweils 50 % der jeweiligen Gesamtstrecke, liegt die zentrale Elektrode Cz

(Spriggs, 2014). Die Abstände zu den anderen Elektroden sind in Abbildung 2 in Prozent der jeweiligen Gesamtstrecke angegeben, welche je nach anatomischer Lage eine andere Bezeichnung erhalten. So erhalten frontale Elektroden „F“, zentrale Elektroden „C“, temporale Elektroden „T“, parietale Elektroden „P“ und okzipitale Elektroden „O“ als Kennzeichnung. In der rechten Hemisphäre werden zusätzlich gerade Zahlen vergeben, in der linken ungerade. Die Zusatzbezeichnung mit dem Buchstaben „z“ wird hierbei für jeweils mittig gelegene Elektroden vergeben. Als Referenz- bzw. Bezugselektroden wird zudem auf jeder Seite jeweils eine Elektrode retroaurikular angebracht und die Elektrodensignale zu diesen referenziert.



**Abbildung 2: Darstellung der EEG-Elektroden-Positionen entsprechend dem internationalen 10-20-System**

Abgebildet sind die Elektrodenpositionen nach den Vorgaben des internationalen 10-20-Systems mit Blickrichtung von kranial auf die Kopfoberfläche. Als Orientierungspunkte gelten ventral das Nasion und dorsal das Inion (Praetuberantia occipitalis externa). Beidseits lateral wird jeweils die Vertiefung vor dem Tragus (= Fossa praeauricularis) zur Orientierung gewählt. Am Schnittpunkt beider Verbindungslinien befindet sich die zentrale Elektrodenposition Cz (Spriggs, 2014). Die Abstände zwischen den Elektroden sind in der Abbildung in Prozent angegeben und spiegeln den prozentualen Anteil an der Gesamtdistanz zwischen Nasion und Inion bzw. zwischen beiden PAPs (= präaurikularen Punkten) wider. Basierend auf (Wellach, 2015)

### Elektrookulographie (EOG)

Das EOG ist im Speziellen zur Zuordnung der EEG-Signale zu den einzelnen Schlafstadien und besonders zum REM-Schlaf-Stadium unabdingbar. Hierbei macht man sich eine Eigenschaft des Auges zu Nutze, die für die Entstehung eines messbaren Dipols verantwortlich ist. Das Auge besitzt ein Ruhepotential, das sich im Bereich der Pigmentepithelschicht und beidseits der Membrana limitans externa ausbildet. Das Summenpotential ergibt insgesamt einen elektrischen Dipol mit negativer Ladung auf retinaler Seite und positiver Ladung auf kornealer Seite (= korneoretinales Potential). Die Richtung und Lage dieses Potentials entspricht zudem der Achse des Auges, weshalb Richtungsänderungen des Auges anhand von Potentialveränderungen registriert werden können.

### Elektromyographie (EMG)

Neben dem EEG und EOG ist auch das EMG ein wichtiger Teil der Polysomnographie und ermöglicht eine genaue Schlafanalyse mit eindeutiger Charakterisierung der jeweiligen Schlafphasen. Die Messung der Signale beruht vorrangig auf einer Registrierung der muskulären Aktivität und somit einer Veränderung des elektrischen Potentials von Muskelfasern. Die Elektroden werden hierbei am Kinn des Probanden, ungefähr 1 – 2 cm von der Mittellinie, angebracht (Zschocke and Hansen, 2012).

## 1.2 Modulation des Tiefschlafs (SWS)

Der SWS nimmt zahlreiche Aufgaben ein, stellt u.a. eine Erholungsphase dar und hat einen Einfluss auf die Schlafqualität (Dijk, 2009). Zudem spielt der SWS eine entscheidende und optimierende Rolle bei der Verarbeitung und Verknüpfung neu erlernter bzw. aufgenommener Informationen mit Inhalten des Langzeitgedächtnisses und verursacht damit eine Veränderung der Gedächtnisrepräsentation (Diekelmann and Born, 2010). Durch die vielseitigen Aufgaben und Funktionen des SWS ist der wissenschaftliche Fokus auf die gezielte Förderung des SWS und der währenddessen vorkommenden SOs gelegt worden und es existieren zahlreiche Studien zu unterschiedlichen Möglichkeiten der Einflussnahme auf den Tiefschlaf, von denen im Folgenden einzelne beschreiben werden.

Studien zur pharmakologischen Verstärkung des SWS zeigen z.B. bei Einsatz von Tiagabin und Gaboxadol nach Schlafentzug eine erfolgreiche Verlängerung des SWS, wobei das Risiko für Nebenwirkungen, Abhängigkeit und Toleranzentwicklung immer in Betracht gezogen werden muss (Bellesi et al., 2014).

Neben der pharmakologischen Möglichkeit den SWS positiv zu beeinflussen, erwies sich auch die 2006 von Marshall et al. veröffentlichte Methode der transkraniellen Gleichstromstimulation (tDCS = transcranial direct current stimulation) als erfolgreich. Mit dieser wurden oszillierende elektrische Potentiale (0,75 Hz), die in der Frequenz denen der natürlichen SOs entsprechen, erzeugt, was zu einer Verstärkung des SWS und endogen-erzeugter SOs, einer Verbesserung der deklarativen Gedächtnisfunktion und einem Anstieg der frontalen langsamen Spindelaktivität führte (Marshall et al., 2006). Stimulationen in einem anderen Frequenzbereich (5 Hz) hingegen führten zu keiner Veränderung des deklarativen Gedächtnisses, verursachten aber eine Verminderung der SOs (Marshall et al., 2006).

Eine weitere erfolgreiche Methode zur Induktion von SOs stellt nach Massimini et al. (2007) die transkranielle magnetische Stimulation (= TMS) dar. Dazu wurden den Probanden TMS-Pulse mit  $< 1$  Hz appliziert, von denen jeder



einzelne eine langsame hochamplitudige Oszillation zur Folge hatte, welche sich in ihrer Charakteristik nicht von einer natürlichen SO unterschied und zu einer Vertiefung des Schlafes führte sowie in einer Steigerung der SWA resultierte (Massimini et al., 2007).

Sowohl die pharmakologische Induktion von SWA also auch die transkraniellen Methoden stellen aufwändige, komplexe und auch z.T. kostenintensive Verfahren zur Beeinflussung des Tiefschlafs dar, weshalb Tononi et al. im Jahre 2010 praktikablere und einfachere alternative Stimulationsverfahren entwickelten. Dabei legten sie besonderen Fokus auf die auditorische Stimulation und applizierten Blöcke mit 15 – 20 Tönen (Dauer: 50 ms, Frequenz: 0,8 Hz bis 2 Hz) während des NREM-Schlafes, die jeweils in ihrer Intensität individuell angepasst wurden. Diese Methode induzierte sowohl einen Anstieg der SWA, also auch eine Zunahme der Anzahl und Größe der Slow-Waves in den Stimulationsblöcken (Tononi et al., 2010).

In Folge der Stimulierbarkeit der SOs wurde von Ngo et al. 2013 das Konzept einer rhythmischen Stimulation verfolgt (Ngo et al., 2013a). Dabei durchliefen die Probanden drei verschiedene Versuchsbedingungen. In der ersten Bedingung wurde zwei Minuten vor Start der Versuchsnacht mit einer rhythmischen Stimulation mit 0,8 Hz begonnen und diese bis 90 min nach Start durchgeführt. In der zweiten Bedingung erfolgten Start und Ende nach gleichem Prinzip, nur die Stimulationsrate wurde dabei variabel gewählt (Interstimulusinterval 0,125 s – 5 s). Der Stimulus war in allen drei Bedingungen ein Klick mit einer Dauer von 50 ms. Die letzte Bedingung diente der Kontrolle mit ausschließlicher Stimulusapplikation in den zwei Minuten vor Beginn der Nacht im Wachzustand und mit offenen Augen. Das Ergebnis zeigte vor allem während der Stimulation mit 0,8 Hz eine Steigerung der Power im SO-Band im NREM-Schlaf und SWS kurz nach dem Einschlafen zu Beginn der Nacht (Ngo et al., 2013a).

In einer zweiten Studie von Ngo et al. (2013) wurde der Stimulationsalgorithmus geändert und zwei unterschiedliche Stimulationsbedingungen durchgeführt, die im Hinblick auf Verbesserung der Gedächtniskonsolidierung durch die akustische Stimulation konzipiert wurden (Ngo et al., 2013b). Die primär angewandte Methode der closed-loop Stimulation im SWS wird in Kapitel 2.3.2 im Detail

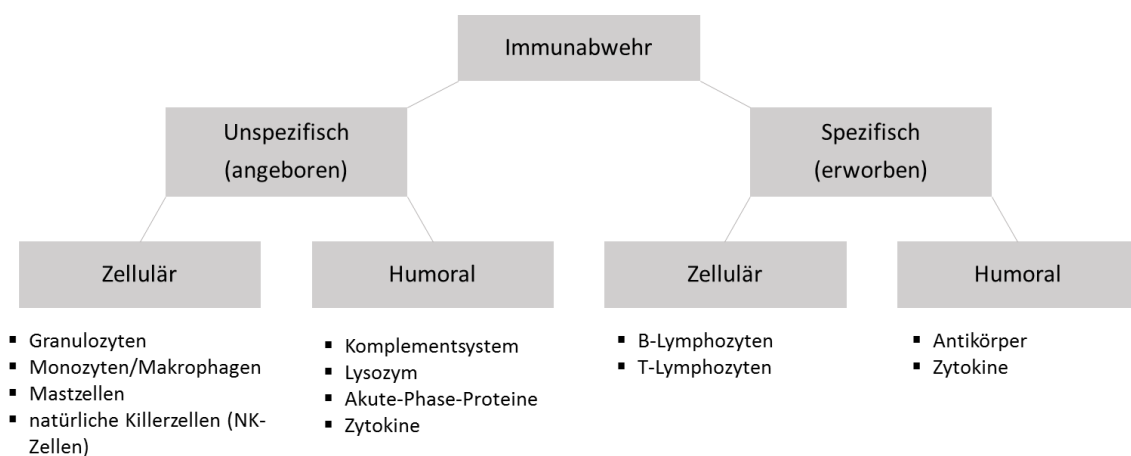
erläutert und stellt die Grundlage der in dieser Studie eingesetzten Stimulationsmethode dar. Bei dieser Form der Stimulation fällt der Stimulus auf den Peak der registrierten SO. Der Erfolg dieser Methode konnte durch eine Verstärkung der SWA sowie anhand einer verbesserten Gedächtniskonsolidierung gezeigt werden (Ngo et al., 2013b). Ein sich davon unterscheidendes Stimulationsprotokoll, mit sofortiger Stimulusapplikation nach Detektion einer SO, d.h. in einer negativen Halbwelle platziert (= Out-of-phase Stimulation erwies sich als nicht wirksam (Ngo et al., 2013b).

Um die Grenzen der auditorischen Stimulation definieren zu können, wurden zwei weitere Studien von Ngo et al. konzipiert (Ngo et al., 2015). In der ersten Studie erfolgte der Vergleich einer Kontrollbedingung mit der sogenannten Driving-Stimulation, die kontinuierlich auditorische Stimuli in einem Abstand von 1s nach Detektion einer SO im SWS applizierte, bis keine SO mehr detektiert werden konnte. Hierbei wurden maximal vier Stimuli hintereinander appliziert. In der zweiten Studie wurde die bereits erwähnte closed-loop Stimulation mit der Driving-Stimulation verglichen. Die Dauer der Stimulation betrug jeweils 210 Minuten. Zusätzlich wurde die Gedächtniskonsolidierung in den einzelnen Bedingungen bestimmt. Als Ergebnis zeigte sich eine, durch die Driving-Stimulation im Vergleich zur Kontrollbedingung ausgelöste, Amplitudenvergrößerung der SOs, eine Verlängerung der SO-Abfolgen, eine erhöhte Spindel-Aktivität sowie eine verbesserte Gedächtniskonsolidierung. Es zeigte sich jedoch im Vergleich kein weiterer Vorteil gegenüber der closed-loop Stimulation (Ngo et al., 2015).

Aufgrund der erläuterten Datenlage und der praktikablen Durchführbarkeit, wurde in Folge die closed-loop Stimulation bei der Durchführung der Studie als Stimulationsmethode gewählt.

### 1.3 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Abwehrsystem des menschlichen Körpers gegen körperfremde und -schädigende Substanzen bzw. Organismen. Es besteht aus zwei Subgruppen, zum einen der angeborenen (natürlichen, unspezifischen) Abwehr und zum anderen der erworbenen (adaptiven, spezifischen) Abwehr. Beide Gruppen besitzen jeweils zelluläre als auch humorale (im Blutplasma vorkommende) Bestandteile, wie in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Immunabwehr**

Die Abbildung stellt die zwei großen Subgruppen der Immunabwehr (unspezifisch/spezifisch) mit ihren einzelnen zellulären sowie humoralen Bestandteilen gegenüber. Nach (Behrends et al., 2017)

#### 1.3.1 Granulozyten

Granulozyten sind Immunzellen, welche ihren Namen aufgrund der zahlreichen, im Zytoplasma vorkommenden Granula erhalten haben. Je nach Aufnahme von zytologischen Farbstoffen in der Pappenheim-Färbung unterscheidet man drei unterschiedliche Gruppen. Von den etwa 5.000 Leukozyten /  $\mu\text{l}$  Blut sind 60 % neutrophile Granulozyten (55 % Segment- und 5 % Stabkernige), 3 % Eosinophile Granulozyten und < 1 % Basophile Granulozyten. (Lüllmann-Rauch, 2009)

Insgesamt befinden sich jedoch nur weniger als 20 % der Granulozyten im peripheren Blut, ca. 30 % im Knochenmark und mehr als 50 % im Interstitium (Behrends et al., 2017).

Da die neutrophilen Granulozyten prozentual gesehen sowohl innerhalb der Gruppe der Leukozyten als auch in der der Granulozyten den größten Anteil tragen, liegt der Fokus dieser Studie hauptsächlich auf dieser Zellpopulation.

### 1.3.1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind Immunzellen bzw. Leukozyten im menschlichen Organismus und spielen eine große Rolle bei der Elimination von fremden Organismen wie z.B. Bakterien oder Pilzen, indem sie diese, nach Emigration ins betroffene Gewebe, phagozytieren, NETs (=Neutrophil Extracellular Traps) installieren und ihre präformierten Granula mit entsprechenden Enzymen, Proteinen und oxidativen Substanzen sezernieren (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Diese Granula werden in peroxidasepositive Granula bzw. Azurophile Granula (Matrix enthält u.a. MPO (= Myeloperoxidase), Elastase, Defensin und Lysozym) und peroxidasenegative Granula, bestehend aus Spezifischen Granula (Matrix u.a. mit Kollagenase, Histaminase und Sialidase) und Gelatinase-Granula (Matrix u.a. mit Gelatinase, Lysozym und Acetyltransferase), eingeteilt (Faurischou and Borregaard, 2003). Die Größe (Durchmesser) dieser Zellen beträgt durchschnittlich 9 – 15 µm (Prinyakupt and Pluempitiwiriyawej, 2015). Auf ihrer Oberfläche tragen neutrophile Granulozyten zahlreiche CD (= Cluster of differentiation)-Oberflächenmarker, wobei die Oberflächenmarker CD11b, CD16 und CD66b charakteristisch sind (Lakschevitz et al., 2016). Der Kern einer reifen Zelle ist lobuliert und kann aus ca. 2 – 6, bzw. meist 3 – 4 Segmenten bestehen (Carvalho et al., 2015). Die Halbwertszeit dieser Zellen im Blut liegt bei unter einem Tag und führt zu einer hohen, im Knochenmark stattfindenden Zellproduktionsrate von ca.  $5 \times 10^{10}$  –  $10 \times 10^{10}$  Zellen pro Tag (Summers et al., 2010, Lahoz-Beneytez et al., 2016). Nach Abschluss ihres Reifungsprozesses verbleiben die meisten neutrophilen Granulozyten initial für 4 – 6 Tage im Knochenmark des Menschen und bilden die sogenannte Knochenmarkreserve

mit ca.  $6 \times 10^{11}$  Zellen. Nach Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die neutrophilen Granulozyten im Blut wovon ein Teil dieser Zellen aus dem Blutstrom emigriert und den „Marginalen Pool“ von Granulozyten bildet (Summers et al., 2010). Dieser entsteht durch Wanderung der Granulozyten in kleine, periphere Gefäße der Kapillaren (= Margination) (Goldsmith and Spain, 1984). Dieser Sachverhalt konnte in einer Studie von Mauer et al. (Mauer et al., 1960) gezeigt werden, in welcher nach Infusion von Granulozyten ca. 50 % davon aus dem Blutstrom verschwunden waren. In einer Folgestudie wurde die Verteilung der Granulozyten bestimmt und von den insgesamt  $65 \times 10^7$  Granulozyten / kg des im Blut vorhandenen Granulozytenpools befanden sich 49 % ( $31,7 \times 10^7$  Granulozyten / kg) im zirkulierenden Anteil und 51 % ( $33,3 \times 10^7$  Granulozyten / kg) in dem sogenannten marginalen Granulozytenpool (Athens et al., 1961). Organe, welche hierbei hauptsächlich beteiligt sind, sind sowohl die Leber, Milz und das Knochenmark als auch möglicherweise die Lunge (Summers et al., 2010).

Die relativ kurze Halbwertszeit legt einen konstanten Abbau der neutrophilen Granulozyten nahe, welcher vornehmlich in den drei Organen der bereits genannten Margination, der Leber, Milz und im Knochenmark, stattfindet (Furze and Rankin, 2008)

### 1.3.1.2 Weitere Granulozytenpopulationen

#### Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind multifunktionale Zellen des Immunsystems, die hauptsächlich im Gewebe und nur in geringer Anzahl im Blut (s.o.) vorkommen und sowohl bei allergischen Reaktionen eine Rolle spielen, als auch bei der Bekämpfung von Wurminfektionen benötigt werden und zudem weitere Aufgaben wie z.B. eine immunregulatorische Funktion sowie eine sekretorische (zytotoxische) Komponente besitzen (Legrand et al., 2008).

### Basophile Granulozyten

Wie bereits weiter oben beschrieben machen Basophile Granulozyten weniger als 1 % der Leukozyten im peripheren Blut aus. Sie spielen gleich wie die Eosinophilen Granulozyten eine Rolle bei der Bekämpfung von Wurminfektionen, bei allergischen Reaktionen, Hypersensitivitätsreaktionen und Anaphylaxie (Cromheecke et al., 2014).

### 1.3.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (= NK-Zellen) sind Zellen der angeborenen Immunabwehr, gehören zur Zellpopulation der Lymphozyten und tragen einen Anteil von ca. 10 - 20 % der im peripheren Blut vorkommenden Lymphozyten (Zhang et al., 2007). Sie kommen jedoch nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in zahlreichen weiteren Organen, wie z.B. Leber, Milz, Knochenmark, Uterus, Haut und Lunge vor (Björkström et al., 2016). Die Funktion der NK-Zellen ist vielfältig und reicht von der Bekämpfung entarteter Tumorzellen und Infektionen (vornehmlich durch Viren (Zhang et al., 2007)) bis hin zu einer immunregulatorischen Funktion, welche eine Interaktion von NK-Zellen mit Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und dendritischen Zellen zu Grunde legt (Vivier et al., 2008). Zudem zeigen sie an ihrer Oberfläche eine charakteristische Expression des CD56-Oberflächenmoleküls und haben sowohl eine zytokinproduzierende (nach Aktivierung) als auch eine zytotoxische Funktion (Montaldo et al., 2013, Mandal and Viswanathan, 2015). Wichtig für das Erkennen bzw. die Unterscheidung von körpereigenen und infizierten oder veränderten Zellen ist die Wahrnehmung von MHC-I (= Major Histocompatibility Complex Class I) Molekülen, welche bei alterierten Zellen weniger stark exprimiert werden und in der Folge über inhibitorische Oberflächenrezeptoren nicht mehr erkannt werden können, was in der Folge zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt (Carella et al., 2004, Mandal and Viswanathan, 2015). Konsekutiv kommt es zur Exozytose sekretorischer Lysosomen aus den NK-Zellen, welche hauptsächlich Granzyme und Perforin enthalten, die gemeinsam die Lyse und den Zelltod der attackierten Zelle verursachen (Topham and Hewitt, 2009).

## 1.4 Schlaf und Immunsystem

Ein wichtiger Nutzen des Schlafes für die Funktion des Immunsystems wurde schon lange postuliert, jedoch wurde diese Annahme erst in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand wissenschaftlichen Interesses. Die wechselseitige Beeinflussung von Schlaf und Immunsystem konnte mittlerweile eindeutig bestätigt werden (Opp, 2009). Hierbei soll im Folgenden hauptsächlich auf Charakteristika der Leukozyten mit ihren Subpopulationen im Hinblick auf schlafassoziierte Besonderheiten eingegangen werden.

In einer im Jahre 2009 von Preston et al. veröffentlichten Studie wurde z.B. die Dauer des Schlafs in Säugetieren und die jeweilige Menge von Leukozyten im Blut im Verlauf der Evolution analysiert (Preston et al., 2009). Hierbei zeigte sich sowohl ein mit längerer Dauer des Schlafes statistisch signifikanter Anstieg der Zellzahl in den Reihen der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie der Lymphozyten und gleichzeitig eine Abnahme der Infektionsrate. Diese Befunde unterstützen die These der immunfördernden Funktion von Schlaf. Jedoch, wie im weiteren Verlauf im Detail beschreiben, geht es in der vorliegenden Studie nicht um die absoluten Granulozytenzahlen im Vergleich einzelner Spezies, sondern um die Verschiebungen bzw. Migration der Zellen während des Tiefschlafs.

Der Mensch unterliegt einem bestimmten Tag-Nacht-Rhythmus, auch zirkadiane Rhythmik genannt, welcher sich periodisch, mit nur geringer Abweichung, ca. alle 24,2h wiederholt und hauptsächlich durch den paarig angelegten Nucleus suprachiasmaticus im Hypothalamus generiert wird (Czeisler and Gooley, 2007). Dieser reguliert zusammen mit verschiedenen Schlafzentren, mehreren neuroendokrinen Achsen und dem autonomen Nervensystem diesen Rhythmus (Lange et al., 2010). Diese zirkadiane Rhythmik wurde auch in immunologischen Geweben der Maus, wie z.B. in Milz und Thymus festgestellt, aber auch in peripherem Blut bzw. Leukozyten des Menschen, deren Anzahl und Oberflächenexpression von Molekülen und Rezeptoren tageszeitenabhängig ist (Arjona et al., 2012). Dies führt zu einem rhythmischen Verlauf der Zellzahlen im Blut, mit einem Peak der Granulozyten am späten Nachmittag / frühen Abend

und für NK-Zellen am späten Nachmittag mit einem konsekutiven Abfall beider Zellzahlen über Nacht (Ackermann et al., 2012).

Doch nicht nur das zirkadiane System ist an tageszeitlichen Änderungen der Zellzahl beteiligt, sondern die Zellen unterliegen auch einer direkten Kontrolle durch Schlaf, welche sich vom Einfluss des zirkadianen Systems abgrenzen lässt. Durch gezielten Schlafentzug konnte z.B. ein Anstieg der Zellzahlen von NK-Zellen detektiert werden (Faraut et al., 2011a, Born et al., 1997). Im Umkehrschluss lässt sich daraus schließen, dass Schlaf einen direkten Einfluss auf NK-Zellen ausübt und dies bei einem geregelten Tag-Nacht-Rhythmus zu einer Absenkung der NK-Zellkonzentration während des Nachtschlafes führt. Eine mögliche Erklärung könnte eine in der Nacht stattfindende Immigration der Zellen aus der Zirkulation in Immungewebe sein, was der Bekämpfung von fremden Organismen im extravasalen Immungewebe dienen könnte (Born et al., 1997). Neben den NK-Zellen werden auch neutrophile Granulozyten durch Schlaf beeinflusst. So zeigt sich auch hier ein signifikanter Anstieg der Zellkonzentration bei Schlafentzug (Lasselin et al., 2015, Liu et al., 2009, Faraut et al., 2011a, Christoffersson et al., 2014). Schlaf hat somit auch auf die Population der neutrophilen Granulozyten einen ähnlich reduzierenden Einfluss und schützt möglicherweise damit z.B. auch durch einen insgesamt niedrigeren Inflammations- und Aktivierungszustand vor einem erhöhten kardiovaskulären Risiko oder auch Diabetes (Christoffersson et al., 2014, Faraut et al., 2011a).



## 1.5 Fragestellung und Hypothese

Das Konzept dieser Studie beruht auf der Grundlage einer bereits in Kapitel 1.2 erläuterten und reproduzierbaren Beeinflussung des SWS durch eine auditorische closed-loop Stimulation, welche durch Applikation von zwei Klick-Tönen während der Up-Phase einer SO zu einer Verstärkung der SO-Power führt (Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015). Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, konnte in mehreren Studien bereits gezeigt werden, dass Schlaf sowohl Granulozyten als auch NK-Zellen reduziert. Doch bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, welcher Mechanismus hinter der Konzentrationserniedrigung steht. Einige Befunde sprechen dafür, dass der Tiefschlaf besonders wichtig für die Regulation des Immunsystems ist (Besedovsky et al., 2019). Deshalb wurde die vorliegende Studie entwickelt, um im Speziellen die Rolle des Tiefschlafs mit seinen charakteristischen SOs zu analysieren. Durch die gezielte Stimulation der SOs sollte untersucht werden, ob diese in die Regulation der Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen involviert sind. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet wie folgt: Eine spezifische Verstärkung von SOs durch den Einsatz einer auditorischen closed-loop Stimulation im Schlaf führt zu einer Reduktion der Anzahl im Blut zirkulierender NK-Zellen und Granulozyten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probanden

In die Studie wurden insgesamt 12 Probanden eingeschlossen. Dabei handelte es sich um ausschließlich männliche Probanden in einem Altersspektrum von 18 bis 30 Jahren. Als Voraussetzung zur Teilnahme mussten die Probanden gesund und normalgewichtig ( $BMI < 26$ ), sowie Nichtraucher sein. Zudem galt die Einnahme von Medikamenten, Schichtarbeit bzw. ein Langstreckenflug innerhalb der letzten sechs Wochen oder eine Blutspende während der letzten acht Wochen als Ausschlusskriterium.

Ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus, ein Vermeiden von stressauslösenden Situationen und kein regelmäßiger Mittagsschlaf waren weitere Voraussetzungen.

Vor Beginn des Experiments erfolgte eine umfassende Aufklärung über den Ablauf der Studie und über mögliche Risiken durch z.B. Blutentnahmen über einen peripheren Venenverweilkatheter (pVK). Nach schriftlicher Einverständniserklärung schloss sich eine Anamnese mit Erhebung einer etwaigen Krankengeschichte sowie eine körperliche Untersuchung an und eine venöse Blutentnahme mit Laboranalyse wichtiger hämatologischer Funktionsparameter wurde durchgeführt. Konnten bei den entsprechenden Untersuchungen keinerlei Auffälligkeiten festgestellt werden, wurde der Proband zur Studie und den Experimentalsitzungen zugelassen. Nach Abschluss der Sitzungen erfolgte die Ausbezahlung der festgelegten Aufwandsentschädigung. Drei Probanden mussten im Verlauf ausgeschlossen werden, zwei davon aus Gründen des Nicht-Ansprechens auf die auditorische Stimulation und bei einem aufgrund von Problemen bei den nächtlichen Blutentnahmen. Somit ergaben sich neun vollständige Datensätze, die bei der Datenanalyse berücksichtigt wurden.

## 2.2 Studienaufbau und Studienablauf

### 2.2.1 Allgemeiner Studienaufbau

Als Studiendesign wurde eine randomisiert-balancierte Studie gewählt, bei der sich pro Proband an eine initiale Probenacht zwei Experimentalsitzungen anschlossen. Die Experimentalsitzungen bestanden aus je einer Sitzung mit Applikation der EEG-gestützten closed-loop Stimulation und einer Kontrollsituation ohne diese, wobei die Zuordnung randomisiert und über alle Probanden balanciert erfolgte.

Während der Probenacht wurde dann, bis auf eine Blutentnahme zur Kontrolle allgemeiner hämatologischer Parameter, keine weitere Entnahme von Blut durchgeführt. Dem entgegenstehend wurden, wie später im Detail beschrieben, in den Experimentalsitzungen zu exakt definierten Zeitpunkten im Verlauf einer Nacht Blutentnahmen durchgeführt. Der Abstand zwischen der Stimulationsbedingung und der Kontrollbedingung betrug dabei mindestens zwei Wochen.

Eine Genehmigung der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität lag unter der Projektnummer 373/2014BO2 vor.

### 2.2.2 Studienablauf

#### 2.2.2.1 Probenacht

Nach Vorauswahl unter Beachtung etwaiger absoluter, bereits oben genannter, Studienausschlusskriterien, wurden die Probanden zu einer Probenacht eingeladen, damit sie sich an die Versuchsbedingungen im Schlaflabor gewöhnen konnten. Hierbei wurde der Proband auf verschiedene Verhaltensregeln während der Versuchsperiode hingewiesen und dazu angewiesen vor der ersten Experimentalsitzung ein Schlafprotokoll über die letzten zwei Nächte zu führen. Wichtig für eine erfolgreiche, verwertbare bzw. mit allen anderen Probanden vergleichbare Durchführung war vor allem ein

regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus. Auf einen Mittagsschlaf sollte verzichtet werden und am Versuchstag sollten ab 12:00 Uhr keine koffeinhaltigen Getränke (z.B. Coca-Cola, Red Bull oder Kaffee) mehr zu sich genommen werden. Auf die Einnahme von Alkohol und Medikamenten musste vor allem am Tag der Experimentalsitzungen verzichtet werden. Darüber hinaus war ein stressfreies Allgemeinbefinden – z.B. keine Klausuren, kein Extremsport, usw. - vor und während der kompletten Versuchszeit wichtig.

#### 2.2.2.2 Experimentalsitzung

Die Experimentalsitzung begann nach Ankunft des Probanden um ca. 20:30 Uhr mit Kontrolle des Schlaftagebuchs. Danach erfolgte das Ausfüllen einiger Fragebögen mit Fragen zum aktuellen Gesundheitsstatus, Schlaf- und Ernährungsgewohnheiten und zum aktuellen Stressniveau. Ebenso wurden besondere Ereignisse hinsichtlich eines erhöhten Stressniveaus in den letzten zwei Tagen vor der Experimentalsitzung abgefragt. Waren keine Auffälligkeiten in der Zeit vor der Sitzung und insbesondere während der letzten zwei Tage zu finden, konnte die Durchführung der Experimentalsitzung beginnen. Zuerst erfolgte die Anlage eines pVKs, da dies für die meisten Probanden einen leichten Stress darstellte und sie deshalb bis zum Start des Experiments eine noch ausreichende Erholungsphase haben sollten. Der venöse Zugang wurde entweder am linken oder rechten Unterarm bzw. Ellenbeuge angelegt und durfte bei Fehlfunktion bzw. Fehlfunktion mit bis zu maximal drei Versuchen erneut angelegt werden. Anschließend wurde der pVK mittels eines Mandrins zum Offenhalten des Zugangsweges versehen und in einer für den Probanden angenehmen Position fixiert.

Im weiteren Verlauf der Vorbereitung schloss sich nun die Positionierung und Anheftung der EEG-, EOG-, EMG-, sowie der zum Monitoring der Vitalfunktion wichtigen EKG-Elektroden an. Eine Vorabprüfung aller Widerstände und Qualität der abgeleiteten Signale sicherte einen reibungslosen späteren Start des Experiments und eine Nachjustierung möglicher Signalschwächen konnte problemlos zu diesem Zeitpunkt durchgeführt werden. Daraufhin wurden alle

Elektroden, außer der Elektroden für die Stimulationssoftware, an den Computer angeschlossen und die entsprechend konfigurierte EEG-Software gestartet. Bei allseits guter Signalqualität wurden anschließend die Signale der EEG-, EOG- und EMG-Elektroden erneut durch das Programm spezifisch getestet, die Stimulationssoftware gestartet und die hierfür notwendigen Elektroden angeschlossen (s.u.). Um im Verlauf die geplanten Blutentnahmen durchführen zu können, wurde nun der pVK über einen Schlauch durch ein Loch in der Wand mit einem Dreiweghahn und einer Infusion verbunden, welche außerhalb des Versuchsraumes angebracht wurden.

Kurz vor Beginn des Experiments und der Experimentalnacht bekam der Proband detaillierte Instruktionen über das Verhalten während der Nacht. Es sollten alle möglichen Störfaktoren, die einen Einfluss auf das Ergebnis des Experiments haben könnten, ausgeschlossen werden. Hierzu wurde der Proband u.a. angehalten technische Geräte auszuschalten und bei Miktionsdrang während der Nacht auf die bereitgestellte Urinflasche zurückzugreifen.

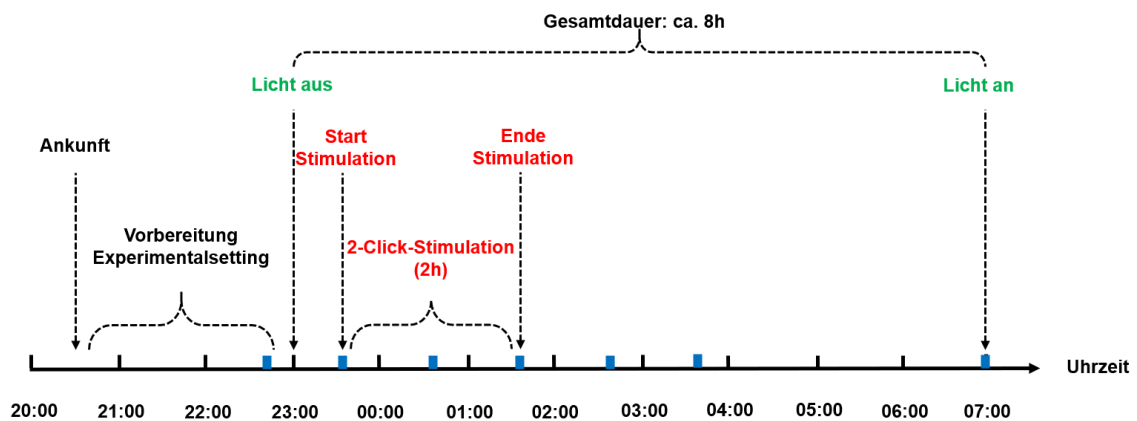
Um 23:00 Uhr erfolgte das Löschen des Lichtes, Schließen der Tür zum Schlaflabor sowie das Starten der polysomnographischen Aufzeichnungen.

Sobald der Proband eingeschlafen war und die kontinuierliche Bestimmung des Schlafstadiums Anzeichen für einen Übergang zum Schlafstadium S3 (Oszillationen mit niedriger Frequenz ( $< 2$  Hz) und hoher Amplitude ( $> 75$   $\mu$ V), Epochenanteil von mehr als 20 % (Rechtschaffen et al., 1968)) zeigte, wurde die Stimulationssoftware gestartet, sobald das Signal fünf hohe Amplitudenausschläge (mind.  $-80$   $\mu$ V) innerhalb von 30 s zeigte und innerhalb der nächsten 10 min keine Zeichen von Arousal detektierbar waren. Somit wurde gewährleistet, dass die Stimulation in stabilem NREM gestartet wurde. Je nach Bedingung erfolgte die Applikation der 2-Klick-Stimulation mit einem Klick oder in der Kontrollbedingung ohne Klick. Bei Erwachen des Probanden, ausgelöst entweder durch die applizierten Klick-Laute, spontan, oder aus anderen Gründen, musste die Stimulation unterbrochen werden und konnte erneut bei mindestens seit ca. 5 min. bestehendem SWS gestartet werden. Ein durch die Stimulation ausgelöstes Erwachen trat jedoch nur in äußerst seltenen Fällen auf.

Die Dauer der Stimulation betrug bei allen Probanden zwei Stunden und wurde danach inaktiviert.

Parallel erfolgten zu definierten Zeitpunkten (siehe Kapitel [2.3.3.1](#)), über die Dauer des Experiments verteilt, sieben Blutentnahmen (siehe Abbildung 4).

Zwischen 06:45 Uhr und 07:15 Uhr wurde der Proband geweckt, möglichst, wenn dieser sich nicht im SWS oder im REM-Schlaf befand. Kurz nach dem Erwachen mussten die Probanden Fragebögen zur Schlafqualität und der aktuellen Schläfrigkeit ausfüllen, die Daten wurden gesichert, die Infusionsmenge notiert und von den Probanden alle Elektroden und der pVK entfernt. Im Anschluss konnten die Probanden mit bereits genannten Hinweisen zum Verhalten während der Studienzzeit und einem Schlafstagebuch für die nächste Sitzung nach Hause entlassen werden.



**Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer Experimentalsitzung**

Die vertikalen blauen Balken entsprechen den Blutprobenentnahmezeitpunkten  $t_1 = 22:45$  Uhr,  $t_2 =$  direkt vor Beginn der Stimulation,  $t_3 = t_2 + 1h$ ,  $t_4 = t_2 + 2h$ ,  $t_5 = t_2 + 3h$ ,  $t_6 = t_2 + 4h$ ,  $t_7 = 07:00$  Uhr

## 2.3 Methoden der Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte anhand eines im Folgenden näher beschriebenen Versuchsaufbaus. Bestandteil dessen waren neben der Polysomnographie zur Schlafstadienbestimmung, die closed-loop-Stimulation sowie die Anlage eines über die Dauer der Experimentalnacht intravenös verbleibenden peripheren Venenkatheters für die geplanten Blutentnahmen.

### 2.3.1 Polysomnographie

Als Elektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet, die an der Kopfhaut (EEG), im Gesicht (EOG und EMG) sowie zur Überwachung des Vitalzustandes am Brustkorb (EKG) befestigt wurden. Um die EEG-Elektroden korrekt positionieren zu können, erfolgte zunächst die Bestimmung des Kopfumfanges mittels eines Maßbandes und Auswahl einer entsprechenden EEG-Kopfmaske. Diese zeichnet sich durch multiple, bereits vorhandene Öffnungen aus, welche, dem jeweiligen Kopfumfang angepasst, die Positionen der Elektroden bei einer standardisierten EEG-Messung angeben. Die exakte Positionierung der EEG-Maske konnte anhand verschiedener anatomischer Orientierungspunkte, analog des in Kapitel 1.1.3 erklärten internationalen 10-20-Systems, vorgenommen werden. Nach erfolgreicher Ausrichtung der EEG-Kopfmaske wurden die für das Experiment notwendigen EEG-Elektrodenpunkte (F3, F4, C3, C4, P3, P4, Fz, Cz, Pz und AFz) markiert (siehe Abbildung 2) und die Maske abgenommen. Im Folgenden mussten an den vorgegebenen Punkten die entsprechenden Elektroden angebracht werden. Im ersten Schritt fand eine Desinfektion des gekennzeichneten Hautareals und ein Aufräuen dessen mit der Paste EVERI160SPE Pasta sgrassante Flacone 160gr (Spes Medica s.r.l, Via Buccari 21, Genova GE, Italien), zur Verbesserung der Ableitung einer elektrischen Kortexaktivität, statt. Im Anschluss erfolgte die Auftragung der Klebepaste Genuine Grass EC2 Electrode Cream (Natus Manufacturing Ltd., IDA Business Park, Gort, Co. Galway, Ireland) auf die Elektroden, welche auf das vorbereitete Hautareal geklebt und mit zusätzlichen Klebestreifen fixiert wurden.

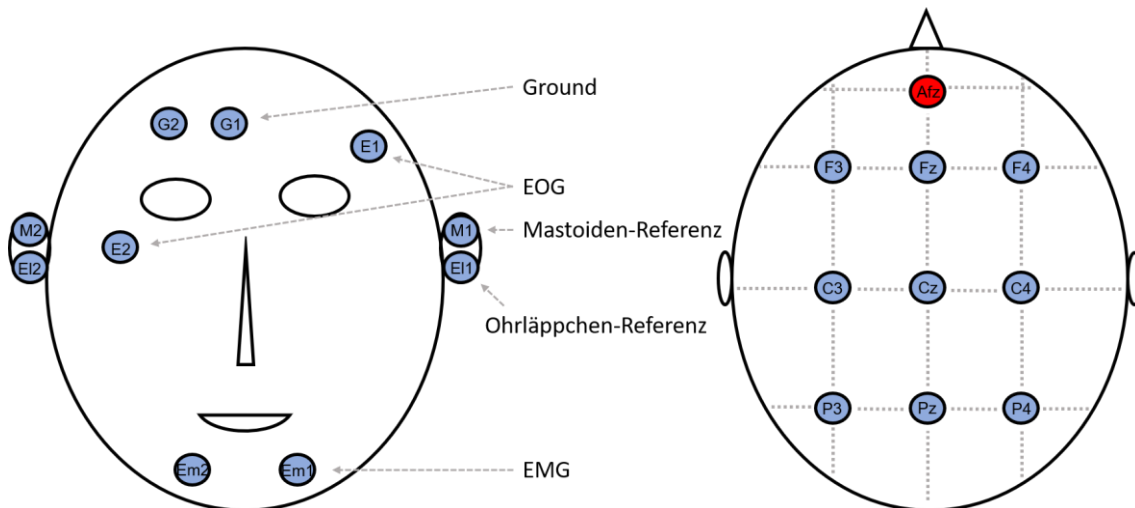
Analog zu den EEG-Elektroden mussten nun die EOG-, EMG-, Ground-, Referenz- und EKG-Elektroden angebracht werden. Das EOG, und die damit registrierten Augenbewegungen, diente vor allem als Grundlage zur Unterscheidung und Zuordnung unterschiedlicher Schlafstadien. Bei den insgesamt zwei EOG-Elektroden applizierte man eine lateral und kaudal des rechten Auges und die andere lateral und kranial des linken Auges (siehe Abbildung 5). Die beiden EMG-Elektroden wurden auf gleicher Höhe im Bereich der Foramina mentale positioniert (siehe Abbildung 5) und waren für die Aufzeichnung und Registrierung muskulärer Aktivität von grundlegender Bedeutung, da nur auf diesem Wege in Zusammenschau mit der EEG- und EOG-Aktivität eine exakte Identifikation von klar definierten Schlafstadien möglich ist (Rechtschaffen et al., 1968). Des Weiteren wurden an der rechten Seite der Stirn zwei Ground-Elektroden - eine davon war für das Stimulationssetup vorgesehen - und auf der linken sowie rechten Seite hinter dem Ohr eine Mastoiden-Referenz hinzugefügt (siehe Abbildung 5).

Zusätzlich musste die im Rahmen der Stimulation notwendige, bereits oben erwähnte AFz-Elektrode zur Detektion der SOs, zusammen mit den zwei dazugehörigen Referenz-Elektroden an beiden Ohrläppchen angebracht und fixiert werden. Die Position der AFz-Elektrode befindet sich dabei 10% anterior zu Fz.

Um eine kontinuierliche Observation der Vitalparameter während des Experiments zu erreichen, erfolgte ein fortlaufendes Aufzeichnen elektrokardialer Aktivität mittels zweier, auf dem Brustkorb angebrachten, EKG-Elektroden.

Daran schloss sich eine Messung der Strömungswiderstände (Impedanzen) an jeder einzelnen applizierten Elektrode an, um eine ausreichende Stromstärke bei der Ableitung elektrischer Aktivität zu erreichen. Bei einem gemessenen Widerstand von größer als 5 k $\Omega$  musste die entsprechende Elektrode revidiert und erneut angebracht werden.





**Abbildung 5: Anordnung der Elektroden**

Links im Bild sind die Elektrodenapplikationspunkte des EOGs (E1, E2), EMGs (Em1, Em2), der Ground-Elektroden (G1, G2) sowie der Mastoiden- (M1, M2) und Ohrläppchen- (EI1, EI2) Referenzen dargestellt. Rechts im Bild sind die EEG-Elektrodenapplikationsstellen (Afz, Fz, Cz, Pz, F3, C3, P3, F4, C4, P4) markiert. Die Afz-Elektrode, zusammen mit den Ohrläppchen-Referenzen, war die für die Stimulation notwendige Elektrode.

## Datenverarbeitung

Nach Abschluss der Applikation und Testung jeder einzelnen Elektrode, wurden diese Elektroden an verschiedene Vorverstärker und Signalfilter angeschlossen. Zum Anschluss der Elektroden stand zum einen eine EEG-Headbox (Electrode Input Box 64 Channels, Brain Products, München, Deutschland) mit fortlaufend nummerierten Steckplätzen, in die alle entsprechenden EEG-Elektroden (1 = F3, 2 = F4, 3 = C3, 4 = C4, 5 = P3, 6 = P4, 7 = Fz, 8 = Cz, 9 = Pz) eingesteckt wurden, zur Verfügung. Zudem erfolgte die Erdung mittels einer GROUND-Elektrode, welche mit dem dafür vorgesehenen Steckplatz verbunden wurde, sowie das Einstecken der beiden retroaurikulären Mastoidreferenzen (M1, M2). Daraufhin musste diese Headbox mit einer weiteren, bipolaren Headbox (ExG AUX Box, Brain Products, München, Deutschland) für die Elektroden des EOGs (1+ = E1 = obere EOG-Elektrode und 1- = E2), des EMGs (2+ = Em1, 2- = Em2) und EKGs (3+ = EKG1, 3- = EKG2) über eine Brücke der auf beiden Headboxen vorhandenen GROUND-Steckplätze verbunden werden und die bipolare Headbox wurde damit zudem geerdet. Beide Headboxen waren an einen entsprechenden Signalverstärker mit Frequenzfilterfunktion (BrainAmp DC und

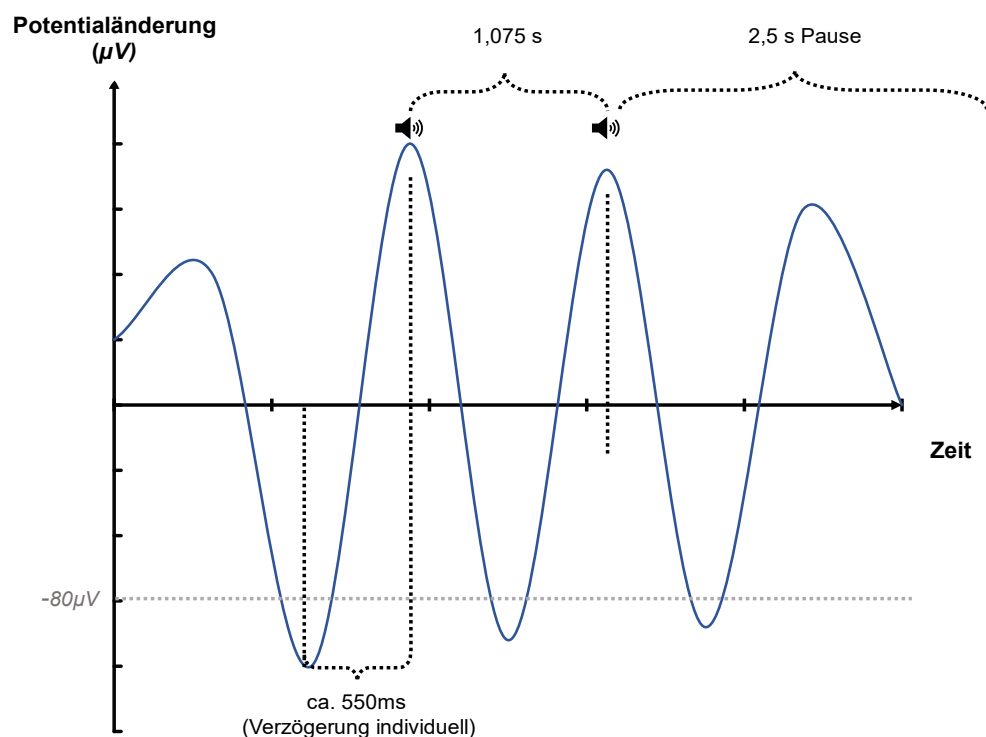
BrainAmp ExG, Brain Products, München, Deutschland) angeschlossen. Die Signale der neun EEG-Elektroden (F3, F4, C3, C4, P3, P4, Fz, Cz, Pz) wurden hierbei mit einer Abnahmerate von 500 Hz aufgezeichnet. Zur Online-Darstellung und Analyse der EEG-, EOG-, EMG-, und EKG-Signale wurden die erfassten Daten an einen Computer gesendet und mithilfe der Software Brain Vision Recorder (Brain Products, München, Deutschland) verarbeitet.

### 2.3.2 Closed-loop-Stimulation

Wie bereits oben aufgezeigt, wurden die für die Stimulation notwendigen Elektroden (Afz-Elektrode und Ohrläppchen-Referenzen - E11/E12) entsprechend ihrer Positionen am Kopf des Probanden angebracht und die Signale über eine separate Headbox des Digitimer D360 (Digitimer Limited, Welwyn Garden City, Hertfordshire, United Kingdom) diesem zugeführt, verstärkt, das Frequenzspektrum zwischen 0,25 Hz und 4 Hz (sog. „slow-oscillations“ = SO) herausgefiltert und im Anschluss an einen Computer weitergeleitet. Die Signale des mit der Afz-Elektrode abgeleiteten EEGs wurden im Folgenden mit dem Programm Spike2 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK), einer Datenerfassungs- und Analysesoftware, erfasst und verarbeitet. Die zusätzliche Zusammenschaltung des Digitimers D360 und der Datenerfassungsschnittstelle CED Power 1401 ermöglichten zum einen eine sehr schnelle Registrierung und Analyse des EEG-Signals, zum anderen aber auch zusätzlich die fast zeitgleiche Applikation eines auditorischen Stimulus, sowie die Dokumentation der Stimulationszeitpunkte mithilfe der Software Brain Vision Recorder.

Das Programm Spike2 ermöglichte mittels eines auf dieses Experiment zugeschnittenen, programmierten Algorithmus die Online-Detektion von SOs ab einer Schwelle von  $< -80 \mu\text{V}$ , welche im weiteren Verlauf alle 0,5 s an die negativste Amplitude ( $< -80 \mu\text{V}$ ) der vorangegangenen 5 s adaptiert wurde. Sobald diese Schwelle unterschritten wurde, startete die auditorische Stimulusapplikation über den In-ear-Kopfhörer MDR-EX50LP in-ear headphones (Sony Deutschland). Um die Reaktion bzw. Antwort des Gehirns auf die akustische Reizapplikation später analysieren zu können, wurden bereits bei

Aufzeichnung des EEG-Signals Markierungspunkte bei jeder Stimulusapplikation in der Experimentalnacht, sowie auch in der Kontrollnacht (hier bei jedem potenziell möglichen Stimulationszeitpunkt ohne Stimuli zu präsentieren) gesetzt. Ein negativer Ausschlag von mind.  $-80 \mu\text{V}$  markierte den Startpunkt einer Periode, welche ihren Endpunkt am darauffolgenden Maximum bzw. der folgenden positiven Amplitude hatte (siehe Abbildung 6). Diese Periode ist die Verzögerung („Delay“) zwischen negativer und positiver Amplitude und wurde bereits in der Probesitzung, in welcher keine Stimulation stattfand, bei allen Probanden gemessen, da es sich um eine inter-individuell variable, aber intra-individuell relativ konstante Zeitdauer handelt. Während der Stimulation erfolgte die Applikation des auditorischen Stimulus nach der bereits vorher bestimmten, individuellen Verzögerung, in der Phase der positiven Halbwelle (d.h. am Maximum der positiven Amplitude). Danach wurde nach einem definierten Intervall von  $1,075 \text{ s}$  ein zweiter Stimulus verabreicht und es folgte eine Pause von  $2,5 \text{ s}$  (siehe Abbildung 6). Dieser Ablauf wird auch als closed-loop-Stimulation bezeichnet.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Stimulationszyklus der closed-loop Stimulation**  
 Sobald eine SO mit einer negativen Amplitude von mind.  $< -80 \mu\text{V}$  detektiert wurde, startete die erste auditorische Stimulusapplikation nach einer in der Probenacht gemessenen, individuellen Verzögerung von im Mittel  $550 \text{ ms}$ . Der zweite Stimulus schloss sich exakt  $1,075 \text{ ms}$  später an, gefolgt von  $2,5 \text{ s}$  Pause bis zum nächsten Zyklus.

Die Dauer der Stimulation betrug bei allen Probanden in der Experimentalsitzung 120 min (siehe Abbildung 4) und wurde hiernach für den Rest der Experimentalnacht gestoppt. In den Kontrollsitzen wurde ein identischer Stimulationsalgorithmus angewendet, jedoch kein hörbarer auditorischer Stimulus appliziert. Bei jeglicher Form von Bewegung, Änderung des Schlafstadiums in S1, sowie bei einem Erwachen bzw. Arousal erfolgte eine sofortige, manuelle Unterbrechung der Stimulation.

Der auditorische Stimulus entsprach dabei einem 1/f-Rauschen (= Rosa Rauschen) mit einer Zeitdauer von 50 ms, einschließlich einem jeweils 5 ms dauernden An- und Abschwellen. Die Lautstärke des Stimulus betrug 50 dB.

### 2.3.3 Immunparameter

#### 2.3.3.1 Blutprobenentnahme und Aufbereitung

In den Experimental- und Kontrollnächten wurden insgesamt sieben Blutprobenentnahmen für die Bestimmung von, im weiteren Verlauf im Detail beschriebenen, Immunparametern durchgeführt. Hierfür wurde dem Probanden in beiden Sitzungen ein intravenöser Katheter gelegt, um eine Störung des Schlafes zu verhindern, wurde dieser mittels eines Schlauchs (2 ml Volumen) durch eine Öffnung in der Wand mit dem angrenzenden Kontrollraum verbunden und an ein Infusionssystem angeschlossen. Die Zeitpunkte der Entnahmen waren bei allen Probanden exakt definiert und begannen mit der ersten Entnahme um 22:45 Uhr (siehe Abbildung 4). Daraufhin folgte die zweite Entnahme unmittelbar vor Beginn der Stimulation und es schlossen sich jeweils nach einer, zwei, drei und vier Stunden weitere Blutentnahmen an. Den Abschluss bildete die letzte Entnahme nach Erwachen des Probanden um ca. 7:00 Uhr.

Zu jedem Zeitpunkt wurde eine Menge von 400 µl Blut entnommen, dieses in durchnummerierte 1,3-ml-EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co. KG,

Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und anschließend ins Labor zur Immunanalyse gebracht.

Vor der Bestimmung der Anzahl der Granulozyten und der NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde ein sogenannter Mastermix mit monoklonalen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene der jeweiligen Populationen erstellt. Dieser enthielt neben allgemeinen Leukozytenoberflächenmarkern die für die Detektion von Granulozyten und natürlichen Killerzellen notwendigen Oberflächenmarker (siehe Kapitel 2.3.3.2).

Nach Erstellung dessen wurden nach jeder Blutprobenentnahme 50 µl Blut und 50 µl Mastermix zur Markierung der jeweiligen Zellpopulationen in ein Röhrchen (Trucount tube, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) gegeben und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur in Verdunkelung inkubiert. Danach folgte die Lyse von Erythrozyten mit 0.9 ml FACS lysing solution (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA), erneutes Inkubieren für 15 min und die Aufbewahrung der Probe unter Kühlung bis zur durchflusszytometrischen Messung.

### 2.3.3.2 Durchflusszytometrische Messung (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die Analyse einzelner Zelle in Bezug auf Größe, Granularität und Expression charakteristischer Moleküle ermöglicht und dadurch eine zelluläre Auftrennung, z.B. einer Blutprobe, und Sortierung von Zellpopulationen möglich macht (Brown and Wittwer, 2000). Sie wird auch als FACS (=Fluorescence Activated Cell Sorting) bezeichnet, was ein eingetragener Markenname von Becton, Dickinson and Company ist. Hierzu wurden, wie bereits beschrieben, die gesuchten Zellen (Granulozyten und NK-Zellen) mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die an populationsspezifische Oberflächenmoleküle, wie das CD- oder HLA- Antigen, binden, markiert. Neben dem allgemeinen Leukozytenmarker CD45 wurden für die Detektion von T- und B-Zellen (nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit) die Oberflächenmoleküle CD3 und CD19 verwendet, wobei CD3 charakteristisch für

T-Zellen und CD19 für B-Zellen ist und auf NK-Zellen nicht vorkommen (Maecker, 2012). Somit erfolgte die Detektion der NK-Zellen annäherungsweise durch die Abwesenheit von CD3 und CD19 im Lymphozyten-Gate, da diese den Großteil der CD3 und CD19 negativen, im Blut zirkulierenden Lymphozyten darstellen und die Subgruppen der ILCs (= Innate Lymphoid Cells) und die dendritischen Zellen nur ca. 1 % der zirkulierenden Leukozyten ausmachen (Bonne-Année et al., 2019, Carvelli et al., 2019, Hayashi et al., 2013). Für die Detektion von Granulozyten und insbesondere der neutrophilen Granulozyten wurde neben CD45 der Marker CD16 verwendet. Nach der Zugabe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (CD45 - AlexaFl700, CD16 - BV605, CD3 - BV510, CD19 - FITC), wurde die Probe im Durchflusszytometer (BD LSRFortessa™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) analysiert.

Ein Durchflusszytometer besteht aus mehreren Komponenten. Wesentliche Bestandteile sind ein Laser, das Fluidik-System, Strahlenkollektoren sowie Detektoren und zur Verarbeitung bzw. Datenaufbereitung ein Computer (Adan et al., 2016).

Um eine Blutprobe in die gewünschten Zellpopulationen aufteilen zu können, ist die Analyse jeder einzelnen Zelle wichtig. Dies funktioniert mittels einer sogenannten hydrodynamischen Fokussierung, ein wesentliches Charakteristikum des eingebauten Fluidik-Systems. Darunter versteht man ein System, welches aus zwei Flüssigkeiten unterschiedlichen Drucks besteht - zum einen eine Pufferlösung und zum anderen die Probe. Die Probenlösung wird unter angepasstem und leicht erhöhtem Druck in die Pufferlösung zentral injiziert und es entsteht eine laminare Strömung mit zentralem Fluss der Probe und beidseits flankiertem Fluss der Pufferlösung (Brown and Wittwer, 2000). Da der Druck der Probenlösung immer höher ist als der der Pufferlösung, entsteht ein Zellfluss mit einzelnen, hintereinander gereihten Zellen (Adan et al., 2016). Auf diese Weise kann jede fluoreszenzmarkierte Zelle einzeln analysiert werden.

Im Anschluss an die hydrodynamische Fokussierung folgt die Passage durch einen Laserstrahl, dessen Lichtstrahl je nach Größe, Form, Oberflächen- und Zellinnenstruktur in unterschiedliche Richtungen abgelenkt wird. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwei Streuungsrichtungen, die für die

Auswertung relevant sind. Das ist zum einen die Streuung in Längsrichtung des Lichtstrahls („Forward scatter“ = FSC) und wird vor allem durch die Größe der Zelle beeinflusst, und zum anderen die Streuung zur Seite („side scatter“ = SSC), die hauptsächlich durch Reflexion bei einer sehr komplexen Binnenstruktur der Zelle, wie durch Granula der Granulozyten, entsteht (Adan et al., 2016).

Sensoren detektieren die gestreuten Signale und leiten diese an einen Computer zur Auswertung der Daten weiter.

Die Fluorochrome bzw. deren Elektronen werden hierbei durch den Laser angeregt, nehmen Energie der Lichtstrahlen auf und gelangen in einen höherenergetischen Zustand. Bei der sofortigen Umkehr dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht eines definierten Wellenlängenspektrums freigesetzt, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Ormerod, 2009). Diese Fluoreszenzsignale passieren im Verlauf verschiedene Filter und ermöglichen bei der Datenanalyse die Auftrennung der in der Probe vorhandenen Zellen in die einzelnen Zellpopulationen (Adan et al., 2016).

## 2.4 Auswertung

### 2.4.1 Polysomnographie und Spektralanalyse

Die Analyse der Polysomnographie erfolgte offline. Dabei erfolgte die Bestimmung der verschiedenen Schlafphasen (Scoring) nach dem von Rechtschaffen und Kales entwickelten Scoring-System (Rechtschaffen et al., 1968). Hierzu wurden die Elektroden C3 und C4, sowie die EMG- und EOG-Elektroden gewählt und jedes Zeitfenster von 30 s Dauer einer Schlafphase (W = wach, S1, S2, S3, S4, REM, MT = Movement Time) zugeordnet. MA (siehe Kapitel 1.1.1) wurden zusätzlich zu einer Schlafphase markiert.

Die spektrale Power wird häufig bei der Analyse des EEG-Signals bestimmt und gibt die Leistungsdichte der einzelnen EEG-Frequenzen wieder. Mit Hilfe dieser Spektralanalyse wurde, unter Verwendung einer schnellen Fourier-Transformation (FFT), die Dichte der langsamen EEG-Frequenzen im SWS und

damit die Menge und Amplitude der SOs bestimmt. Die FFT wandelt hierbei die zeitabhängigen EEG-Signale in einzelne Frequenzbereiche um, die wiederum aufsummiert werden und die spektrale Power darstellen. Dabei wurde ein Hanning-Fenster mit 4.096 Datenpunkten gewählt, was ungefähr einer Zeitperiode von 8,2 s und einer Frequenzauflösung von 0,122 Hz entspricht. Aufeinanderfolgende Fenster überlappten sich jeweils um 50 %. Im Anschluss wurde für alle Powerspektren der einzelnen 8,2 s-Fenster der Mittelwert bestimmt und zur Glättung bzw. Ausschluss höherer Frequenzanteile ein gleitender Mittelwert über jeweils drei Punkte bestimmt. Um inter-individuelle Varianz zu entfernen, wurden die individuellen Powerspektren normalisiert, indem sie durch die individuelle kumulative Power (bis 30 Hz) dividiert wurden.

#### 2.4.2 Akustisch evozierte Potentiale

Um die Reaktion des Gehirns auf die akustische Stimulation zu evaluieren, wurde das ursprünglich zwischen 0,3 Hz und 30 Hz gefilterte EEG-Signal der Cz-Elektrode in der vorliegenden Studie zu den bereits in Kapitel [2.3.2](#) beschriebenen, markierten Zeitpunkten jeweils in ein 4 s dauerndes Fenster eingeteilt, mit einer Prästimulusdauer vor dem ersten auditorischen Stimulus von 1 s und Poststimulusdauer von 3 s. Die relativ zum ersten Stimulus segmentierten Daten wurden dann entsprechend pro Proband und Bedingung gemittelt und zur Visualisierung ein Gruppenschnitt gebildet. Beide Bedingungen konnten in der Folge auf Effekte der Stimulation verglichen werden.

#### 2.4.3 Offline-Detektion von SOs

Der Algorithmus zur Offline-Detektion von SOs basiert auf einem von Mölle entwickelten Prinzip (Möller et al., 2002) und wurde bereits bei anderen Studien erfolgreich angewandt (Ngo et al., 2013b). Die EEG-Signale der Elektroden F3, Fz, F4, C3, Cz, C4, P3, Pz und P4 wurden dabei über einen virtuellen Kanal abgeleitet, mit einem analogen Filter von < 30 Hz versehen und bei 100 Hz digitalisiert. Anschließend wurde, um die SO detektieren zu können, ein



Tiefpassfilter bei 3,5 Hz appliziert. Um eine SO innerhalb dieses Frequenzspektrums auffinden zu können, wurden bei allen Probanden die negativen und positiven Peak-Potentiale der Intervalle bestimmt, die sich zwischen zwei aufeinanderfolgenden positiv-zu-negativ Übergängen befanden und eine Zeitdauer zwischen 0,833 s - 2 s, entsprechend 0,5 Hz bis 1,2 Hz, aufwiesen (siehe Abbildung 6). Die Potentiale der negativen und positiven Peaks wurden anschließend pro Proband über beide Sitzungen gemittelt und nur diejenigen Intervalle als SO gekennzeichnet, deren negativer Peak kleiner bzw. negativer als das 1,25-fache des durchschnittlichen negativen Peaks war und deren Amplitudendifferenz, welche durch Subtraktion des negativen Peak-Potentials von dem des positiven Peaks errechnet wurde, größer als das 1,25-fache der mittleren Amplitudendifferenz war. Die, wie in Abbildung 6 dargestellt, negativen Halbwellen bzw. die negativen Peaks, stellten den Markierungspunkt für eine SO dar.

#### 2.4.4 FACS und Bestimmung der absoluten Zellzahl

Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen von Granulozyten und NK-Zellen erfolgte mittels FACS (siehe Kapitel [2.3.3.2](#)). Insgesamt wurden mindestens 100.000 CD45<sup>+</sup> Events pro Probe gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden sog. Trucount-Tubes (BD Trucount Tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Diese enthalten eine bekannte Anzahl an fluoreszenzmarkierten "Beads" (=Perlen), welche die Berechnung der absoluten Zellzahl der Immunzellen nach folgender Formel erlauben:

$$\frac{\text{Anzahl gemessener Events}}{\text{Anzahl gemessener Beads}} \times \frac{\text{Anzahl Beads im Tc-Tube}}{\text{Testvolumen}} = \text{Anzahl Zellen}$$

Die Anzahl der Events bezieht sich dabei auf die gemessene Anzahl an Granulozyten bzw. NK-Zellen in der Probe. Das Testvolumen bezieht sich auf die Blutmenge in der Gesamtprobe.

#### 2.4.5 Statistische Analyse

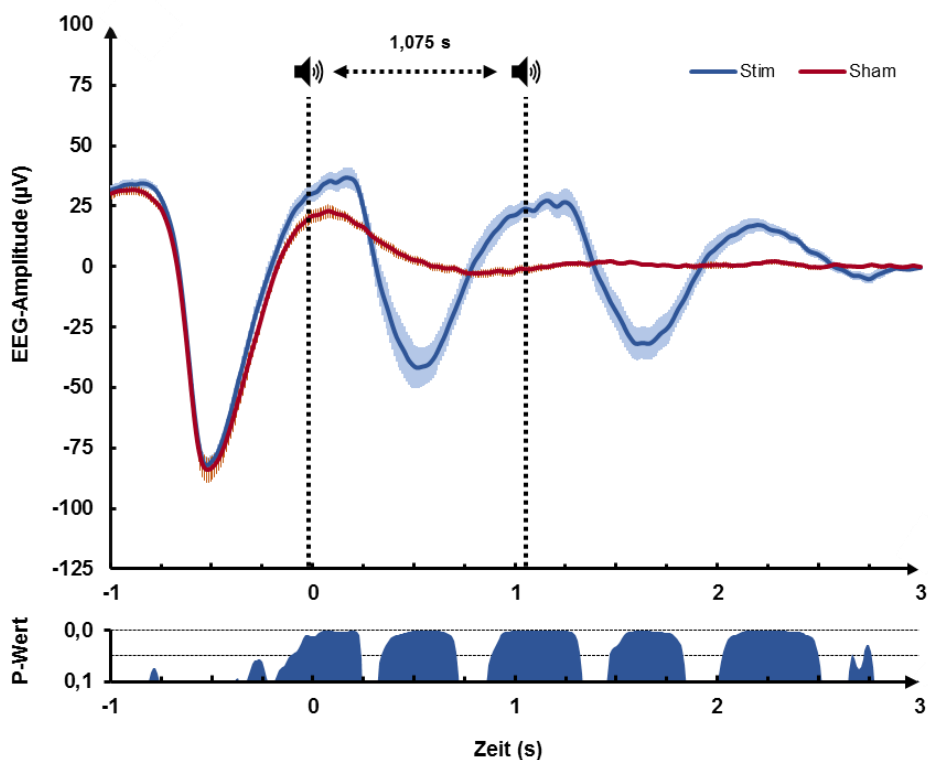
Mit dem Programm IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, North Castle, New York, Vereinigte Staaten) wurden alle statistischen Analysen durchgeführt. Zunächst wurde eine Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) mit den Faktoren „Bedingungen“ (Stimulations- vs. Kontrollbedingung) und „Zeit“ (die unterschiedlichen Messzeitpunkte) gerechnet. Signifikante Ergebnisse wurden anschließend mittels paarweisen Student's T-Tests näher analysiert. Ein P-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert. Zur Ermittlung der Effektgröße wurde das Differenzmaß  $d$  (sog. Cohen's  $d$ ) berechnet. Die Beurteilung und Interpretation dieser statistischen Größen orientiert sich an den Grundsätzen nach Cohen, der bei einem Differenzmaß  $d > 0,2$  von einer geringen, bei  $d > 0,5$  von einer mittleren und bei  $d > 0,8$  von einer großen Differenz beider Bedingungen ausgeht (Cohen, 1988). Als weitere statistische Methode wurde die AUC (= area under the curve) der Zellzahlen über die Zeitspanne von 4 h nach Beginn der jeweiligen Sitzung ermittelt.

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie sollen nun im Detail dargestellt werden. Zu Beginn wird die Auswirkung der akustischen Stimulation auf den Schlaf und damit auf mittels EEG ableitbare Veränderungen elektrischer Potentiale erläutert. Im weiteren Verlauf wird dann auf den Einfluss der Stimulation auf Granulozyten- und NK-Zellzahlen im Blut im Vergleich beider Bedingungen eingegangen.

#### 3.1 Akustisch-evozierte Potentiale (AEP)

Durch die Applikation einer auditorischen Stimulation mit zwei Klicks pro Stimulationszyklus ließen sich im EEG evozierte Potentiale ableiten, wie in Abbildung 7 dargestellt.



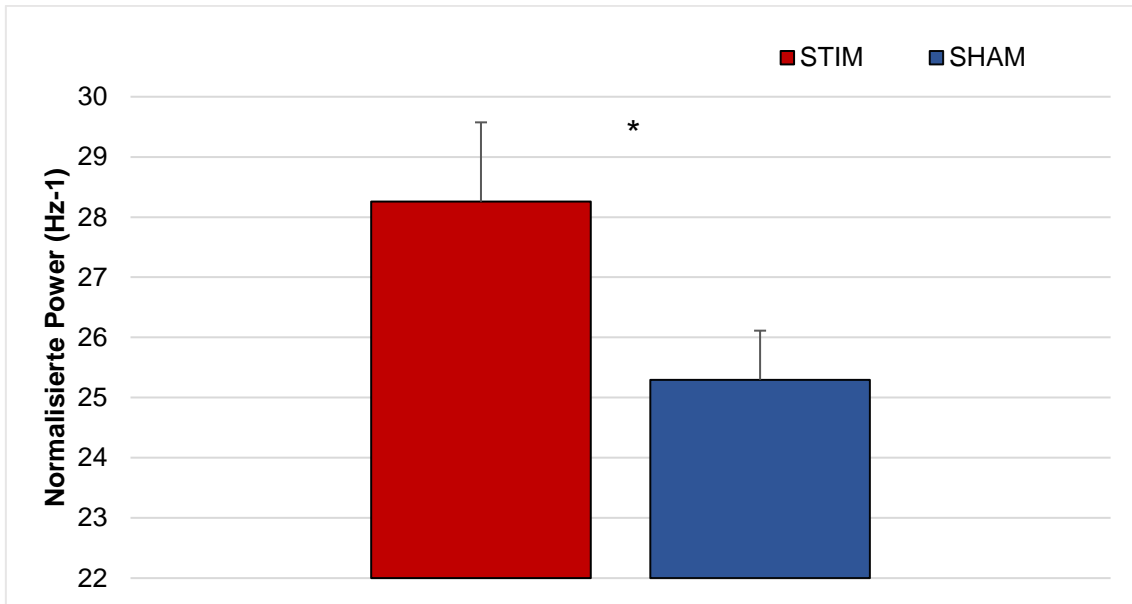
**Abbildung 7: Darstellung evozierter Potentiale in Reaktion auf die auditorische Stimulation**

In der Abbildung dargestellt ist der Amplitudenverlauf bzw. das EEG-Signal der Stimulations- und Kontrollbedingung innerhalb eines Fensters von 4 s. Das EEG-Signal wurde von einer frontal-zentralen Elektrode (Fz) abgeleitet und über alle Probanden gemittelt, weshalb die Darstellung unter Angabe des SEM (= standard error of the mean) erfolgt. Zusätzlich eingezeichnet sind die zwei Stimulationszeitpunkte, an denen ein Klick (50 ms, Rosa-Rauschen, 50 dB SPL) während zweier, konsekutiver positiver Halbwellen appliziert wurde. Der Abstand zwischen den Stimuli betrug dabei 1,075 s. Unterhalb des Amplitudenverlaufs sind die jeweils dazugehörigen P-Werte des abhängigen Student's T-Test veranschaulicht. Stim = Stimulationsbedingung; Sham = Kontrollbedingung

In der Kontrollbedingung ohne auditorische Stimulation zeigten sich keine detektierbaren Änderungen des EEG-Potentials und somit keine akustisch evozierten Potentiale. Die Stimulationsbedingung hingegen war durch einen deutlichen Anstieg von hintereinander auftretenden AEP gekennzeichnet. Dabei entstanden pro Stimulation im Mittel drei aufeinanderfolgende AEP mit stetig reduzierter negativer und positiver Amplitudenhöhe. Die Effekte der auditorischen Stimulation auf Anzahl und Eigenschaften der AEP waren, wie in Abbildung 7 dargestellt, statistisch signifikant und wurden bereits in vorherigen Studien gezeigt (Ngo et al., 2013b).

### 3.2 EEG-Power-Spektrum und SO-Eigenschaften

Zur Spektralanalyse der EEG-Daten im SWS wurden die Signale in beiden Versuchsbedingungen über die Elektrode Fz und ein Zeitfenster von 120 min akquiriert und die mittlere spektrale Power über ein Frequenzspektrum von 0,1 Hz bis 30 Hz bestimmt. Im Frequenzspektrum zwischen 0,8 Hz und 1,1 Hz zeigte sich zwischen den Bedingungen eine statistisch signifikante Erhöhung der normalisierten spektralen Power (STIM  $28,256 \pm 1,318$  SEM; SHAM  $25,297 \pm 0,816$  SEM,  $p = 0,012$ ), wie in Abbildung 8 dargestellt. In diesem Frequenzspektrum lag das Stimulationsintervall mit 1,075 s ( $\sim 0,9$  Hz) zwischen den beiden auditorischen Stimuli pro Stimulationszyklus.



**Abbildung 8: Spektrale Power im SO-Peak-Frequenzspektrum (0,8 – 1,1 Hz)**

In der Abbildung ist die normalisierte spektrale Power des Frequenzspektrums von 0,8 Hz bis 1,1 Hz als Mittelwert  $\pm$  SEM für beide Versuchsbedingungen (Stim = Stimulationsbedingung; Sham = Kontrollbedingung) dargestellt. \*  $p < 0,05$ .

Andere Frequenzbereiche zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen ( $p > 0,179$ ).

Die spezifischen Charakteristika der offline detektierten SOs während der Stimulations- bzw. Kontrollbedingung sind in der untenstehenden Tabelle 3 dargestellt. Die Erhöhung der Amplitude und somit die Differenz zwischen positivem und negativem Scheitelpunkt (Peak) in der Stimulationsbedingung verfehlte knapp statistische Signifikanz. Die Anzahl detektierter SOs zwischen der Stimulations- und Kontrollbedingung unterschieden sich nicht signifikant, was vorherigen Ergebnissen mit der gleichen Methode entspricht (Ngo et al., 2013).

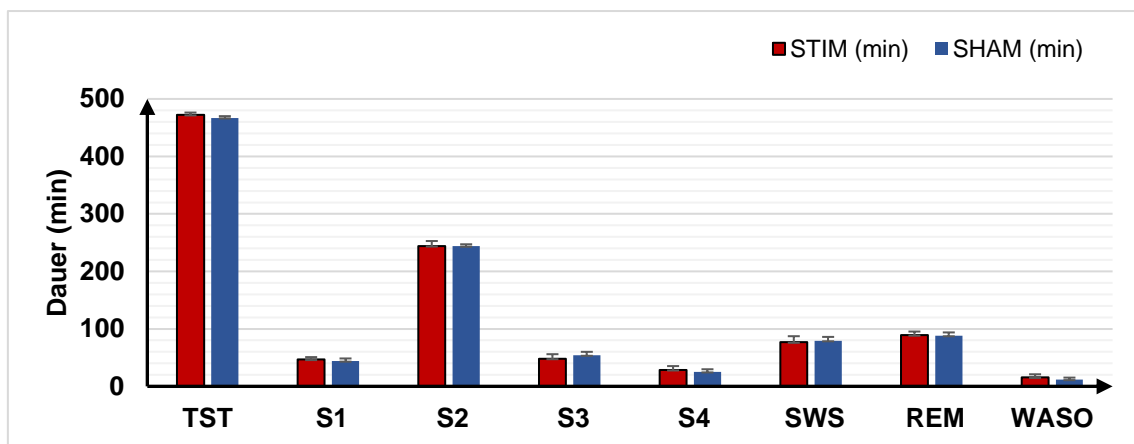
**Tabelle 3: Veränderung der Eigenschaften der SOs durch auditorische Stimulation**

Slow Oscillations	STIM	SEM	SHAM	SEM	P-Wert
<b>Amplitude (<math>\mu</math>V)</b>	161,349	10,412	150,960	6,356	0,061
<b>Anzahl</b>	344,6	57,5	396,9	52,3	0,273

In der Tabelle sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Charakteristika der SOs in Bezug auf Amplitude zwischen negativem und positivem Peak und Anzahl dargestellt. Der P-Wert in der letzten Spalte der Tabelle bezieht sich auf den Vergleich beider Versuchsbedingungen. Stim = Stimulationsbedingung; Sham = Kontrollbedingung

### 3.3 Schlafarchitektur

Die Schlafarchitektur wurde mittels Polysomnographie aufgezeichnet. In Abbildung 9 und Tabelle 4 sind die Ergebnisse getrennt nach Versuchsbedingung ausführlich dargestellt. Die Stimulation konnte durchschnittlich nach 30,5 min  $\pm$  4,9 min (SEM) gestartet werden. Es zeigten sich im Vergleich beider Bedingungen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede in der Dauer der einzelnen Schlafstadien und der gesamten Schlafdauer (TST = total sleep time) (Abbildung 9, Tabelle 4). Insbesondere zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Bedingungen bezüglich der im SWS verbrachten Zeit, was vergleichbar mit früheren Befunden ist (Ngo et al., 2013).



**Abbildung 9: Schlafarchitektur der gesamten Stimulations- und Kontrollnacht**

Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in Bezug auf die absolute Zeit (in min), die in jedem Schlafstadium pro Bedingung verbracht wurde. WASO: Wake After Sleep Onset; TSO: Time to sleep-onset; S1, S2, S3, S4: Schlafstadien S1-S4 (NON-REM); SWS: Slow Wave Sleep (S3 + S4); REM: Rapid Eye Movement Sleep; TST: Total Sleep Time; Stim = Stimulationsbedingung; Sham = Kontrollbedingung

Tabelle 4: Schlafarchitektur in Minuten und Prozent während der Stimulations- und Kontrollnacht

Stadium	STIM	SEM	SHAM	SEM	P-Wert
<b>in min</b>					
<b>TST</b>	472,3	4,0	467,0	3,1	0,209
<b>S1</b>	46,7	4,2	43,9	4,6	0,694
<b>S2</b>	244,2	8,6	243,8	3,3	0,963
<b>S3</b>	48,2	7,8	54,2	5,9	0,148
<b>S4</b>	28,6	6,6	25,2	4,5	0,470
<b>SWS</b>	76,8	10,5	79,4	6,6	0,637
<b>REM</b>	89,1	6,3	88,1	5,8	0,734
<b>WASO</b>	15,5	5,5	11,8	3,4	0,201
Stadium	STIM	SEM	SHAM	SEM	P-Wert
<b>in %</b>					
<b>S1</b>	9,9	0,8	9,4	1	0,739
<b>S2</b>	51,7	1,8	52,2	0,5	0,792
<b>S3</b>	10,2	1,6	11,6	1,2	0,126
<b>S4</b>	6,1	1,4	5,4	1	0,498
<b>SWS</b>	16,2	2,2	17	1,4	0,532
<b>REM</b>	18,8	1,3	18,9	1,3	0,958
<b>WASO</b>	3,3	1,2	2,5	0,7	0,212

Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in Bezug auf die absolute (oben) und prozentuale (unten) Zeit, die in jedem Schlafstadium und Bedingung (Stim = Stimulationsbedingung, Sham = Kontrollbedingung) verbracht wurde. Die P-Werte des abhängigen T-Tests sind in der letzten Spalte dargestellt. WASO: Wake After Sleep Onset; S1, S2, S3, S4: Schlafstadien S1-S4 (NON-REM); SWS: Slow Wave Sleep (S3 + S4); REM: Rapid Eye Movement Sleep; TST: Total Sleep Time; SOL: Sleep-onset latency

Es ließ sich auch bezüglich der prozentualen Anteile der Schlafstadien am Gesamtschlaf keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Bedingungen erkennen.

Die Dauer des SWS war auch innerhalb der Stimulationsperiode (120 min) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Bedingungen, was die Selektivität der Stimulationsmethode nochmals unterstreicht.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Schlafanalyse eine selektive Erhöhung des EEG-Power-Spektrums durch die Stimulation bei unveränderter Schlafarchitektur.

### 3.4 FACS

#### 3.4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen

Zu Beginn der Auswertung stand ein sog. Gating, das Gruppieren der detektierten Events. Die Gesamtzahl der registrierten Events beinhaltete Zelldetritus (= P1 in Abbildung 10, z.B. lysierte Erythrozyten, Thrombozyten), Tc-Beads, Doublets (=miteinander verklebte Zellen) und schlussendlich die Zielgruppe der Singlets (= einzelne Zellen). Diese ließen sich wiederum in verschiedene Untergruppen einteilen, denen als Oberflächenmarker das CD45 gemein ist. Die in dieser Studie gesuchten Untergruppen bzw. Zellpopulationen waren zum einen die CD3- und CD19-negativen NK-Zellen, zum anderen die CD16-positiven Granulozyten.

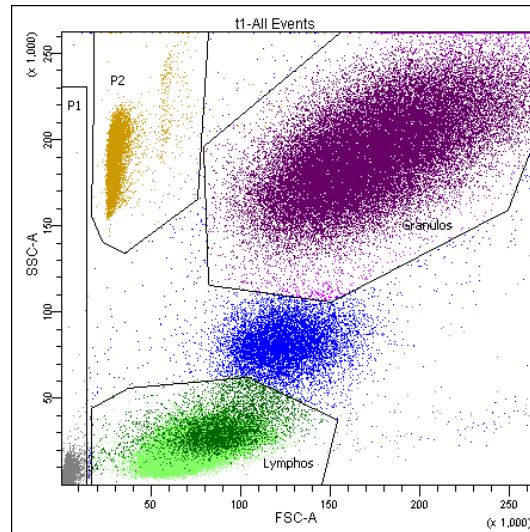
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	124,329	###	100.0
☒ P1	10,465	8.4	8.4
☒ NOT(P1)	113,864	91.6	91.6
☒ P2	12,908	11.3	10.4
☒ NOT(P2)	100,956	88.7	81.2
■ singlets	99,064	98.1	79.7
■ CD45+	99,022	100.0	79.6
■ Lymphos	42,310	42.7	34.0
■ CD3-CD19- (NK cells)	5,072	12.0	4.1
■ Granulos	47,129	47.6	37.9
■ Granulozyten CD16+	44,679	94.8	35.9
■ Tc Beads	12,974	10.4	10.4

**Abbildung 10: Überblick FACS-Gating**

In jeder Probe wurden die einzelnen populationspezifischen Events unter Ausschluss von Events, die auf Zelldetritus und Tc-Beads (= im Tc-Tube vorhandene fluoreszierende Perlen zur exakten Zellzahlbestimmung) zurückzuführen sind, aufgezeichnet. Als Voreinstellung wurden in jeder Probe mind. 100.000 CD45-positive Events registriert und in ihre entsprechenden Subpopulationen gated. Die Abbildung zeigt ein Beispiel der Ergebnisse eines Probanden für einen Messzeitpunkt an. P1: Zelldetritus (z.B. apoptotische Thrombozyten, lysierte Erythrozyten), P2: Tc-Beads, Singlets: einzelne Zellen, CD45+: allgemeiner Oberflächenmarker von Leukozyten, NK cells: Natürliche Killerzellen, die CD3- und CD19-negativ sind, Granulozyten, die CD16-positiv sind, Tc-Beads: fluoreszenzmarkierte Perlen zur Zellzahlbestimmung

Insgesamt wurden je Probe mind. 100.000 CD45-positive Events gemessen, die sich auf die einzelnen Subpopulationen, wie in Abbildung 11 dargestellt, verteilen.

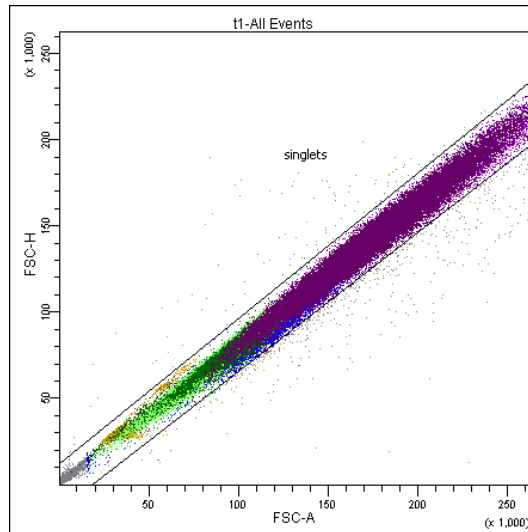




**Abbildung 11: Überblick aller Events der einzelnen Gates im physikalischen FSC-A- / SSC-A-Betrachtungsfenster**

Ermittelt und abgebildet sind alle detektierten Events und deren eingezeichnete Gates in einem rein physikalischen Betrachtungsfenster. Es handelt sich hierbei um eine grobe Vorselektierung der einzelnen Zellpopulationen. FSC-A: Forward Scatter (= Streuung des Laserstrahls in Vorwärtsrichtung, gibt vornehmlich Aufschluss über die Größe der registrierten Zellen), SSC-A: Side Scatter (= Streuung des Laserstrahls in seitlicher Richtung, ermittelt die Granularität bzw. innere Komplexität einer Zelle), Lymphos: Lymphozyten jeglicher Art, beinhaltet die Population der Natürlichen Killerzellen, Granulos: Granulozyten jeglicher Art, P1: Zelldetritus, P2: Tc-Beads

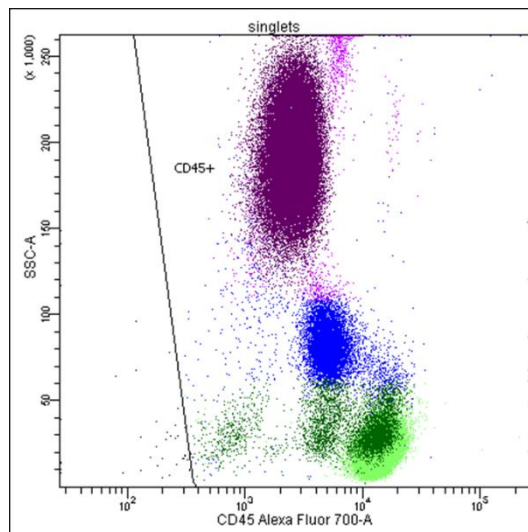
Zunächst erfolgte eine grobe Vorselektion der gesuchten Zellpopulationen anhand Ihrer Größe und Granularität im Forward Scatter (FSC)/ Side Scatter (SCC) Diagramm (Abbildung 11). Anschließend wurden miteinander verbundene bzw. verklebte Zellen (= Doublets) oder Zellkonglomerate in der Analyse ausgeschlossen. Dies wurde mithilfe des FSC-H (H = Hight) / FSC-A (A= area) Fensters ermöglicht. Zellen, die den Laser passieren, generieren ein Signal, das durch die Höhe des Ausschlags (= Hight) und die Area (= Area under the curve) charakterisiert ist. Diese beiden Signal-Eigenschaften korrelieren miteinander und ergeben eine charakteristische Darstellung wie in Abbildung 12. Miteinander verbundene Zellen verlieren die Eigenschaft der Korrelation von FSC-A und FSC-H und liegen außerhalb des eingezeichneten Korrelationsbereichs.



**Abbildung 12: Selektion einzelner Zellen (= Singlets) mittels FSC-A / FSC-H Korrelationseigenschaften**

Durch Korrelation zweier Signalcharakteristika (FSC-A (A = Area under the curve) und FSC-H (H = Height) der Zellen bei Laserpassage können miteinander verbundene Zellen bzw. Zellkonglomerate herausgerechnet werden. Die unterschiedlichen Farben der Events ergeben sich durch die vorausgehende grobe Einteilung der Leukozytenpopulationen im FSC-A/SSC-A-Diagramm. Lila: Granulozyten, Grün: Lymphozyten, Blau: Monozyten, Gelb: Tc-Beads, Grau: Zelldetritus, Blau: nicht gatede Events

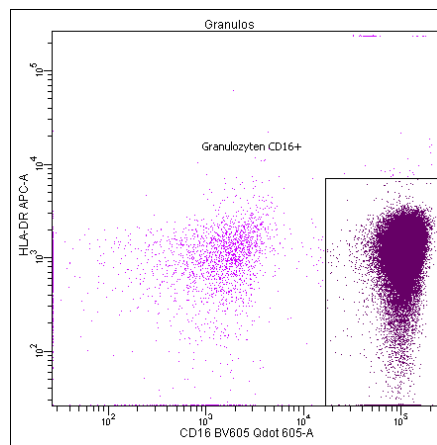
Die innerhalb dieses Korrelationsbereichs befindlichen Singlets wurden anschließend weiter anhand ihrer Expression von CD45 separiert. Das Ergebnis ist der Abbildung 13 zu entnehmen.



**Abbildung 13: Selektion einzelner CD45-positiven Zellen**

Um aus dem gesamten Pool an Events Leukozyten auszuwählen, wurde in einem weiteren Schritt der Leukozytenoberflächenmarker CD45 eingesetzt. Beide gesuchten Zelllinien (Granulozyten und Natürliche Killerzellen) wurden damit erfasst.

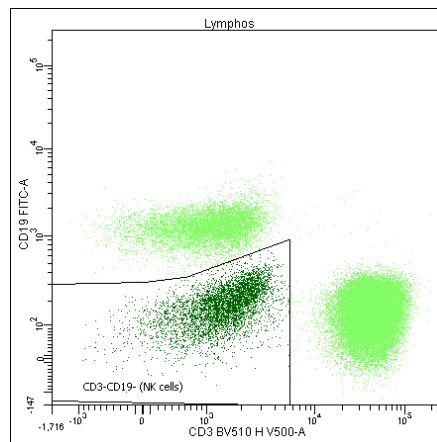
Die im ersten Schritt nur grob gatedeten Granulozyten (Abbildung 11) wurden dann anhand des Oberflächenmarkers CD16 spezifisch erfasst (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Gating CD16-positiver Granulozyten**

Im Dot-Plot-Format ist die Leukozytensubpopulation der CD16 positiven Granulozyten (rechts) dargestellt.

Zur Bestimmung der Anzahl von NK-Zellen wurden diese im CD3 / CD19 Fenster, welches grob die Gesamtlymphozyten umfasste (Abbildung 11), gated und erscheinen in untenstehender Abbildung 15 als CD3- und CD19-negativ (siehe auch Unterkapitel [2.3.3.2](#) zur Begründung des gewählten Gatings, welches noch ein paar wenige andere Zellpopulationen enthält).



**Abbildung 15: Gating CD3- und CD19-negativer NK-Zellen**

In dieser Abbildung ist das Gate der NK-Zellen abgebildet. Diese erscheinen im linken unteren Bildausschnitt als dunkelgrüne Population, die CD3- und CD19-negativ ist.

Die Konzentration (Zellzahl pro  $\mu\text{l}$  Blut) der gatedeten Granulozyten und NK-Zellen wurde anschließend mithilfe der im Kapitel [2.4.4](#) angegebenen Formel berechnet.

### 3.5 Einfluss der Stimulation auf die Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen

#### 3.5.1 Granulozyten

Die Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die Änderung der Anzahl zirkulierender Granulozyten im Verlauf beider Versuchsbedingungen sind der Abbildung 16 und der Tabelle 5 im Detail zu entnehmen.

Im Verlauf der Stimulations- und Kontrollbedingung wurden insgesamt pro Proband und Bedingung sieben Blutentnahmen durchgeführt und, wie bereits beschrieben, die absolute Zellzahl mittels durchflusszytometrischer Messungen bestimmt. Um intra-individuelle Unterschiede der Zellkonzentrationen zwischen den beiden Versuchsbedingungen herauszurechnen, wurden die Werte der einzelnen Blutentnahmezeitpunkte zu den Werten der beiden Baseline-Zeitpunkten (d.h. den beiden Blutentnahmen vor Beginn der Stimulation) referenziert. Hierzu wurden die beiden Baseline-Werte gemittelt und anschließend die nachfolgenden Zeitpunkte jeweils davon subtrahiert.

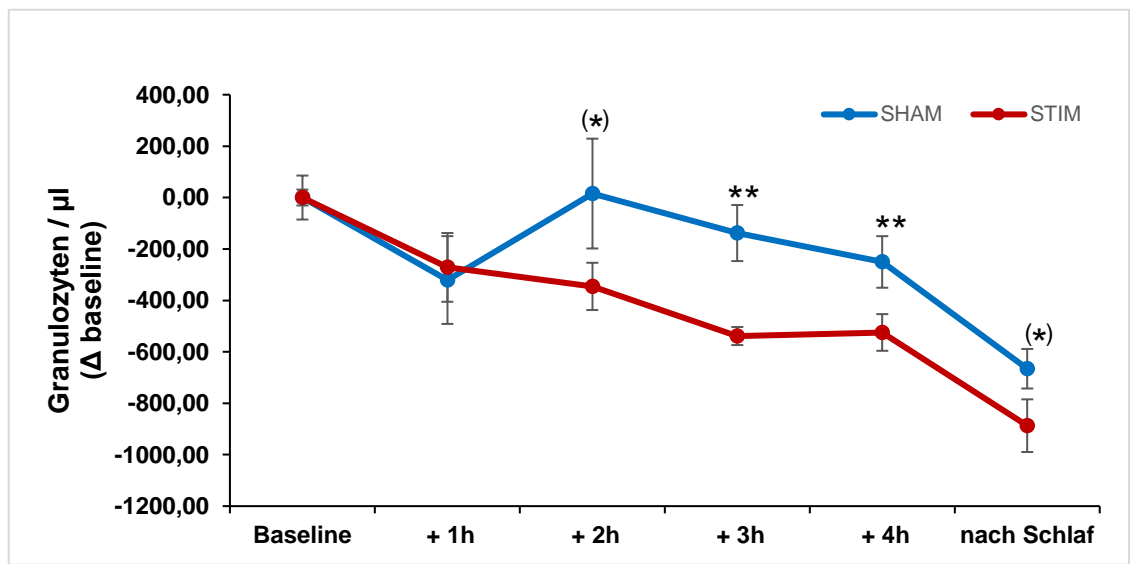


Abbildung 16: Mittlere Veränderung der Anzahl zirkulierender Granulozyten im Vergleich zwischen Stimulations- und Kontrollbedingung

Dargestellt ist der Verlauf der mittleren (+/- SEM) Veränderung in der Anzahl zirkulierender Granulozyten (in Zellen /  $\mu$ l Blut) während beider Versuchsbedingungen von Beginn bis Ende der jeweiligen Versuchsnacht. Die Werte wurden zur Baseline (d.h. den Blutentnahmezeitpunkten vor der experimentellen Schlafmanipulation) referenziert und stellen somit die Veränderung der Zellzahlen über die Zeit in Relation zur Baseline dar. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , (\*)  $p < 0.1$ . Die exakten Werte sind Tabelle 5 zu entnehmen. Rot: Stimulationsbedingung, Blau = SHAM = Kontrollbedingung

Die Ergebnisse der ANOVA zeigten signifikante Haupteffekte der Faktoren „Bedingung“ ( $p = 0,007$ ) und „Zeit“ ( $p = 0,002$ ), jedoch keinen signifikanten Interaktionseffekt. Eine Stunde nach Stimulationsbeginn war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Veränderung der Zellzahlen im Vergleich beider Bedingungen erkennbar ( $p = 0,8507$ ). Im weiteren Verlauf reduzierte die auditorische Stimulation die Zellzahlen mit hoher statistischer Signifikanz zu den Zeitpunkten +3 und +4 h nach Stimulationsbeginn (+3 h:  $p = 0,0035$  und +4 h:  $p = 0,0082$ ). Die Effektgrößen Cohen`s d betragen zu diesen Zeitpunkten  $d_{+3h} = 1,65$  und  $d_{+4h} = 1,05$ . Die Effekte sind demnach als groß einzustufen. Die Reduktionen zu den Zeitpunkten +2 h und nach Schlaf erreichten nur einen statistischen Trend (+2 h:  $p = 0,079$  und nach Schlaf:  $p = 0,063$ ) (Abbildung 16, Tabelle 5). Da die mangelnde statistische Signifikanz des Interaktionseffekts (Bedingung x Zeit) der ANOVA eine nähere statistische Analyse der einzelnen Zeitpunkte formal nicht erlaubt, sind die gerechneten post-hoc t-Tests als exploratorisch zu betrachten.

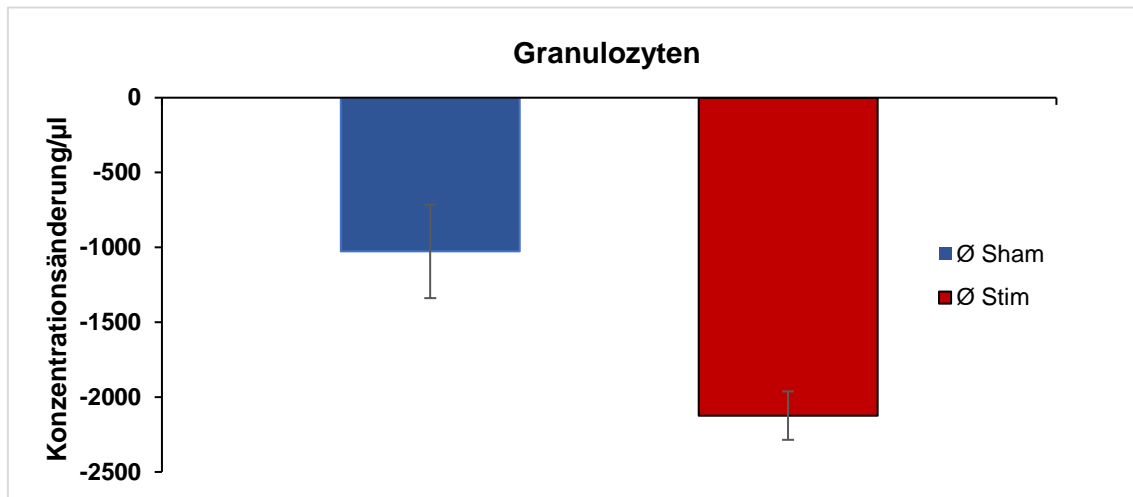
**Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Zellzahlveränderung von zirkulierenden Granulozyten durch auditorische Stimulation**

Zeitpunkt	SHAM	SEM	STIM	SEM	P-Wert
<b>22:45 h</b>	-2,93	30,86	63,25	85,54	0,4252
<b>+ 0 h</b>	2,93	30,86	-63,25	85,54	0,4252
<b>Baseline (<math>\bar{x}</math>)</b>	0,00	30,86	0,00	85,54	
<b>+ 1 h</b>	-320,66	170,66	-271,60	133,66	0,8507
<b>+ 2 h</b>	15,46	213,53	-345,49	91,93	0,0793
<b>+ 3 h</b>	-138,06	109,01	-538,46	35,19	0,0035
<b>+ 4 h</b>	-250,40	100,31	-524,60	71,29	0,0082
<b>7:00 h</b>	-665,65	76,92	-887,11	102,47	0,0630

In der Tabelle sind zum einen die Mittelwerte der absoluten Zellzahldifferenz zur Baseline zu jedem Zeitpunkt einer Bedingung und die Standardfehler (SEM) angegeben, zum anderen die P-Werte, welche anhand abhängiger T-Tests zum Vergleich beider Bedingungen berechnet wurden. Stim = Stimulationsbedingung, Sham = Kontrollbedingung

Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Granulozytenzahländerung über die Zeit die AUC (= Area under the curve) für die Zeitpunkte bis 4 Stunden nach Stimulationsbeginn (was alle Zeitpunkte der Blutentnahme während des Schlafs beinhaltet) bestimmt. In der Kontrollbedingung entsprach dies einer negativen

Zellzahländerung von  $-1026,48$  Granulozyten  $\pm 312,56$  SEM, in der Stimulationsbedingung einer negativen Änderung von  $-2123,71$  Granulozyten  $\pm 161,76$  SEM. Dieser Effekt war statistisch signifikant und kennzeichnete einen deutlichen Unterschied beider Bedingungen ( $p = 0,008$ , Abbildung 17).



**Abbildung 17: Mittlere Konzentrationsänderung der absoluten Granulozytenzahlen über den Zeitraum bis 4 h nach Beginn der Stimulation**

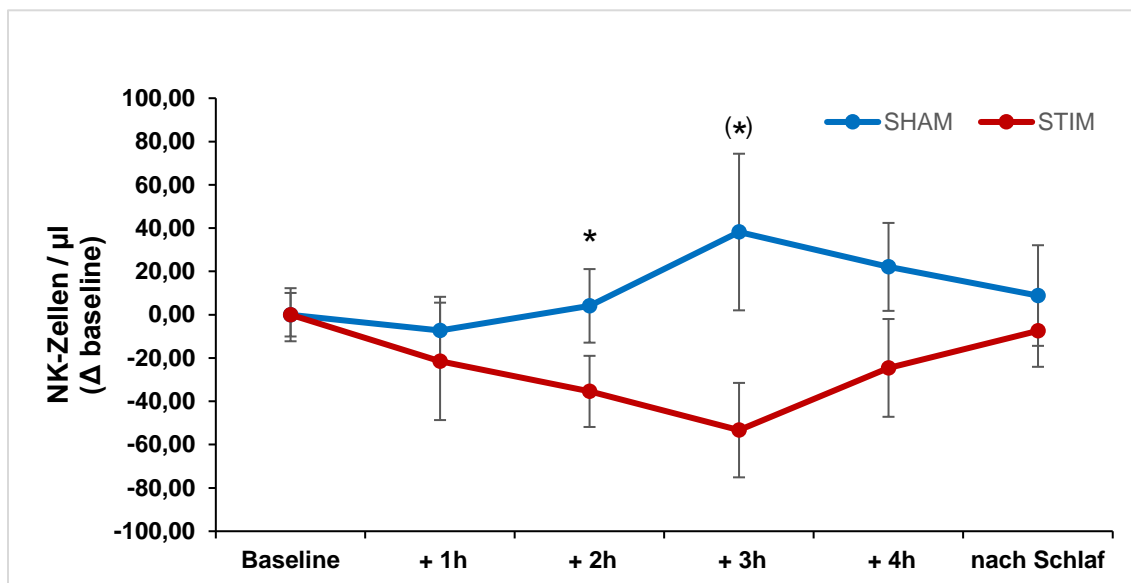
In der Abbildung ist jeweils die mittlere Änderung der Granulozytenzahlen über den Zeitraum von Beginn der Stimulation bis zu 4 h nach Beginn der Stimulation dargestellt. Zudem wird der SEM in jeder Bedingung mit angegeben. \*\* $p < 0.01$ ; Stim = Stimulationsbedingung, Sham = Kontrollbedingung

### 3.5.2 NK-Zellen

Die Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die Konzentrationsänderungen von NK-Zellen während beider Versuchsbedingungen entspricht der der bereits ausgeführten Granulozyten und ist Abbildung 18 und Tabelle 6 im Detail zu entnehmen.

Wie bereits bei den Granulozyten wurde zu Beginn der statistischen Analyse eine ANOVA gerechnet. Diese zeigte beim Faktor „Bedingung“ ein statistisch signifikantes ( $p = 0,019$ ) Ergebnis, wohingegen der Faktor „Zeit“ keine statistische Signifikanz aufwies. Der Interaktionseffekt beider Faktoren war gleichfalls statistisch nicht signifikant.

Die Referenzierung der Zellzahlen zu den Baseline-Zeitpunkten erfolgte analog zu den Granulozyten.



**Abbildung 18: Mittlere Veränderung zirkulierender NK-Zellen im Vergleich zwischen Stimulations- und Kontrollbedingung**

Dargestellt ist der Verlauf der mittleren (+/- SEM) Konzentrationsänderung zirkulierender NK-Zellen (in Zellen /  $\mu$ l Blut) während beider Versuchsbedingungen von Beginn bis Ende der jeweiligen Versuchsnacht. Die Werte wurden zur Baseline referenziert (d.h. den Blutentnahmezeitpunkten vor der experimentellen Schlafmanipulation) und stellen somit die Veränderung der Zellzahlen über die Zeit in Relation zur Baseline dar. \*\*p < 0.01, \*p < 0.05, (\*), p < 0.1. Die exakten Werte sind Tabelle 6 zu entnehmen. Rot: Stimulationsbedingung, Blau = SHAM = Kontrollbedingung

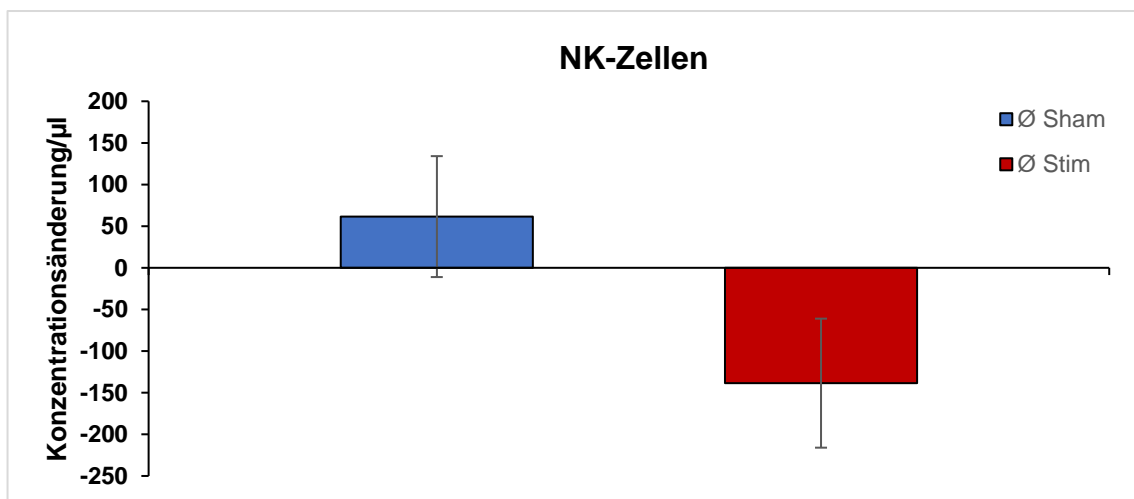
Ähnlich wie bei den Konzentrationsänderungen der Granulozyten war 1 Stunde nach Stimulationsbeginn kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Bedingungen ersichtlich ( $p = 0,604$ ). Zu den darauffolgenden Zeitpunkten der Zellzahlmessung, ausgenommen nach Ende des Schlafes, ist in Abbildung 18 ein Unterschied der Zellzahländerungen erkennbar, wenn auch nicht zu jedem Zeitpunkt statistisch signifikant. Durch die Stimulation kam es bei dieser Leukozytenpopulation zu einer Verminderung der Anzahl zirkulierender NK-Zellen. Diese Veränderung wurde zum Zeitpunkt + 2 h statistisch signifikant ( $p = 0,013$ ). Cohen`s d mit  $d = 0,79$  zeigte hier einen mittelgroßen Effekt. Der Zeitpunkt +3 h erreichte nur einen statistischen Trend ( $p = 0.086$ ). Auch hier sind die gerechneten post-hoc t-Tests aufgrund der mangelnden statistischen Signifikanz des Interaktionseffekts als exploratorisch zu betrachten.

**Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Zellzahlveränderung zirkulierender NK-Zellen durch auditorische Stimulation**

Zeitpunkt	SHAM	SEM	STIM	SEM	P-Wert
22:45 h	-6,39	10,05	4,03	12,26	0,5868
+ h	6,39	10,05	-4,03	12,26	0,5868
Baseline ( $\bar{x}$ )	0,00	10,05	0,00	12,26	
+ 1h	-7,29	15,55	-21,54	27,11	0,6044
+ 2h	4,09	16,99	-35,42	16,43	0,0128
+ 3h	38,19	36,17	-53,30	21,81	0,0858
+ 4h	22,09	20,31	-24,57	22,58	0,1200
7:00h	8,86	23,24	-7,43	16,63	0,3965

In der Tabelle sind zum einen die Mittelwerte der absoluten Zellzahldifferenz zur Baseline zu jedem Zeitpunkt einer Bedingung und die Standardfehler (SEM) angegeben, zum anderen das Signifikanzniveau, welches anhand eines abhängigen, paired T-Test berechnet wurde. Stim = Stimulationsbedingung, Sham = Kontrollbedingung

Analog zu den Granulozyten wurde auch bei der Analyse der NK-Zellen die AUC bestimmt. Im direkten Vergleich beider Versuchsbedingungen zeigte sich hierbei ein statistisch signifikanter Unterschied mit  $p = 0,018$  (SHAM: 61,51 NK-Zellen  $\pm$  72,62 SEM, STIM: -138,54 NK-Zellen  $\pm$  77,47 SEM, Abbildung 19). Es kam folglich auch bei den NK-Zellen zu einer absoluten Reduktion der Zellzahlen im Verlauf.



**Abbildung 19: Mittlere Konzentrationsänderung der absoluten Zellzahlen der NK-Zellen über den Zeitraum bis t4 (= bis 4h nach Beginn der Stimulation)**

In der Abbildung ist jeweils die mittlere Änderung der absoluten Zellzahlen der NK-Zellen über den Zeitraum von Beginn der Stimulation bis zum Zeitpunkt t4 (= 4 h nach Beginn der Stimulation) dargestellt. Zudem wird der SEM in jeder Bedingung mit angegeben. Der Unterschied zwischen beiden Bedingungen war statistisch signifikant ( $p = 0,018$ ); Stim = Stimulationsbedingung, Sham = Kontrollbedingung



## 4 Diskussion

Wie bereits einleitend in Kapitel 1.5 beschrieben, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Auswirkung einer auditorischen Stimulation von SOs im Schlaf auf die Anzahl zirkulierender NK-Zellen und Granulozyten zu bestimmen. Die auditorische closed-loop Methode bietet hierbei die Möglichkeit gezielt und selektiv SOs zu verstärken (Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015). Eine mögliche Auswirkung der Stimulation auf die Migration bestimmter Immunzellpopulationen ermöglicht zum einen ein genaueres Verständnis der Immunregulation im Schlaf, zum anderen stellt dieses Wissen in Zukunft die Grundlage für eine möglicherweise gezielte Intervention, z.B. im Rahmen von Erkrankungen mit Beteiligung des Immunsystems, in Aussicht.

### 4.1 Effekte der closed-loop Stimulation auf den Schlaf

Der Ursprung der SOs befindet sich, wie in Kapitel 1.1.2 und zuerst von Steriade et al. bei Katzen beschrieben, in Neuronen des Kortex, die einen Rhythmus von  $< 1,0$  Hz generieren (Steriade et al., 1993b). Durch Ausschaltung des Thalamus konnte zudem eine Minderbeteiligung des Thalamus bei der Generierung festgestellt werden, wobei eine Beeinflussung des Rhythmus durch thalamokortikale Projektionen möglich war (Steriade et al., 1993a). Die SOs bilden zusammen mit dem Delta-Rhythmus (1,0 Hz – 4,0 Hz) die Basis des SWS (Steriade, 2006, Niethard et al., 2018).

Das Wissen um die Möglichkeit der Einflussnahme auf den SWS, die SWA und SO-Rhythmus besteht bereits seit einigen Jahren und konnte in verschiedenen Studien mit unterschiedlicher Herangehensweise, siehe Kapitel 1.2, erfolgreich umgesetzt werden (Bellesi et al., 2014, Marshall et al., 2006, Massimini et al., 2007, Tononi et al., 2010, Ngo et al., 2013a, Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015). Hierbei stellte sich die auditorische Stimulation auch hinsichtlich der Praktikabilität und einfachen Steuerbarkeit als erfolgsversprechende Methode heraus. Durch externe Einflussnahme auf den Rhythmus dieser SOs via auditorischer closed-loop Stimulation, konnte in der vorliegenden Studie ein

deutlicher und objektiver Effekt auf SOs nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich ein deutlicher Effekt der akustischen Stimulation mit Induktion von zusätzlichen Potentialen nach Detektion einer SO während der Stimulationsbedingung im Vergleich zur Kontrollnacht, entsprechend vorangegangener Studien von Ngo et al. (Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015). Bei diesem Effekt müssen jedoch mehrere Interpretationsmöglichkeiten berücksichtigt werden. Zum einen kann es sich bei den Potentialen um SOs, oder aber um SO-ähnliche Potentiale, wie z.B. den K-Komplexen, die häufig bei akustischer Stimulation auftreten und gleichen Ursprungs wie die SOs sind, bzw. klassischerweise um akustisch-evozierte Potentiale handeln (Ngo et al., 2013b). Jedoch weist Ngo et al. (2013) auf das eher singuläre und nicht rhythmische Vorkommen von K-Komplexen, sowie auf die Eigenschaften der durch die hier verwendete Stimulation induzierter Potentiale hin, welche eher für SOs charakteristisch sind und weniger für einfache akustisch-evozierte Potentiale (Ngo et al., 2013b). Von der Grundannahme einer Induktion von SO-Abfolgen bzw. einem akustisch induzierbaren SO-Rhythmus kann somit ausgegangen werden. Andere Frequenzbereiche, auch im Deltaband (zwischen 1,0 Hz und 4,0 Hz), wurden nicht durch die Stimulation beeinflusst, was die Selektivität der Stimulation unterstreicht. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in der Studie von Ngo et al. beschrieben, in der ein Anstieg der EEG-Power im Frequenzbereich von 0,5 Hz bis 1,0 Hz um 9,0 % (AUC) detektiert wurde, wobei ebenfalls andere Frequenzspektren unverändert blieben (Ngo et al., 2013b). Bei Einsatz einer in der gleichen Studie getesteten Out-of-phase Stimulation, bei der der erste Stimulus direkt nach Detektion einer SO und der nachfolgende Stimulus in der Hyperpolarisationsphase der ausgelösten SO gegeben wurde, konnte gezeigt werden, wie wichtig der richtige Stimulationszeitpunkt (closed-loop) für einen Effekt ist, da in diesem Stimulationsmodus ein signifikanter Abfall der EEG-Power im Spektrum  $< 1,0$  Hz zu verzeichnen war (Ngo et al., 2013b). In einer Folgestudie von Ngo et al. wurde das Stimulationskonzept verändert und sowohl eine closed-loop Stimulation als auch eine Driving-Stimulation (siehe Kapitel [1.2](#)) auch im Hinblick auf die Gedächtniskonsolidierung durchgeführt und miteinander verglichen (Ngo et al., 2015). Die Driving-Stimulation erzeugte ebenso eine

Erhöhung der spektralen Power im SO-Frequenzbereich sowie eine verbesserte Gedächtniskonsolidierung, aber keine signifikanten Unterschiede bzw. Überlegenheit zur closed-loop Stimulation was die Verlängerung von SO-Abfolgen, deren Amplituden, die Gedächtniskonsolidierung oder die induzierte Spindelaktivität betrifft (Ngo et al., 2015). Ein anderes Stimulationsprotokoll, z.B. von Tononi et al. (siehe Kapitel 1.2) mit Stimulationsblöcken von 15-20 Stimulationen pro Block induzierte ebenfalls eine Erhöhung der spektralen Power (Tononi et al., 2010). Die closed-loop-Applikation von Blöcken mit fünf Tönen (50 ms – rosa Rauschen) während eines Mittagschlafes führte in einer von Ong et al. (2016) durchgeführten Studie bei den Probanden ebenso zu einer Erhöhung der SWA sowie zu einer Besserung der Gedächtnisfunktion (Ong et al., 2016). Eine weitere Studie von Ngo et al., in welcher ein fester (0,8 Hz = Stimulus alle 1,25 s) und ein zeitlich variabler Stimulationsalgorithmus (Stimulusbereich zwischen 0,125 und 5 s unter Ausschluss des Bereichs zwischen 0,5 s und 2 s) verglichen wurden (siehe Kapitel 1.2), unterstrich noch einmal die Stimulierbarkeit der SOs. Allerdings gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen fester und zeitlich variabler Stimulation (Ngo et al., 2013a). Zudem wurde in einer Studie von Weigenand et al. (2016) der Versuch einer sogenannten open-loop Stimulation zur Verbesserung der Gedächtniskonsolidierung unternommen. Hier wurden insgesamt drei Klicks verabreicht, wovon der erste zu einem variablen Zeitpunkt der detektierten SO appliziert wurde. Diese Methode führte zwar zu einer Erhöhung der spektralen Power (im SO-, Delta- und SWA-Frequenzspektrum) im NREM-Schlaf, es zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Gedächtniskonsolidierung im Vergleich zur Kontrollbedingung (Weigenand et al., 2016).

Insgesamt lässt sich daraus eine erwiesene Effektivität unterschiedlicher akustischer Stimulationen in Bezug auf die Induktion von SOs folgern, jedoch ließ sich vor allem eine reproduzierbare Wirksamkeit der closed-loop Stimulation mit zwei Klicks nachweisen. Der Versuch eine zusätzliche Steigerung des Effektes mit mehr als zwei Stimuli zu erzielen, erwies sich als nicht erfolgreich und deutet auf eine Limitation bzw. mögliche Gegenregulation bei verstärkter Stimulation hin (Ngo et al., 2015).

Bei genauerer Analyse der SOs resultiert zwar eine Erhöhung der spektralen EEG-Power im SO-Frequenzband, aber die Anzahl der SOs unterscheidet sich nicht signifikant in beiden Versuchsbedingungen während der Stimulationsperiode. Somit führt die Stimulation nicht zu einer Induktion bzw. Generierung von neuen SOs, sondern sorgt vielmehr für eine Aneinanderreihung von einzelnen SO-Zyklen (= „SO-Train“) und Synchronisierung dieser mit dem externen Rhythmus, was auch Ngo et al. zeigen konnten (Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015). In beiden Veröffentlichungen wird zudem eine signifikant vergrößerte Amplitude der SOs beschrieben, die in der vorliegenden Studie, möglicherweise aufgrund der geringeren Probandenzahl, nur einen statistischen Trend aufwies.

Die Schlafarchitektur blieb durch die Stimulation unbeeinflusst. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Stimulations- und Kontrollbedingung in Bezug auf die einzelnen NREM-, SWS- und Wachphasen sowie die Gesamtschlafzeit. Dies bestätigte erneut die Studienlage zur closed-loop Stimulation und ihre rein selektive Änderung des SO-Rhythmus (Ngo et al., 2013b, Ngo et al., 2015).

#### 4.2 Stimulationseffekte auf die Anzahl zirkulierender Granulozyten und NK-Zellen

Insgesamt zeigen die Ergebnisse einen reduzierenden Effekt der Stimulation auf die Anzahl zirkulierender NK-Zellen und Granulozyten (siehe Kapitel [3.5](#)). Bezeichnend ist hierbei der statistisch signifikante Abfall beider Zelllinien (absolute Zellzahlveränderung) über den Zeitraum von vier Stunden nach Stimulationsbeginn. Um mögliche Störfaktoren, wie z.B. zirkadiane zellspezifische Rhythmen als Erklärung für die gefundenen Effekte auszuschließen, wurde das bereits beschriebene Studienkonzept gewählt. Dadurch, dass jeder Proband verblindet zwei (bis auf die Stimulation) identische Experimentalsitzungen durchlief, kann im Vergleich beider Nächte über die Probanden hinweg der isolierte Effekt der Stimulation beurteilt werden. Die

unveränderte Schlafarchitektur zwischen beiden Versuchsbedingungen zeigt zudem den selektiven Effekt der experimentellen Manipulation auf SOs.

Die Kontrolle möglicher zirkadianer Einflussfaktoren ist deshalb äußerst wichtig, da die Leukozytenzahlen starken tageszeitlichen Schwankungen unterliegen (Hastings et al., 2003, Lange et al., 2010, Ella et al., 2016). So konnte z.B. ein tageszeitabhängiger Verlauf der Zellkonzentrationen der zirkulierenden NK-Zellen und Granulozyten im Blut mit einem Abfall beider Zelllinien über Nacht beobachtet werden (Ackermann et al., 2012).

Frühere Studien konnten zeigen, dass neben dieser zirkadianen Rhythmik auch der Schlaf an sich einen direkten Effekt auf verschiedene Immunzellpopulationen hat (Born et al., 1997, Dinges et al., 1994, Dimitrov et al., 2007, Faraut et al., 2012, Wilder-Smith et al., 2013, Ingram et al., 2015).

#### 4.2.1 Effekte auf NK-Zellen

Born et al. (1997) verglichen in einer Gruppe junger gesunder Männer zwei Bedingungen. In einer Bedingung hatten die Probanden einen normalen Tag-Nacht-Rhythmus, während sie in der anderen nachts wachgehalten wurden. Hierbei wurde ein signifikanter supprimierender Effekt des Schlafes auf die nächtliche Anzahl an NK-Zellen festgestellt. Es kam hierbei zu einer Verschiebung des Tagesmaximums und kompensatorischen Erhöhung des Konzentrationsmaximums, ohne messbare Veränderung der über 24 Stunden gemittelten Werte (Born et al., 1997). Dimitrov et al. konnte 2007 zeigen, dass vor allem der Hauptvertreter der NK-Zellen (gekennzeichnet durch eine schwache Expression des Oberflächenmoleküls CD56) durch Nachtschlaf reduziert werden kann, während die immunregulatorische Subpopulation (gekennzeichnet durch eine hohe CD56-Expression) keine Konzentrationsänderung durch Schlaf zeigte (Dimitrov et al., 2007). Bei Faraut et al. (2012) konnte auch ein deutlicher Anstieg der NK-Zellzahlen nach Schlafentzug detektiert werden, was die Datenlage verstärkt, welche einen Abfall der NK-Zellzahlen durch Schlaf unterstützt (Faraut et al., 2012). Eine Studie von Ingram et al. beobachtete bei Radsportlern nach Schlafentzug und folgender

Trainingseinheit auf dem Fahrradergometer einen deutlichen Anstieg der NK-Zellzahlen im Vergleich zu ausgeschlafenen Sportlern. Auch hier konnte die durch Schlaf ausgelöste Senkung der Zellkonzentration beobachtet werden (Ingram et al., 2015). Dieser Effekt kann auch durch Wilder-Smith et al. (2013) bestätigt werden. So stieg hier die Konzentration an NK-Zellen nach partiellem Schlafentzug statistisch signifikant an, was den Effekt des Schlafes auf die Immunzellpopulation unterstreicht (Wilder-Smith et al., 2013). Dinges et al. (1994) konnte auch nach 64 h Schlafentzug bei jungen Erwachsenen eine deutliche Erhöhung der NK-Zellzahl nachweisen (Dinges et al., 1994). Auch hier kann erneut die reduzierende Funktion des Schlafes auf die NK-Zellzahlen bestätigt werden.

Insgesamt zeigten sich vor allem bei den NK-Zellen in der Vergangenheit auch kontroverse Ergebnisse. Während unter anderem die bereits erwähnten Studien einen Abfall der Zellkonzentration durch Schlaf im Vergleich zu Schlafentzug zeigten (Dinges et al., 1994, Born et al., 1997, Dimitrov et al., 2007, Faraut et al., 2012, Wilder-Smith et al., 2013, Ingram et al., 2015), konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht unterstützen.

Zwei Studien registrierten einen Abfall der Zellkonzentration durch Schlafentzug und einen Wiederanstieg durch einen folgenden Erholungsschlaf (Irwin et al., 1996, van Leeuwen et al., 2009). Bei Irwin et al. erfolgte ein partieller Schlafentzug zwischen 22 Uhr und 3 Uhr. Blutentnahmen erfolgten erst am Folgetag, mehrere Stunden nach Ende des Schlafentzugs, um 7 Uhr und 9 Uhr. Der somit detektierte Abfall der Zellkonzentration könnte auch durch eine überschießende Kompensationsantwort erklärt werden und der Schlaf zwischen 3 Uhr und 7 Uhr zu einer überkompensatorischen Senkung der Zellzahlen führen, welche dann am Morgen der Messung detektiert werden konnte. Ein konsekutiver Anstieg während des Erholungsschlafes könnte die Normalisierung der Zellzahlen nach überkompensatorischer Senkung erklären. Bei van Leeuwen et al (2009) erfolgte eine deutlich verlängerte Episode mit fünf Nächten des partiellen Schlafentzuges (4 h). Die Blutentnahmen erfolgten auch jeweils nach Ende einer Experimentalnacht und ein Abfall der NK-Zellzahlen nach Ende des Experiments wurde dokumentiert (van Leeuwen et al., 2009). Born et al.

beschreibt 1997 bereits am Nachmittag und Abend nach einer Nacht mit komplettem Schlafentzug eine niedrigere Konzentration an NK-Zellen im Blut im Vergleich zu ausgeschlafenen Probanden (Born et al., 1997). Als Erklärung führt er eine mögliche Einflussnahme auf den zirkadianen Rhythmus der Zellen an. Auch in der Studie von van Leeuwen et al. (2009) kann dies zur Interpretation herangezogen werden. Möglicherweise kam es aufgrund der langen Dauer des Experimentes und intermittierenden, wenn auch verkürzten Ruhezeiten, zu einer Änderung der Rhythmik und damit zu niedrigeren nachweisbaren NK-Zellzahlen am Ende des Experiments. Eine häufigere Blutentnahmefrequenz hätte in diesem Fall möglicherweise diese Vermutung bestätigen können.

Eine Studie von Heiser et al. aus dem Jahr 2001 beschreibt wiederum ein anderes Ergebnis mit prolongiert erniedrigten NK-Zellzahlen nach einer Nacht der Schlafdeprivation und des Erholungsschlafes (Heiser et al., 2001). Bereits am Nachmittag nach einer Nacht des Erholungsschlafes konnten jedoch ansteigende NK-Zellzahlen dokumentiert werden (Heiser et al., 2001).

Weitere Studien ergaben wiederum keine Veränderung der Zellkonzentration bezogen auf den Vergleich von Schlafentzug zu normalem Nachtschlaf (Ackermann et al., 2012, Irwin et al., 2008). Bei Ackermann et al. (2012) wurde alle drei Stunden eine Blutentnahme während der Experimentalsitzungen durchgeführt. Wie weiter unten diskutiert, konnten deutliche Effekte auf die Granulozyten nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den NK-Zellen. Als Ursache hierfür können Probleme bei der exakten Detektion der Zellpopulation, wie von den Autoren selbst beschrieben, angebracht werden (Ackermann et al., 2012). Irwin et al. (2008) führte eine weitere Schlafdeprivationsstudie zur Analyse von Schlafentzug auf die Immunantwort durch. Hierbei wurde lediglich eine Blutentnahme um 08:00 Uhr morgens durchgeführt und einzelne Leukozytenpopulationen, u.a. NK-Zellen, gemessen. Die Schlafentzugsperiode lag zu diesem Zeitpunkt bereits mehrere Stunden zurück (23 Uhr abends bis 03:00 Uhr morgens) (Irwin et al., 2008). Möglicherweise könnte eine schnelle Gegenregulation mit einer Redistribution als Erklärung für den ausgebliebenen Effekt diskutiert werden.

Insgesamt ist die vorliegende Studie im Einklang mit der Mehrheit der in der Vergangenheit durchgeführten Studien zum Einfluss von Schlaf auf NK-Zellzahlen und erweitert diese durch den Befund, dass SOs eine kausale Rolle bei der Regulation spielen.

#### 4.2.2 Effekte auf Granulozyten

Hinsichtlich der Effekte von Schlaf auf Granulozyten konnte bereits in zahlreichen Studien ein reduzierender Einfluss von Schlaf auf die Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, welche den Großteil der Granulozyten darstellen, gezeigt werden (Kerkhofs et al., 2007, Boudjeltia et al., 2008, Liu et al., 2009, Faraut et al., 2011a, Faraut et al., 2011b, Ruiz et al., 2012, Wilder-Smith et al., 2013, Christoffersson et al., 2014, Lasselín et al., 2015, Heiser et al., 2001). Kerkhofs et al. veröffentlichte 2007 eine Studie, in der postmenopausale Frauen nach einer Eingewöhnungsnacht in den darauffolgenden drei Nächten lediglich eine Schlafperiode von vier Stunden durchliefen. Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten stieg nach der dritten Nacht des partiellen Schlafentzugs an (Kerkhofs et al., 2007). Zu bemerken ist hierbei das von der vorliegenden Studie stark abweichende Probandenkollektiv unter Hormontherapie, weshalb auch mögliche hormonelle Einflussfaktoren berücksichtigt werden sollten (Kerkhofs et al., 2007). Eine direkte Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie ergibt sich daraus deshalb nicht. Im Folgejahr wurde ein fast identisches Studienkonzept mit ähnlichem Ergebnis präsentiert (Boudjeltia et al., 2008). Die Studienteilnehmer waren in diesem Fall junge erwachsene Männer. Auch hier ergab sich der Effekt eines Konzentrationsanstiegs der neutrophilen Granulozyten (Boudjeltia et al., 2008). Vergleichbare Effekte wurden auch in einer Studie von Liu et al. (2009) gefunden, bei der auch wiederum Frauen eingeschlossen wurden (Liu et al., 2009). Auch zwei Studien von Faraut et al. aus dem Jahre 2011 bestätigten den bereits beschriebenen Sachverhalt mit Anstieg der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nach drei Tagen eines partiellen Schlafentzugs mit insgesamt vier Stunden Schlaf pro Nacht (Faraut et al., 2011a, Faraut et al., 2011b). Zu



bemerken ist in diesem Zusammenhang ein sehr schneller Rückgang des Anstiegs nach einer lediglich kurzen Schlafepisode, was die Vermutung einer schnellen Redistribution, wie weiter unten erläutert, unterstreicht (Faraut et al., 2011a, Faraut et al., 2011b). Auch Ruiz et al. kamen 2012 zu dem Ergebnis, dass zwei Nächte des kompletten Schlafentzugs bei jungen gesunden Männern zu einem statistisch signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten führt (Ruiz et al., 2012). Weitere Schlafentzugsstudien an jungen Männern konnten diese Effekte unterstützen (Christoffersson et al., 2014, Lasselín et al., 2015, Heiser et al., 2001). Es existieren jedoch auch Studien mit dem Ergebnis, dass es zu keinem Unterschied der Zellzahlen der Natürlichen Granulozyten nach Schlafentzug kommt (Born et al., 1997, Ricardo et al., 2009, Costa et al., 2010, Chennaoui et al., 2017). Bei Born et al. betrug die Zeitdauer des Schlafentzuges eine Nacht (Born et al., 1997). Bei den anderen Studien handelte es sich jedoch teilweise auch um Studien mit prolongiertem Schlafentzug. Bei Ricardo et al. (2009) erfolgte die Datenerhebung an jungen Athleten nach 30 h des Schlafentzuges ohne signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten (Ricardo et al., 2009). Möglicherweise könnte der zugrundeliegende Fitnesszustand eine Auswirkung auf die Immunantwort nach Schlafentzug haben. So könnte ein trainierter Allgemeinzustand zu einer guten Kompensation eines erhöhten Stressniveaus führen und damit eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten ausbleiben.

Wie bereits beschrieben, konnte jedoch in der Vergangenheit mehrheitlich ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten durch Schlafentzug und umgekehrt ein Abfall durch Schlaf detektiert werden (Kerkhofs et al., 2007, Boudjeltia et al., 2008, Liu et al., 2009, Faraut et al., 2011a, Faraut et al., 2011b, Ruiz et al., 2012, Wilder-Smith et al., 2013, Christoffersson et al., 2014, Lasselín et al., 2015, Heiser et al., 2001). Die vorliegende Studie steht somit im Einklang mit der Mehrheit der in der Vergangenheit erhobenen Studienergebnissen. Die Einflussnahme auf den Schlaf mittels Stimulation der SOs und deren Auswirkung auf die Zahl der zirkulierenden Granulozyten ist damit ein ganz neuer Aspekt, welche bisher nicht bekannt war.

#### 4.2.3 Mögliche Einflüsse der Stimulation auf Regulationsmechanismen

Der durch Schlaf vermittelte Abfall der nächtlichen Zellzahlen könnte möglicherweise auf eine Immigration der Zellen in Immungewebe während der Nacht hindeuten oder ist möglicherweise Ausdruck einer Margination der Zellen in den marginalen Pool (Born et al., 1997). Dieser Vorgang wäre das umgekehrte Prinzip der bereits mehrfach vorbeschriebenen Demargination (Dimitrov et al., 2010, von Vietinghoff and Ley, 2008, Brohee et al., 1990, Summers et al., 2010). Die klinische Relevanz einer Redistribution von Immunzellen wurde bereits in einigen Studien untersucht. So beschreibt von Vietinghoff and Ley (2008) z.B. ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei dauerhaft erhöhten Leukozyten- und Granulozytenzahlen im peripheren Blut (von Vietinghoff and Ley, 2008). Auch Abete et al. (2019) verglich in den Niederlanden in einer großen Kohortenstudie mit über 14.000 Teilnehmern die Mortalität in Bezug auf die Leukozytenzahlen inklusive ihrer Subgruppen. Es konnte ein Zusammenhang zwischen hohen Leukozyten bzw. neutrophilen Granulozytenzahlen und Steigerung der Gesamtmortalität hergestellt werden (Abete et al., 2019). Damit scheint die Redistribution der Zellen im Schlaf aus dem zirkulierenden Blut mit einem relevanten mortalitäts- und entzündungshemmenden Effekt zusammenzuhängen.

Bei der genauen Betrachtung der Regulationsmechanismen von neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen kommen hierbei zahlreiche Substanzen als Mediatoren des Effekts von Schlaf bzw. der SOs in Frage.

Um den Einfluss von Schlaf auf Leukozytenpopulationen mittels Mediatoren verstehen zu können, müssen vor allem die vielfältigen Interaktionswege berücksichtigt werden. Es existieren z.B. zahlreiche Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter, Neuropeptide und andere regulierende körpereigene Substanzen auf Immunzellen (Besedovsky and del Rey, 1996, Bryant et al., 2004). Diese Rezeptoren finden sich jedoch nicht nur auf Immunzellen, sondern werden zudem auch auf Neuronen und Gliazellen exprimiert (Besedovsky et al., 2012). Eine gegenseitige Beeinflussung der Systeme ist weitreichend bekannt (Capuron and Miller, 2011, Dickstein et al., 1999, Bryant et al., 2004). Zudem

können Immunprodukte die Blut-Hirn-Schranke überwinden und mit Zellen auf beiden Seiten interagieren und Informationen austauschen (Ron-Harel et al., 2011, Schwartz and Kipnis, 2011). Des Weiteren werden sowohl primäre (Thymus und Knochenmark), als auch sekundäre (z.B. Lymphknoten, Milz, MALT) immunologische Organe sympathisch innerviert, was primär zu einer Aktivierung der angeborenen Immunabwehr führt (Nance and Sanders, 2007). Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie neutrophile Granulozyten und NK-Zellen, können somit über eine Vielzahl an Steuermechanismen beeinflusst werden.

Als Erklärung für die Konzentrationsänderungen der jeweiligen Zellpopulationen kommen somit eine Vielzahl an Mediatoren in Frage. Während des Nachtschlafes wird sowohl die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse als auch die Sympatikusaktivität des autonomen Nervensystems reduziert und es konnte in mehreren Studien insgesamt ein, wenn auch geringer, Abfall der Stresshormone Cortisol, Adrenalin und Noradrenalin gezeigt werden (Besedovsky et al., 2012, Born and Fehm, 2000, Lange et al., 2010, Irwin et al., 1999), Born et al., 1997). Insbesondere durch die Wahl des Stimulationsstartzeitpunktes zu Beginn der ersten SWS-Phase und im weiteren Verlauf von 120 min, fällt die Stimulationsperiode in eine Phase der intensiven Hormonregulation. So ist vor allem die erste SWS-Phase eine Zeit, in der die Konzentration der Hormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol abfällt und die von GH und Prolaktin zunimmt (Haus, 2007, Born and Fehm, 1998, Prinz et al., 1979, Spiegel et al., 1994, Bierwolf et al., 1997, Holl et al., 1991). Insbesondere bezüglich des Cortisols gibt es in der Literatur jedoch auch kontroverse Ergebnisse. Beispielsweise zeigte eine Studie von Heiser et al. nach einer Nacht Schlafentzug keine Veränderung in der Cortisolkonzentration (Heiser et al., 2000). Der Grund für diskrepante Ergebnisse könnte darin liegen, dass die Blutentnahmefrequenz häufig zu gering war und somit die häufig nur geringen Reduktionen nicht detektiert wurden. Ganz besonders in Bezug auf die Phase des SWS zeigte sich zu Beginn des Nachtschlafes und zum Zeitpunkt der ersten SWS-Phase eine verstärkte Hormonregulation und es erfolgte in zahlreichen Studien sowohl die Inhibition der Cortisol-, Adrenalin- und Noradrenalinsekretion

mit reduzierten Konzentrationen, als auch eine gesteigerte Sekretion der Hormone Prolaktin und Wachstumshormon (engl. growth hormone, GH) (Haus, 2007, Born and Fehm, 1998, Prinz et al., 1979, Spiegel et al., 1994, Bierwolf et al., 1997, Holl et al., 1991, Besedovsky et al., 2017). Während Prolaktin und GH eine proinflammatorische Funktion besitzen bzw. ein proinflammatorisches Milieu im Nachtschlaf kreieren, sorgen Cortisol und die Katecholamine eher für ein antiinflammatorisches Milieu während des Tages (Besedovsky et al., 2012).

Sowohl die Anzahl zirkulierender Granulozyten als auch die von NK-Zellen zeigen ein Maximum am Tag. Beide Zellpopulationen besitzen teilweise zahlreiche Adrenorezeptoren an ihrer Oberfläche und werden hierdurch in ihrem Verhalten beeinflusst (Scanzano and Cosentino, 2015). Eine Regulation bzw. Steuerung der Konzentration der Zellen mit einem Tagesmaximum u.a. durch Katecholamine und Cortisol wird postuliert. So fallen, wie bereits erwähnt, die Katecholamin- und Cortisolkonzentrationen im Nachtschlaf ab. Analog zum Verlauf der Katecholaminkonzentration, sinken die Konzentrationen der Granulozyten und NK-Zellen nach einem Konzentrationspeak am späten Nachmittag bzw. frühen Abend über die Nacht hin ab (Ackermann et al., 2012, Dimitrov et al., 2007). Bei Dimitrov et al. konnte ein durch Nachtschlaf ausgelöster, deutlicher Abfall der NoradrenalinKonzentration und ein Anstieg der Prolaktin- und GH-Konzentration verzeichnet werden. Die NK-Zellzahl wies eine positive Korrelation mit der Konzentration von Noradrenalin und eine negative Korrelation mit der von Prolaktin auf (Dimitrov et al., 2007). Daraus ergibt sich eine mögliche Steuerbarkeit der Granulozyten- und NK-Zellkonzentrationen u.a. durch Katecholamine. Hinweise für eine katecholamin- bzw. cortisolabhängige Beeinflussung entsprechender Populationskonzentrationen lassen sich in zahlreichen Studien finden. So konnte beispielsweise nach Infusion mit physiologischen AdrenalinKonzentrationen eine schnelle Konzentrationserhöhung der NK-Zellen durch Demargination aus dem marginalen Leukozytenpool erreicht werden (Dimitrov et al., 2010). Die Demargination wird hierbei hauptsächlich über die Blockade des CX3CR1-Rezeptors durch Adrenalin verursacht (Lange et al., 2010). Auch Bigler et al. konnte eine stressinduzierte signifikante Erhöhung der NK-Zellen (CD 56 dim)

durch eine erhöhte Konzentrationen an Adrenalin und Cortisol erreichen, wobei Adrenalin als Hauptfaktor für die Konzentrationsänderung der Zellzahl interpretiert wurde (Bigler et al., 2015). Granulozyten können ebenso über Katecholamine aus dem marginalen Leukozytenpool mobilisiert werden (von Vietinghoff and Ley, 2008, Brohee et al., 1990). Einen ähnlichen Einfluss auf die Granulozytenkonzentration haben auch applizierte Glukokortikoide und damit auch Cortisol, welche eine Granulozytose zur Folge haben, die zu zwei Drittel durch Demargination und zu ca. 10 % durch Freisetzung aus dem Knochenmark zustande kommt (Nakagawa et al., 1998).

Wie oben erwähnt, werden neben Cortisol und Katecholaminen weitere Hormone durch Schlaf reguliert. Insbesondere GH und Prolaktin sind mit dem Auftreten von SWS assoziiert (Gronfier et al., 1996; Spiegel et al., 1995) und kommen daher grundsätzlich als Vermittler der Effekte der SWS-Verstärkung auf die Immunzellen in Frage. Für GH konnte in der Vergangenheit in der Tat ein Effekt auf die Zellzahlkonzentration von neutrophilen Granulozyten festgestellt werden (Sohmiya et al., 2005). Allerdings führte eine Applikation von rekombinantem GH, über G-CSF als Vermittler, zu einer Erhöhung der Zellzahlen im Blut (Sohmiya et al., 2005), was somit nicht als Erklärung für die in der vorliegenden Studie beobachtete Reduktion der Granulozytenzahlen nach SWS-Verstärkung dienen kann. Literatur bzgl. der direkten Einflussnahme von GH auf NK-Zellzahlen lassen sich zum aktuellen Zeitpunkt nicht finden. Ob zusätzlich ein Einfluss von weiteren schlafabhängigen Hormonen, wie Prolaktin, auf die Zellzahlen der NK-Zellen oder neutrophile Granulozyten besteht, ist ebenfalls nicht geklärt. (Sohmiya et al., 2005). Insgesamt spielen somit bei der Interpretation der vorliegenden Studie unterschiedliche Hormone und möglicherweise noch zahlreiche weitere Mediatoren eine entscheidende Rolle bei der Regulation von NK-Zellen und Granulozyten, wobei insbesondere reduzierte Konzentrationen von Katecholaminen und Cortisol im SWS als mögliche Ursache der Zellzahlreduktionen in Frage kommen.

#### 4.2.4 Ausblick

Interessant wäre in zukünftigen Studien eine zeitgleiche Bestimmung zahlreicher laborchemischer Mediatorenkonzentrationen, um konkrete mediatorvermittelte Effekte nachweisen zu können. So bleibt aktuell zwar die Feststellung der durch die Stimulation induzierten Effekte, jedoch kann der genaue Weg von Stimulation zum Effekt aktuell nur postuliert werden und bedarf weiterer Studien.

Wichtig wäre auch eine weitere Differenzierung der Wirkung auf die einzelnen Subpopulationen der NK-Zellen und zudem eine Analyse der NK-Zell- und Granulozyten-Aktivität.

Die aktuelle Studie berücksichtigte in ihrem Design junge, gesunde Männer. Möglicherweise ließen sich stärkere Effekte in anderen Probandenkollektiven, z.B. bei Patienten mit Depression oder älteren Menschen, erreichen, deren Schlaf verändert ist.

So zeigte sich in der Vergangenheit bei Patienten mit Depression eine deutliche Veränderung der Schlafarchitektur mit Schlafunterbrechungen (Nutt et al., 2008). Im Vergleich zu Gesunden hatten diese eine deutlich reduzierte SWA und eine verminderte SWS-Dauer (Nutt et al., 2008). Wie sich die genaue Zellzahlkonzentration bei den NK-Zellen durch eine Depression verändert, wird kontrovers diskutiert. So weisen laut Seide et al. Patienten mit Depression eine erhöhte Konzentration an NK-Zellen auf (Seide et al., 1996). Konträr hierzu beschreibt jedoch Evans et al. einen Abfall der Zellzahlen und Aktivität bei depressiven Patienten, wobei dieser Effekt lediglich bei Männern und nicht bei Frauen nachgewiesen werden konnte (Evans et al., 1992). Bei den neutrophilen Granulozyten hingegen zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellzahlen bei depressiven Patienten im Vergleich zu Gesunden, was einen proinflammatorischen Status im Rahmen der Depression unterstreicht (Demir et al., 2015). Als Grund hierfür werden erhöhte Konzentrationen an Interleukin-1 und -6, sowie des Tumornekrosefaktors-Alpha angegeben. Dass Schlafentzug in der Mehrheit der Studien zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten führt, wurde bereits ausführlich diskutiert (Kerkhofs et al., 2007, Boudjeltia et al., 2008, Liu et al., 2009, Faraut et al., 2011a, Faraut et al., 2011b, Ruiz et al., 2012, Wilder-

Smith et al., 2013, Christoffersson et al., 2014, Lasselin et al., 2015). So könnte auch bei depressiven Patienten durch zumindest partiellen Schlafentzug, im Rahmen rezidivierender Schlafunterbrechungen, eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten ausgelöst werden. Durch eine gezielte, Stimulation des bei depressiven Patienten veränderten SWS mit reduzierter SWA könnte möglicherweise ein reduzierender Effekt auf die erhöhten Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten erreicht werden. Eine Reduktion des proinflammatorischen Milieus und der damit assoziierten Morbidität durch Normalisierung der neutrophilen Granulozytenzahlen könnte eine positive Folge sein.

Als Zielgruppe für weitere Studien könnten auch ältere Menschen in Frage kommen. Gerade bei älteren Menschen sind Durchschlafstörungen, und damit eine veränderte Schlafarchitektur, ein reduzierter Anteil des SWS und frühes Erwachen häufig charakteristisch (Suzuki et al., 2017). Suzuki et al. führt als Grund eine Veränderung der zirkadianen Signalgebung mit in der Folge auftretender reduzierter Körpertemperatur und einer Veränderung des Schlafrhythmus an (Suzuki et al., 2017). Van Someren et al. bestätigt vor allem in diesem Zusammenhang einen im Alter auftretenden, reduzierten Input des Nucleus subpretectalis, dem zentralen Taktgeber im Gehirn des Menschen, was in der Folge zu den bereits beschriebenen Änderungen führt (Van Someren, 2000). Gerade auch bei älteren Menschen zeigten vergangene Studien zur Population der NK-Zellen verschiedene Veränderungen. So beschreibt Lutz et al. einen Anstieg der NK-Zellen mit zunehmendem Alter (Lutz et al., 2005). Zhang et al. konnte, bei relativ geringer Probandenzahl zwar im Gegensatz hierzu keinen Anstieg der absoluten Zellzahl nachweisen, wies aber einen Rückgang der Reproduktionsrate auf 50% mit einem erhöhten Anteil langlebiger NK-Zellen nach (Zhang et al., 2007). Insgesamt scheinen die aktuell vorliegenden Daten jedoch einen Anstieg der absoluten Zellkonzentration von NK-Zellen im Alter im Vergleich zu jüngeren Menschen zu bestätigen (Le Garff-Tavernier et al., 2010). Interessant zu untersuchen wäre hierbei die genaue Ursache der erhöhten Konzentration und ob diese mit dem gestörten Nachtschlaf in Verbindung gebracht werden kann. Dann wäre auch hier, ähnlich wie bei depressiven

Patienten, durch die Stimulation im Tiefschlaf eine Senkung der Zellzahlen denkbar. Insgesamt ist jedoch zu betonen, dass mögliche klinische Anwendungen der auditorischen Stimulation noch rein spekulativ sind und weiterführende Studien hier essenziell sind.



## 5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer auditorischen closed-loop Stimulation von langsamen EEG-Oszillationen auf zirkulierende NK-Zellen und Granulozyten untersucht. Die Methodik der auditorischen Stimulation war bereits mehrfach in Studien mit unterschiedlichen Endpunkten untersucht und evaluiert worden. Aufgrund der einfachen Reproduzierbarkeit und Spezifität der Effekte, stellt diese Stimulationsmethode ein neues, vielversprechendes Modul zur Erforschung der Rolle von SOs dar. Basierend auf dem bekannten Einfluss von Schlaf auf die Anzahl zirkulierender Immunzellen stellte sich vor der Konzeptionierung der Arbeit die Frage, ob SOs bei diesem Schlafeffekt eine kausale Rolle spielen. Hierbei wurde das Augenmerk auf NK-Zellen und Granulozyten gelegt, welche grundlegende Bestandteile der angeborenen Immunabwehr darstellen. In der vorliegenden Studie konnte sowohl eine erneute Wirksamkeit und Spezifität der Stimulationsmethode bezüglich einer Verstärkung von SOs als auch eine stimulierbare Veränderung der Anzahl zirkulierender NK-Zellen und Granulozyten nachgewiesen werden. So zeigte sich eine statistisch signifikante Erniedrigung der Zellzahlen in beiden Zellpopulationen der angeborenen Immunabwehr im Schlaf nach applizierter Stimulation. Diese Ergebnisse zeigen erstmals auf, dass SOs kausal an der Regulation dieser Immunzellen beteiligt sind und erweitern somit das Wissen über die Rolle von Schlaf (und insbesondere von SWS, welches durch das Auftreten von SOs charakterisiert ist) für das Immunsystem. Als Vermittler der Effekte kommen zahlreiche Mediatoren, hierunter wichtige Hormone wie z.B. Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol in Frage. Vor allem die erwähnten Mediatoren wurden bereits intensiv untersucht und zeigten in der Vergangenheit eine schlafbedingte Beeinflussung und können somit als Erklärung für die beobachteten Veränderungen in Betracht gezogen werden. Weiterführende Studien mit z.B. höherer Probandenzahl und verändertem Probandenkollektiv (z.B. ältere Menschen) wären interessant. Insbesondere könnten auch Studien zu Erkrankungen mit Beteiligung des Immunsystems durchgeführt werden, welche

die nachgewiesene Wirksamkeit der Stimulation aufgreifen und möglicherweise zur Entwicklung von neuen Behandlungskonzepten führen könnten.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypnogramm einer prototypischen Nacht (a) und einer tatsächlichen Versuchsnacht (b) in Stunden nach Start der Aufzeichnung .....	5
Abbildung 2: Darstellung der EEG-Elektroden-Positionen entsprechend dem internationalen 10-20-System.....	8
Abbildung 3: Immunabwehr .....	13
Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer Experimentalsitzung.....	24
Abbildung 5: Anordnung der Elektroden.....	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Stimulationszyklus der closed-loop Stimulation .....	29
Abbildung 7: Darstellung evozierter Potentiale in Reaktion auf die auditorische Stimulation .....	37
Abbildung 8: Spektrale Power im SO-Peak-Frequenzspektrum (0,8 – 1,1 Hz) .....	39
Abbildung 9: Schlafarchitektur der gesamten Stimulations- und Kontrollnacht.....	40
Abbildung 10: Überblick FACS-Gating.....	42
Abbildung 11: Überblick aller Events der einzelnen Gates im physikalischen FSC-A- / SSC-A-Betrachtungsfenster .....	43
Abbildung 12: Selektion einzelner Zellen (= Singlets) mittels FSC-A / FSC-H Korrelationseigenschaften .....	44
Abbildung 13: Selektion einzelner CD45-positiven Zellen .....	44
Abbildung 14: Gating CD16-positiver Granulozyten.....	45
Abbildung 15: Gating CD3- und CD19-negativer NK-Zellen.....	45
Abbildung 16: Mittlere Veränderung der Anzahl zirkulierender Granulozyten im Vergleich zwischen Stimulations- und Kontrollbedingung.....	46
Abbildung 17: Mittlere Konzentrationsänderung der absoluten Granulozytenzahlen über den Zeitraum bis 4 h nach Beginn der Stimulation.....	48
Abbildung 18: Mittlere Veränderung zirkulierender NK-Zellen im Vergleich zwischen Stimulations- und Kontrollbedingung .....	49
Abbildung 19: Mittlere Konzentrationsänderung der absoluten Zellzahlen der NK-Zellen über den Zeitraum bis t4 (= bis 4h nach Beginn der Stimulation).....	50

## 7 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	<b>Darstellung der Definitionskriterien der einzelnen Wach- und Schlafstadien .....</b>	<b>4</b>
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Darstellung der EEG-Rhythmen mit dem dazugehörigen Frequenzbereich .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Veränderung der Eigenschaften der SOs durch auditorische Stimulation .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Schlafarchitektur in Minuten und Prozent während der Stimulations- und Kontrollnacht.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Tabellarische Darstellung der Zellzahlveränderung von zirkulierenden Granulozyten durch auditorische Stimulation.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 6:</b>	<b>Tabellarische Darstellung der Zellzahlveränderung zirkulierender NK-Zellen durch auditorische Stimulation.....</b>	<b>50</b>

## 8 Literaturverzeichnis

- ABETE, I., LU, Y., LASSALE, C., VERSCHUREN, M., VAN DER SCHOUW, Y. & BUENO-DE-MESQUITA, B. 2019. White cell counts in relation to mortality in a general population of cohort study in the Netherlands: a mediating effect or not? *BMJ Open*, 9, e030949.
- ACKERMANN, K., REVELL, V. L., LAO, O., ROMBOUTS, E. J., SKENE, D. J. & KAYSER, M. 2012. Diurnal Rhythms in Blood Cell Populations and the Effect of Acute Sleep Deprivation in Healthy Young Men. *Sleep*, 35, 933-940.
- ADAN, A., ALIZADA, G., KIRAZ, Y., BARAN, Y. & NALBANT, A. 2016. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 8551, 1-14.
- ARJONA, A., SILVER, A. C., WALKER, W. E. & FIKRIG, E. 2012. Immunity's fourth dimension: approaching the circadian-immune connection. *Trends in immunology*, 33, 607-612.
- ATHENS, J. W., HAAB, O. P., RAAB, S. O., MAUER, A. M., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. 1961. LEUKOKINETIC STUDIES. IV. THE TOTAL BLOOD, CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE IN NORMAL SUBJECTS. *Journal of Clinical Investigation*, 40, 989-995.
- BEHRENDTS, J. C., BISCHOFBERGER, J., DEUTZMANN, R., EHMKE, H., FRINGS, S., GRISSMER, S., HOTH, M., KURTZ, A., LEIPZIGER, J., MÜLLER, F., PEDAIN, C., RETTIG, J., WAGNER, C. & WISCHMEYER, E. 2017. Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- BELLESI, M., RIEDNER, B. A., GARCIA-MOLINA, G. N., CIRELLI, C. & TONONI, G. 2014. Enhancement of sleep slow waves: underlying mechanisms and practical consequences. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8, 208.
- BESEDOVSKY, H. O. & DEL REY, A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17, 64-102.
- BESEDOVSKY, L., LANGE, T. & BORN, J. 2012. Sleep and immune function. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 463, 121-137.
- BESEDOVSKY, L., LANGE, T. & HAACK, M. 2019. The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 99, 1325-1380.
- BESEDOVSKY, L., NGO, H.-V. V., DIMITROV, S., GASSENMAIER, C., LEHMANN, R. & BORN, J. 2017. Auditory closed-loop stimulation of EEG slow oscillations strengthens sleep and signs of its immune-supportive function. *Nature Communications*, 8, 1984.
- BIERWOLF, C., STRUVE, K., MARSHALL, L., BORN, J. & FEHM, H. L. 1997. Slow Wave Sleep Drives Inhibition of Pituitary-Adrenal Secretion in Humans. *Journal of Neuroendocrinology*, 9, 479-484.
- BIGLER, M. B., EGLI, S. B., HYSEK, C. M., HOENGER, G., SCHMIED, L., BALDIN, F. S., MARQUARDSEN, F. A., RECHER, M., LIECHTI, M. E., HESS, C. & BERGER, C. T. 2015. Stress-Induced In Vivo Recruitment of

- Human Cytotoxic Natural Killer Cells Favors Subsets with Distinct Receptor Profiles and Associates with Increased Epinephrine Levels. *PLOS ONE*, 10, e0145635.
- BJÖRKSTRÖM, N. K., LJUNGGREN, H.-G. & MICHAËLSSON, J. 2016. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, 16, 310.
- BONNE-ANNÉE, S., BUSH, M. C. & NUTMAN, T. B. 2019. Differential Modulation of Human Innate Lymphoid Cell (ILC) Subsets by IL-10 and TGF- $\beta$ . *Scientific Reports*, 9, 14305.
- BORN, J. & FEHM, H. 2000. The neuroendocrine recovery function of sleep. *Noise and Health*, 2, 25-37.
- BORN, J. & FEHM, H. L. 1998. Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: A coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106, 153-163.
- BORN, J., LANGE, T., HANSEN, K., MÖLLE, M. & FEHM, H. L. 1997. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *The Journal of Immunology*, 158, 4454.
- BOUDJELTIA, K. Z., FARAUT, B., STENUIT, P., ESPOSITO, M. J., DYZMA, M., BROHÉE, D., DUCOBU, J., VANHAEVERBEEK, M. & KERKHOFS, M. 2008. Sleep restriction increases white blood cells, mainly neutrophil count, in young healthy men: A pilot study. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 1467-1470.
- BROHEE, D., VANHAEVERBEEK, M., KENNES, B. & NEVE, P. 1990. Leukocyte and lymphocyte subsets after a short pharmacological stress by intravenous epinephrine and hydrocortisone in healthy humans. *International Journal of Neuroscience*, 53, 53-62.
- BROWN, M. & WITWER, C. 2000. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46, 1221-1229.
- BRYANT, P., TRINDER, J. & CURTIS, N. 2004. Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nature reviews. Immunology*, 4, 457-67.
- CAMPBELL, S. S. & TOBLER, I. 1984. Animal Sleep: A Review of Sleep Duration Across Phylogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 8, 269-300.
- CAPURON, L. & MILLER, A. H. 2011. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 130, 226-238.
- CARELLA, C., MAZZIOTTI, G., AMATO, G., BRAVERMAN, L. E. & ROTI, E. 2004. Interferon- $\alpha$ -Related Thyroid Disease: Pathophysiological, Epidemiological, and Clinical Aspects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 3656-3661.
- CARVALHO, L. O., AQUINO, E. N., NEVES, A. C. D. & FONTES, W. 2015. The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116, 1831-1836.
- CARVELLI, J., PIPEROGLOU, C., BOURENNE, J., FARNARIER, C., BANZET, N., DEMERLÉ, C., GAINNIER, M. & VÉLY, F. 2019. Imbalance of Circulating Innate Lymphoid Cell Subpopulations in Patients With Septic Shock. *Frontiers in Immunology*, 10.

- CHENNAOUI, M., ARNAL, P. J., DROGOU, C., LEGER, D., SAUVET, F. & GOMEZ-MERINO, D. 2017. Leukocyte Expression of Type 1 and Type 2 Purinergic Receptors and Pro-Inflammatory Cytokines during Total Sleep Deprivation and/or Sleep Extension in Healthy Subjects. *Frontiers in neuroscience*, 11, 240-240.
- CHRISTOFFERSSON, G., V?GESJ?, E., PETTERSSON, U. S., MASSENA, S., NILSSON, E. K., BROMAN, J.-E., SCHI?TH, H. B., BENEDICT, C. & PHILLIPSON, M. 2014. Acute sleep deprivation in healthy young men: Impact on population diversity and function of circulating neutrophils. *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, 162-172.
- COSTA, R. J. S., SMITH, A. H., OLIVER, S. J., WALTERS, R., MAASSEN, N., BILZON, J. L. J. & WALSH, N. P. 2010. The effects of two nights of sleep deprivation with or without energy restriction on immune indices at rest and in response to cold exposure. *European Journal of Applied Physiology*, 109, 417-428.
- CROMHEECKE, J. L., NGUYEN, K. T. & HUSTON, D. P. 2014. Emerging Role of Human Basophil Biology in Health and Disease. *Current allergy and asthma reports*, 14, 408-408.
- CZEISLER, C. A. & GOOLEY, J. J. 2007. Sleep and Circadian Rhythms in Humans. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72, 579-597.
- DAVIS, C. J., CLINTON, J. M., JEWETT, K. A., ZIELINSKI, M. R. & KRUEGER, J. M. 2011. Delta Wave Power: An Independent Sleep Phenotype or Epiphenomenon? *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 7, S16-S18.
- DEMIR, S., ATLI, A., BULUT, M., İBİLOĞLU, A. O., GÜNEŞ, M., KAYA, M. C., DEMIRPENÇE, Ö. & SİR, A. 2015. Neutrophil-lymphocyte ratio in patients with major depressive disorder undergoing no pharmacological therapy. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 2253-2258.
- DICKSTEIN, J., MOLDOFSKY, H., LUE, F. & B. HAY, J. 1999. *Intracerebroventricular injection of TNF- $\alpha$  promotes sleep and is recovered in cervical lymph.*
- DIEKELMANN, S. & BORN, J. 2010. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci*, 11, 114-26.
- DIMITROV, S., LANGE, T. & BORN, J. 2010. Selective Mobilization of Cytotoxic Leukocytes by Epinephrine. *The Journal of Immunology*, 184, 503.
- DIMITROV, S., LANGE, T., NOHROUDI, K. & BORN, J. 2007. Number and Function of Circulating Human Antigen Presenting Cells Regulated by Sleep. *Sleep*, 30, 401-411.
- DINGES, D. F., DOUGLAS, S. D., ZAUGG, L., CAMPBELL, D. E., MCMANN, J. M., WHITEHOUSE, W. G., ORNE, E. C., KAPOOR, S. C., ICAZA, E. & ORNE, M. T. 1994. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *The Journal of clinical investigation*, 93, 1930-1939.
- ELLA, K., CSÉPÁNYI-KÖMI, R. & KÁLDI, K. 2016. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 209-221.

- EVANS, D. L., FOLDS, J. D., PETITTO, J. M., GOLDEN, R. N., PEDERSEN, C. A., CORRIGAN, M., GILMORE, J. H., SILVA, S. G., QUADE, D. & OZER, H. 1992. Circulating Natural Killer Cell Phenotypes in Men and Women With Major Depression: Relation to Cytotoxic Activity and Severity of Depression. *Archives of General Psychiatry*, 49, 388-395.
- FARAUT, B., BOUDJELTIA, K., VANHAMME, L. & KERKHOFS, M. 2011a. *Immune, inflammatory and cardiovascular consequences of sleep restriction and recovery.*
- FARAUT, B., BOUDJELTIA, K. Z., DYZMA, M., ROUSSEAU, A., DAVID, E., STENUIT, P., FRANCK, T., ANTWERPEN, P. V., VANHAEVERBEEK, M. & KERKHOFS, M. 2011b. Benefits of napping and an extended duration of recovery sleep on alertness and immune cells after acute sleep restriction. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 16-24.
- FARAUT, B., BOUDJELTIA, K. Z., VANHAMME, L. & KERKHOFS, M. 2012. Immune, inflammatory and cardiovascular consequences of sleep restriction and recovery. *Sleep Medicine Reviews*, 16, 137-149.
- FAURSCHOU, M. & BORREGAARD, N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5, 1317-1327.
- FURZE, R. C. & RANKIN, S. M. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125, 281-288.
- GOLDSMITH, H. L. & SPAIN, S. 1984. Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvascular Research*, 27, 204-222.
- GREENE, R. W. & FRANK, M. G. 2010. Slow Wave Activity During Sleep: Functional and Therapeutic Implications. *The Neuroscientist*, 16, 618-633.
- HARTMANN, E. 1968. The 90-minute sleep-dream cycle. *Archives of General Psychiatry*, 18, 280-286.
- HASTINGS, M. H., REDDY, A. B. & MAYWOOD, E. S. 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 649.
- HAUS, E. 2007. Chronobiology in the endocrine system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 985-1014.
- HAYASHI, Y., ISHII, Y., HATA-SUZUKI, M., ARAI, R., CHIBANA, K., TAKEMASA, A. & FUKUDA, T. 2013. Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis. *Respiratory Research*, 14, 29.
- HEISER, P., DICKHAUS, B., OPPER, C., HEMMETER, U., REMSCHMIDT, H., WESEMANN, W., KRIEG, J.-C. & SCHREIBER, W. 2001. Alterations of Host Defence System after Sleep Deprivation are followed by Impaired Mood and Psychosocial Functioning. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2, 89-94.
- HEISER, P., DICKHAUS, B., SCHREIBER, W., CLEMENT, H. W., HASSE, C., HENNIG, J., REMSCHMIDT, H., KRIEG, J. C., WESEMANN, W. & OPPER, C. 2000. White blood cells and cortisol after sleep deprivation and recovery sleep in humans. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 250, 16-23.
- HIRSHKOWITZ, M., WHITON, K., ALBERT, S. M., ALESSI, C., BRUNI, O., DONCARLOS, L., HAZEN, N., HERMAN, J., KATZ, E. S.,



- KHEIRANDISH-GOZAL, L., NEUBAUER, D. N., O'DONNELL, A. E., OHAYON, M., PEEVER, J., RAWDING, R., SACHDEVA, R. C., SETTERS, B., VITIELLO, M. V., WARE, J. C. & ADAMS HILLARD, P. J. 2015. National Sleep Foundation's sleep time duration recommendations: methodology and results summary. *Sleep Health*, 1, 40-43.
- HOLL, R. W., HARTMAN, M. L., VELDHUIS, J. D., TAYLOR, W. M. & THORNER, M. O. 1991. Thirty-Second Sampling of Plasma Growth Hormone in Man: Correlation with Sleep Stages\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 72, 854-861.
- INGRAM, L. A., SIMPSON, R. J., MALONE, E. & FLORIDA-JAMES, G. D. 2015. Sleep disruption and its effect on lymphocyte redeployment following an acute bout of exercise. *Brain, Behavior, and Immunity*, 47, 100-108.
- IRWIN, M., MCCLINTICK, J., COSTLOW, C., FORTNER, M., WHITE, J. & GILLIN, J. C. 1996. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *The FASEB Journal*, 10, 643-53.
- IRWIN, M., THOMPSON, J., MILLER, C., GILLIN, J. C. & ZIEGLER, M. 1999. Effects of Sleep and Sleep Deprivation on Catecholamine And Interleukin-2 Levels in Humans: Clinical Implications<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 1979-1985.
- IRWIN, M. R., WANG, M., RIBEIRO, D., CHO, H. J., OLMSTEAD, R., BREEN, E. C., MARTINEZ-MAZA, O. & COLE, S. 2008. Sleep Loss Activates Cellular Inflammatory Signaling. *Biological Psychiatry*, 64, 538-540.
- KERKHOFS, M., BOUDJELTIA, K. Z., STENUIT, P., BROHÉE, D., CAUCHIE, P. & VANHAEVERBEEK, M. 2007. Sleep restriction increases blood neutrophils, total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in postmenopausal women: A preliminary study. *Maturitas*, 56, 212-215.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 159.
- LAHOZ-BENEYTEZ, J., ELEMANS, M., ZHANG, Y., AHMED, R., SALAM, A., BLOCK, M., NIEDERALT, C., ASQUITH, B. & MACALLAN, D. 2016. Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*, 127, 3431-3438.
- LAKSCHEVITZ, F. S., HASSANPOUR, S., RUBIN, A., FINE, N., SUN, C. & GLOGAUER, M. 2016. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Experimental Cell Research*, 342, 200-209.
- LANGE, T., DIMITROV, S. & BORN, J. 2010. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193, 48-59.
- LASSELIN, J., REHMAN, J. U., AKERSTEDT, T., LEKANDER, M. & AXELSSON, J. 2015. Effect of long-term sleep restriction and subsequent recovery sleep on the diurnal rhythms of white blood cell subpopulations. *Brain Behav Immun*, 47, 93-9.
- LE GARFF-TAVERNIER, M., BÉZIAT, V., DECOCQ, J., SIGURET, V., GANDJBAKHCH, F., PAUTAS, E., DEBRÉ, P., MERLE-BERAL, H. &

- VIEILLARD, V. 2010. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*, 9, 527-535.
- LEGRAND, F., WOERLY, G., DRISS, V. & CAPRON, M. 2008. Innate Immune Function of Eosinophils. In: EWBANK, J. & VIVIER, E. (eds.) *Innate Immunity*. Totowa, NJ: Humana Press.
- LIU, H., WANG, G., LUAN, G. & LIU, Q. 2009. Effects of sleep and sleep deprivation on blood cell count and hemostasis parameters in healthy humans. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 28, 46-49.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2009. Taschenlehrbuch Histologie. In: LÜLLMANN-RAUCH, R. (ed.) 3. Auflage ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- LUTZ, C. T., MOORE, M. B., BRADLEY, S., SHELTON, B. J. & LUTGENDORF, S. K. 2005. Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. *Mechanisms of ageing and development*, 126, 722-731.
- MAECKER, H. M., JP; NUSSENBLATT, R. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12 (3), 191-220.
- MANDAL, A. & VISWANATHAN, C. 2015. Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 8, 47-55.
- MARSHALL, L., HELGADOTTIR, H., MÖLLE, M. & BORN, J. 2006. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature*, 444, 610.
- MASSIMINI, M., FERRARELLI, F., ESSER, S. K., RIEDNER, B. A., HUBER, R., MURPHY, M., PETERSON, M. J. & TONONI, G. 2007. Triggering sleep slow waves by transcranial magnetic stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8496-8501.
- MAUER, A. M., ATHENS, J. W., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. 1960. LEUKOKINETIC STUDIES. II. A METHOD FOR LABELING GRANULOCYTES IN VITRO WITH RADIOACTIVE DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE (DFP32). *The Journal of Clinical Investigation*, 39, 1481-1486.
- MÖLLE, M., MARSHALL, L., GAIS, S. & BORN, J. 2002. Grouping of Spindle Activity during Slow Oscillations in Human Non-Rapid Eye Movement Sleep. *Journal of Neuroscience*, 22.
- MONTALDO, E., ZOTTO, G. D., CHIESA, M. D., MINGARI, M. C., MORETTA, A., MARIA, A. D. & MORETTA, L. 2013. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry Part A*, 83A, 702-713.
- MOSER, D., ANDERER, P., GRUBER, G., PARAPATICS, S., LORETZ, E., BOECK, M., KLOESCH, G., HELLER, E., SCHMIDT, A., DANKER-HOPFE, H., SALETU, B., ZEITLHOFER, J. & DORFFNER, G. 2009. Sleep Classification According to AASM and Rechtschaffen & Kales: Effects on Sleep Scoring Parameters. *Sleep*, 32, 139-149.
- NAKAGAWA, M., TERASHIMA, T., D'YACHKOVA, Y., BONDY, G. P., HOGG, J. C. & VAN EEDEN, S. F. 1998. Glucocorticoid-Induced Granulocytosis. *Circulation*, 98, 2307.

- NANCE, D. M. & SANDERS, V. M. 2007. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 736-745.
- NESKE, G. T. 2015. The Slow Oscillation in Cortical and Thalamic Networks: Mechanisms and Functions. *Frontiers in Neural Circuits*, 9, 88.
- NGO, H.-V. V., MIEDEMA, A., FAUDE, I., MARTINETZ, T., MÖLLE, M. & BORN, J. 2015. Driving Sleep Slow Oscillations by Auditory Closed-Loop Stimulation—A Self-Limiting Process. *The Journal of Neuroscience*, 35, 6630-6638.
- NGO, H. V. V., CLAUSSEN, J. C., BORN, J. & MÖLLE, M. 2013a. Induction of slow oscillations by rhythmic acoustic stimulation. *Journal of Sleep Research*, 22, 22-31.
- NGO, H. V. V., MARTINETZ, T., BORN, J. & MÖLLE, M. 2013b. Auditory closed-loop stimulation of the sleep slow oscillation enhances memory. *Neuron*, 78, 545-553.
- NIETHARD, N., NGO, H.-V. V., EHRLICH, I. & BORN, J. 2018. Cortical circuit activity underlying sleep slow oscillations and spindles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E9220-E9229.
- NUTT, D., WILSON, S. & PATERSON, L. 2008. Sleep disorders as core symptoms of depression. *Dialogues in clinical neuroscience*, 10, 329-336.
- ONG, J. L., LO, J. C., CHEE, N. I. Y. N., SANTOSTASI, G., PALLER, K. A., ZEE, P. C. & CHEE, M. W. L. 2016. Effects of phase-locked acoustic stimulation during a nap on EEG spectra and declarative memory consolidation. *Sleep Medicine*, 20, 88-97.
- OPP, M. R. 2009. Sleeping to fuel the immune system: mammalian sleep and resistance to parasites. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 8.
- ORMEROD, M. 2009. Flow cytometry: A basic introduction., Chapter 3 Fluorescence and fluorochromes.
- PAPE, H.-C. K., ARMIN; SILBERNAGEL, STEFAN 2014. Wachheit und Schlaf: Rhythmen des Gehirns im Muster des Elektroenzephalogramms. *Physiologie*. 7 ed.: Auflage Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio.
- PRESTON, B. T., CAPELLINI, I., MCNAMARA, P., BARTON, R. A. & NUNN, C. L. 2009. Parasite resistance and the adaptive significance of sleep. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 7.
- PRINYAKUPT, J. & PLUEMPITIWIRIYAJEJ, C. 2015. Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers. *BioMedical Engineering OnLine*, 14, 63.
- PRINZ, P. N., HALTER, J., BENEDETTI, C. & RASKIND, M. 1979. Circadian Variation of Plasma Catecholamines in Young and Old Men: Relation to Rapid Eye Movement and Slow Wave Sleep\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 49, 300-304.
- RECHTSCHAFFEN, A., KALES, A., UNIVERSITY OF CALIFORNIA, L. A., BRAIN INFORMATION, S., NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL, D. & BLINDNESS 1968. *A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*, Washington, DC, United States Government Printing Office.

- RICARDO, J. S. C., CARTNER, L., OLIVER, S. J., LAING, S. J., WALTERS, R., BILZON, J. L. J. & WALSH, N. P. 2009. No effect of a 30-h period of sleep deprivation on leukocyte trafficking, neutrophil degranulation and saliva IgA responses to exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 105, 499-504.
- RON-HAREL, N., CARDON, M. & SCHWARTZ, M. 2011. Brain homeostasis is maintained by “danger” signals stimulating a supportive immune response within the brain’s borders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 1036-1043.
- RUIZ, F. S., ANDERSEN, M. L., MARTINS, R. C., ZAGER, A., LOPES, J. D. & TUFIK, S. 2012. Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immunity*, 18, 44-54.
- SANCHEZ-VIVES, M. V. 2013. Slow Oscillations: Physiology. In: JAEGER, D. & JUNG, R. (eds.) *Encyclopedia of Computational Neuroscience*. New York, NY: Springer New York.
- SCANZANO, A. & COSENTINO, M. 2015. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 6.
- SCHWARTZ, M. & KIPNIS, J. 2011. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 817-819.
- SEIDE, A., AROLT, V., HUNSTIGER, M., RINK, L., BEHNISCH, A. & KIRCHNER, H. 1996. Increased CD56+Natural Killer Cells and Related Cytokines in Major Depression. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 78, 83-85.
- SIEGEL, J. M. 2009. Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 747.
- SOHMIYA, M., KANAZAWA, I. & KATO, Y. 2005. Effect of recombinant human GH on circulating granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils in patients with adult GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, 152, 211-5.
- SPIEGEL, K., FOLLENIUS, M., SIMON, C., SAINI, J., EHRHART, J. & BRANDENBERGER, G. 1994. Prolactin secretion and sleep. *Sleep*, 17, 20-7.
- SPRIGGS, W. H. 2014. Chapter 6: Patient Hookup Procedures. *Essentials of Polysomnography* Jones & Bartlett Learning, LLC.
- STERIADE, M. 2006. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience*, 137, 1087-1106.
- STERIADE, M., NUNEZ, A. & AMZICA, F. 1993a. Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *The Journal of Neuroscience*, 13, 3266.
- STERIADE, M., NUNEZ, A. & AMZICA, F. 1993b. A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *The Journal of Neuroscience*, 13, 3252.
- SUMMERS, C., RANKIN, S. M., CONDLIFFE, A. M., SINGH, N., PETERS, A. M. & CHILVERS, E. R. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31, 318-324.

- SUZUKI, K., MIYAMOTO, M. & HIRATA, K. 2017. Sleep disorders in the elderly: Diagnosis and management. *Journal of general and family medicine*, 18, 61-71.
- TONONI, G., RIEDNER, B., HULSE, B., FERRARELLI, F. & SARASSO, S. 2010. *Enhancing sleep slow waves with natural stimuli*.
- TOPHAM, N. J. & HEWITT, E. W. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 128, 7-15.
- VAN LEEUWEN, W. M. A., LEHTO, M., KARISOLA, P., LINDHOLM, H., LUUKKONEN, R., SALLINEN, M., HÄRMÄ, M., PORKKA-HEISKANEN, T. & ALENIUS, H. 2009. Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PloS one*, 4, e4589-e4589.
- VAN SOMEREN, E. J. W. 2000. Circadian and sleep disturbances in the elderly. *Experimental Gerontology*, 35, 1229-1237.
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. & UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9, 503.
- VON VIETINGHOFF, S. & LEY, K. 2008. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181, 5183-5188.
- WATSON, N. F., BADR, M. S., BELENKY, G., BLIWISE, D. L., BUXTON, O. M., BUYSSE, D., DINGES, D. F., GANGWISCH, J., GRANDNER, M. A., KUSHIDA, C., MALHOTRA, R. K., MARTIN, J. L., PATEL, S. R., QUAN, S. F., TASALI, E., NON-PARTICIPATING, O., TWERY, M., CROFT, J. B., MAHER, E., AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE, S., BARRETT, J. A., THOMAS, S. M. & HEALD, J. L. 2015. Recommended Amount of Sleep for a Healthy Adult: A Joint Consensus Statement of the American Academy of Sleep Medicine and Sleep Research Society. *J Clin Sleep Med*, 11, 591-2.
- WEIGENAND, A., MÖLLE, M., WERNER, F., MARTINETZ, T. & MARSHALL, L. 2016. Timing matters: open-loop stimulation does not improve overnight consolidation of word pairs in humans. *European Journal of Neuroscience*, 44, 2357-2368.
- WELLACH, I. H. 2015. Praxisbuch EEG. In: WELLACH, I. (ed.) *Praxisbuch EEG*. 2., überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- WILDER-SMITH, A., MUSTAFA, F. B., EARNEST, A., GEN, L. & MACARY, P. A. 2013. Impact of partial sleep deprivation on immune markers. *Sleep Medicine*, 14, 1031-1034.
- ZHANG, Y., WALLACE, D. L., DE LARA, C. M., GHATTAS, H., ASQUITH, B., WORTH, A., GRIFFIN, G. E., TAYLOR, G. P., TOUGH, D. F., BEVERLEY, P. C. L. & MACALLAN, D. C. 2007. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*, 121, 258-265.
- ZSCHOCKE, S. & HANSEN, H.-C. 2012. Klinische Elektroenzephalographie. In: ZSCHOCKE, S. & HANSEN, H.-C. (eds.) 3 ed.: Springer Berlin Heidelberg.

## 9 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Luciana Besedovsky (Arbeitsgruppenleiterin) und Herrn Prof. Dr. Jan Born (Institutsleitung) durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Luciana Besedovsky und Herrn Prof. Dr. Jan Born.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Luciana Besedovsky) von mir in Zusammenarbeit mit Herrn Ilja Goldins durchgeführt. Gemeinsam, zu jeweils gleichen Anteilen, führten wir die Rekrutierung der Probanden, Vor- und Nachbereitungen der einzelnen Sitzungen, EEG-Datenanalysen und die Blutentnahmen durch.

Meinerseits erfolgte zudem die Durchführung und das Monitoring der auditorischen Stimulation bei jeder Sitzung (siehe Kapitel 2.3.2). Die Blutentnahmen während der Stimulation wurden überwiegend von Herrn Ilja Goldins durchgeführt. Außerdem war er weitestgehend für die Weiterverarbeitung der Blutproben zuständig. Die Analyse der Blutproben am Durchflusszytometer erfolgte durch die damalige studentische Hilfskraft Frau Adeline Brendian. Gemeinsam mit Frau Prof. Dr. Luciana Besedovsky erfolgte das Gating der Subpopulationen und die Erstellung der dazugehörigen Schaubilder aus Kapitel 3.4.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Prof. Dr. Luciana Besedovsky und alle in diesem Zusammenhang dargestellten Schaubilder wurden eigenständig von mir erstellt. Die Abbildungen 6 und 7 aus dem Methodenteil wurden mit Unterstützung von Herrn Dr. Hong-Viet Victor Ngo erstellt. Die Erstellung der restlichen Abbildungen erfolgte eigenständig und wurden bei Anlehnung an andere Quellen entsprechend markiert.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Samuel Büttner

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Jan Born für die Möglichkeit der Studiendurchführung und Schaffung der entsprechenden Rahmenbedingungen am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen bedanken.

Insbesondere möchte ich Frau Prof. Dr. Luciana Besedovsky meinen größten Dank für die stets exzellente und intensive Betreuung in der gesamten Zeit, von Beginn der Studie bis hin zur Fertigstellung der Dissertation, aussprechen. Ohne ihr Engagement und ihre Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ein weiterer besonderer Dank geht an Herrn Dr. Hong-Viet Victor Ngo für die professionelle Beratung bei technischen Fragen im Rahmen der Studie.

Meiner Familie und Freunden danke ich ganz herzlich für ihre unentwegte Unterstützung auf dem Weg zur Dissertation.