

Institut für Zoologie der Technischen Universität München

**Der Einfluß des atypischen Neuroleptikums Clozapin
auf das Verhalten und das Immunsystem der Ratte**

Silke Sorge

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Leo Demple

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Hans-Joachim Leppelsack
2. Hon.-Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer,
Ludwig-Maximilians-Univ. München

Die Dissertation wurde am 11.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.09.2003 angenommen.

Der Drang zu Forschen dient

»Jungeanisch formuliert... [der] Herstellung eines 'Bewußtsein vom Selbst', bzw. eines 'bewußten Zustandes des Selbst'. Nun ist dieses nicht nur licht, sondern auch dunkel und muß als Totalität auch den Willen zur Macht über die Natur mitenthalten, den ich als eine Art böse Hinterseite der Naturwissenschaften auffasse, die sich von diesen nicht abtrennen läßt.«

Wolfgang Pauli

über die Schattenseite der Wissenschaft

- meiner Mutter -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Schlaf.....	2
1.1.1. Regulation des Schlafes.....	2
1.1.2. Schlafverhalten bei Immunstimulation.....	4
1.1.3. Schlaf und Zytokine.....	6
1.2. Clozapin.....	9
1.3. Geschichte.....	9
1.4. Theorien zur antipsychotischen Wirkung.....	11
1.5. Nebenwirkungen von Clozapin.....	12
1.5.1. EEG und Schlafverhalten unter Clozapingabe.....	13
1.5.2. Clozapin und Immunsystem.....	14
1.5.3. Clozapin und Körpergewicht.....	14
1.6. Interaktionen der Clozapinwirkungen.....	14
1.7. Clozapin im Tierversuch.....	16
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Tiere.....	19
2.2. Pharmakon.....	19
2.3. Ableitung von EEG, EMG und Gehirntemperatur.....	19
2.3.1. Operation.....	19
2.3.2. EEG-Ableitungen.....	21
2.3.3. EEG-Auswertung.....	22
2.3.4. Versuchsdesign.....	25
2.3.5. Statistik.....	26
2.4. Registrierung von Aktivität, Körpertemperatur, Futter- und Wasseraufnahme.....	27
2.4.1. Implantation eines Bauchsenders.....	27
2.4.2. Versuchsanordnung.....	27
2.4.3. Versuchsablauf.....	28
2.4.4. Auswertung.....	29
2.4.5. Statistik.....	30
2.5. Konzentrationen von Clozapin und seinem Abbauprodukt Norclozapin.....	30
2.5.1. Proben.....	30
2.5.2. Extraktion.....	31
2.5.3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	31
2.5.4. Statistik.....	31
2.6. Bestimmung von TNF- α	31
2.6.1. Proben.....	31
2.6.2. Präparation der Gehirne.....	32
2.6.3. Homogenisation der Gehirne.....	32

2.6.4. in vitro-Versuche.....	33
2.6.5. ELISA.....	33
2.6.6. Bestimmung des Proteingehaltes.....	34
2.6.7. Statistik.....	34
2.7. Bestimmung der Serum-Leptin-Konzentrationen.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten während der Ruheperiode.....	35
3.2. Effekte von Clozapin auf den Schlaf der Ratte.....	35
3.2.1. Verteilung der Vigilanzstadien.....	35
3.2.2. Architektur des Schlafes.....	41
3.2.3. SWA während non-REM-Schlaf.....	43
3.2.4. Besondere EEG-Signale.....	44
3.2.5. Gehirntemperatur.....	47
3.3. Tageszeitliche Änderungen von Nahrungsaufnahme, Aktivität und Körpertemperatur bei Laborratten.....	48
3.4. Effekte von Clozapin auf Futter- und Wasseraufnahme, Aktivität und Körpertemperatur.....	50
3.4.1. Aktivität und Körpertemperatur.....	50
3.4.2. Futter- und Wasseraufnahme.....	53
3.4.3. Körpermasse.....	53
3.5. Weitere Verhaltensbeobachtungen.....	54
3.6. Einfluß von Clozapin auf humorale Parameter.....	55
3.6.1. Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin.....	55
3.6.2. Konzentrationen von TNF- α	57
3.6.3. Serumkonzentrationen von Leptin.....	59
4. Diskussion.....	61
4.1. Effekte von Clozapin auf den Schlaf der Ratte.....	61
4.2. Mechanismen der Einflußnahme von Clozapin auf das Schlafverhalten.....	65
4.3. Einfluß von Clozapin auf die Produktion von TNF- α	69
4.4. Clozapin-induzierte EEG-Veränderungen.....	70
4.5. Einfluß von Clozapin auf die lokomotorische Aktivität.....	71
4.6. Gehirn- und Körpertemperatur nach Clozapingabe.....	73
4.7. Wirkungen von Clozapin auf Körpermasse und Leptin.....	76
4.8. Nahrungsaufnahme unter Clozapinbehandlung.....	78
4.9. Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin.....	81
4.10. Abschlußdiskussion.....	83
4.11. Ausblick.....	85
5. Zusammenfassung.....	87
6. Literaturnachweis.....	89
7. Danksagung.....	103

Abkürzungsverzeichnis

a.d.	aqua dest. (destilliertes bzw. deionisiertes Wasser)
Abb.	Abbildung
DMSO	D es m ethylsulfoxid
EEG	E lektro e ncephalogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	Farad
i.c.v.	i ntracerebroventriculär
i.m.	i ntramuskulär
i.p.	i ntraperitoneal
IL	I nterleukin
K	Kelvin
LHA	l aterales h ypothalamisches A real
LPS	L ipopolysaccharid (Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien)
MW	Mittelwerte
n.s.	n icht s ignifikant
non-REM	n on- r apid e ye m ovement
p.o.	oral (p er o s)
pre-REM	p re- r apid e ye m ovement
REM	r apid e ye m ovement
RIA	r adio i mmuno a ssay
s.c.	s ubcutan (unter die Haut)
s.u.	siehe unten
SEM	Standardfehler (standard e rror of the m ean)
SWA	Aktivität langsamer Wellen im EEG (s low w ave a ctivity)
SWS	Tiefschlaf (s low w ave s leep)
TNF	T umornekrose f aktor
u.a.	unter anderem
u.v.a.	und viele andere
VMN	v entromedialer N ucleus
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Clozapin ist ein atypisches Neuroleptikum, das unter dem Namen Leponex® zur Behandlung schizophrener Symptome zugelassen ist. Im Gegensatz zu den typischen Neuroleptika verursacht Clozapin keine oder nur geringe sogenannte extrapyramidalmotorische Störungen, zeigt jedoch eine Reihe anderer Nebenwirkungen. So moduliert es Schlaf und Immunsystem der Patienten.

Die Wirkungen von Clozapin auf den Schlaf schizophrener Patienten bestehen in einer Erhöhung des Schlafbedürfnisses und der Schlafeffizienz sowie in einer Verlängerung der Schlafdauer. Die Dauer des Wachseins, die Häufigkeiten des Erwachens und die Menge der Bewegungen während der Schlafphasen sind verringert. Schlafstadium 4 (Tiefschlaf) ist erheblich unterdrückt.

Eine Modulation des Immunsystems äußert sich häufig in dem Auftreten von transientem Fieber. Es finden sich erhöhte Plasma-Konzentrationen von TNF- α , der löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 und der löslichen Il-2-Rezeptoren. TNF- α ist bekanntermaßen nicht nur ein Pyrogen, sondern auch ein zentraler Mediator der Schlafveränderungen bei Infektionen. Auch unter physiologischen Bedingungen nimmt TNF- α Einfluß auf das Schlafverhalten. Da die Veränderungen des Schlafes unter Clozapinmedikation denen nach experimenteller Endotoxingabe - einem Modell akuter Infektionen - ähnlich sind, liegt der Verdacht nahe, daß der Anstieg des TNF- α unter Clozapin für die Modulation des Schlafverhaltens mitverantwortlich sein könnte.

Zudem führt eine Clozapinbehandlung aufgrund einer Steigerung des Appetits nicht selten zu einer wesentlichen Gewichtszunahme. Diese ist begleitet von einem Anstieg der Serum-Leptin-Werte, einem Protein, das für die Regulation von Appetit und Gewicht von Bedeutung ist. Da vor allem jene Patienten zunehmen, die von der Clozapintherapie profitieren, wird eine zentralnervöse Wechselbeziehung zwischen den therapeutischen und den Nebenwirkungen des Medikamentes vermutet.

Die Klärung dieser Zusammenhänge verspricht ein größeres Wissen über Entstehung und Behandlung psychiatrischer Erkrankungen und ermöglicht eine gezieltere Suche nach wirksamen Substanzen, kann jedoch aus ethischen Gründen nur am Tiermodell erfolgen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das spontane Schlaf-Wach-Verhalten, die spontane Futter- und Wasseraufnahme und lokomotorische Aktivität sowie die Gehirn- und Körpertemperatur von Laborratten unter akuter und subchronischer (sieben Tage) Clozapinbehandlung bei gleichzeitiger Bestimmung immunologischer und homöostatischer Parameter zu erfassen, um die Eignung der Ratte als Modelltier zu testen.

Im Folgenden wird zunächst der Aspekt Schlaf und dann die Substanz Clozapin mit ihren Wirkungen und Nebenwirkungen näher erläutert.

1.1. Schlaf

In früheren Zeiten wurde Schlaf mit fehlender Aktivität gleichgesetzt. Inzwischen wissen wir, daß Schlaf, obwohl er uns als passiv erscheint, weil er eine lange Phase fehlender bewußter Wahrnehmung und Erinnerungsfähigkeit darstellt, ein aktiver Prozeß ist.

Mit Entwicklung der Fotografie begannen die ersten Untersuchungen des Schlafes, indem periodische Photoaufnahmen von Schläfern angefertigt wurden. Mit Einführung der Elektroenzephalographie (EEG) durch Hans Berger 1929 entstand eine geeignete Methode zur detaillierten Erforschung des Schlafes. Es wurde festgestellt, daß während des Schlafes Phasen rascher Augenbewegungen auftreten (**rapid-eye movements**), weshalb dieses Schlafstadium REM-Schlaf genannt wurde (Aserinsky & Kleitman, 1953). Der übrige Schlaf erhielt, obwohl er elektroenzephalographisch wesentlich interessanter ist, die wenig ausdrucksvolle Bezeichnung non-REM-Schlaf. Während der REM-Schlaf durch ein gleichmäßiges, niederamplitudiges Wellenmuster in Frequenzen über 4 Hz gekennzeichnet ist, stellt der non-REM-Schlaf keine einheitliche Schlafphase dar, sondern wird in vier Schlafstadien unterteilt (non-REM Stadien 1-4). Die Stadien 1 und 2 werden als leichter Schlaf zusammengefaßt, wobei Stadium 1 den Einschlafprozeß zu Beginn der Nacht und nach intermittierenden Wachphasen darstellt. Stadium 2 ist durch Spindeln und K-Komplexe gekennzeichnet. Stadium 3 und 4 werden als Tiefschlaf bezeichnet und sind für die Erholbarkeit des Schlafes verantwortlich. Charakteristisch für den Tiefschlaf ist das Auftreten langsamer Wellen (*slow waves*) im delta-Frequenzbereich von 0,5-4 Hz. Die Stadien 3 und 4 unterscheiden sich in ihrem prozentualen Anteil dieser niederfrequenten Wellen.

Während der Nacht absolviert ein Schläfer mehrere aufeinanderfolgende Zyklen dieser Schlafstadien, indem zuerst die non-REM Stadien 1-4 und anschließend eine REM-Schlaf-Periode durchlaufen werden. Dabei nimmt im Laufe der Nacht die Tiefe des non-REM-Schlafes ab, während die Dauer des REM-Schlafes zunimmt.

Eine Differenzierung des Schlafes in non-REM- und REM-Phasen ist für jedes Säugetier möglich, auch wenn bei Tieren die Unterteilung des non-REM-Schlafes in die Stadien 1-4 in der Form wie bei Menschen nicht erkennbar ist. Allerdings korreliert das Auftreten langsamer Wellen, die *slow wave activity* (SWA), bei Menschen und Säugetieren gleichermaßen mit der Tiefe des Schlafes. Mit zunehmender Schlafdauer während der Ruheperiode nimmt die SWA bei Tieren, z.B. Ratten, wie beim Menschen ab. Daher kann die *slow wave*-Aktivität im EEG von Ratten mit dem Tiefschlaf des Menschen verglichen werden.

1.1.1. *Regulation des Schlafes*

Schlafen gehört zu den komplexen Verhaltensweisen und ist somit auch komplex reguliert. Es ist also niemals nur ein Faktor oder eine Bedingung für das Schlafverhalten verantwortlich, sondern stets eine Reihe von Faktoren und Einflußgrößen, aus deren Zusammenspiel heraus das

Schlafbedürfnis und das Schlafmuster entstehen.

Der Grad der Müdigkeit erhöht sich während eines Tages proportional zu der Zeit, die seit dem letzten Schlafereignis vergangen ist. Allerdings steigt nach einer durchwachten Nacht das Bedürfnis zu schlafen am Morgen nicht zunehmend an. Vielmehr ist die Einschlafneigung tageszeitabhängig verschieden stark ausgeprägt. Diese Beobachtungen haben Borbély (1982) zur Aufstellung des Zwei-Komponenten-Modells der Schlafregulation veranlaßt (Abb. 1). Danach bestimmt ein circadian (circa diem: etwa eintägig) oszillierender Prozeß, die circadiane Komponente C, schlafunabhängig die Einschlafneigung zu den unterschiedlichen Tageszeiten. Ein zweiter Prozeß S steigt abhängig von der Wachzeit, aber unabhängig von der Tageszeit kontinuierlich an. Das Schlafbedürfnis wird gemeinschaftlich durch beide Prozesse reguliert, die Schläfrigkeit ist um so höher, je größer der Abstand zwischen den Kurvenverläufen beider Prozesse ist (siehe Abb. 1).

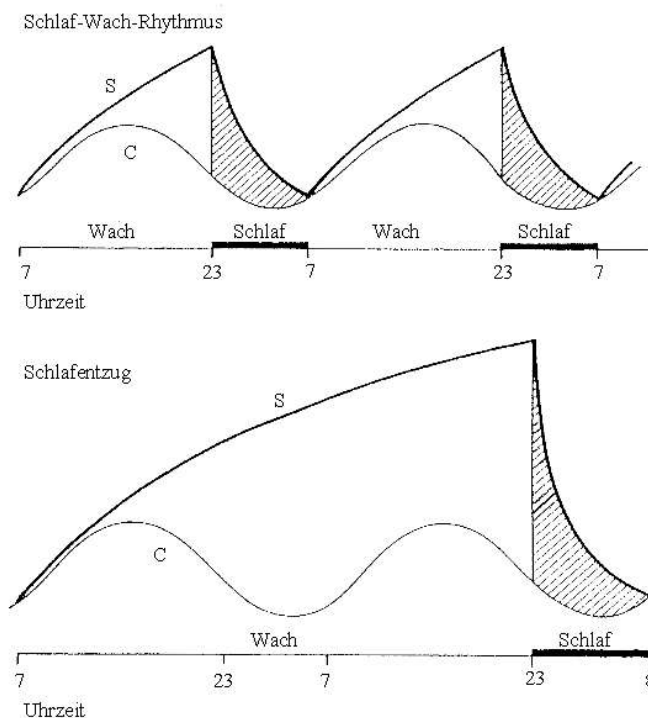


Abb. 1: Das Zwei-Komponenten-Modell der Schlafregulation stellt die Einschlafneigung zu einer bestimmten Tageszeit als Differenz des circadian oszillierenden Prozesses C und des homöostatischen Prozesses S dar. Je größer die Differenz zwischen den Prozessen, um so größer ist die Einschlafneigung. Der Prozeß C verkörpert in diesem Fall die circadian regulierte Fähigkeit zum Wachbleiben. Prozeß S ist abhängig von der Dauer des Wachseins (verändert nach Borbély, 1982).

Der physiologische Hintergrund der Komponente C ist eine innere Uhr. Hierbei handelt es sich um eine oszillierende Zellgruppe, die sich im medialen Hypothalamus über dem optischen Chiasma befindet und daher Nucleus suprachiasmaticus genannt wird. Diese innere Uhr unterwirft eine Vielzahl von körperinternen Prozessen, wie z.B. Körpertemperatur und Hormonfreisetzung, circadianen Schwankungen und gibt allen Säugetieren Ruhe- und Aktivitätsphasen vor.

Einen physiologischen Parameter zu finden, der den homöostatischen Prozeß S verkörpert, erweist sich als wesentlich schwieriger. Hierbei könnte es sich um eine Substanz handeln, die während der Wachzeit angereichert und während des Schlafes abgebaut wird. Humorale Faktoren wurden bereits von Ishimori (1909) und Legendre & Piéron (1913) mit Schlaf in Zusammenhang gebracht, als sie nach i.c.v. Injektion cerebrospinaler Flüssigkeit oder Hirngewebe von schlafdeprivierten Hunden bei nicht deprivierten Tieren eine Zunahme des Schlafverhaltens feststellten. Diese Beobachtung wurde später mit Hilfe von EEG-Aufzeichnungen an Hunden, Katzen und Nagetieren objektiviert (Borbély & Tobler, 1989; Krueger & Majde, 1994). Gleichzeitig begann in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Urin die Suche nach dem Faktor S, der diese Schlafförderung verursachte. Überraschenderweise konnte ein bakterielles Abbauprodukt, das Muramylpeptid (Krueger et al., 1982), welches bei der Phagozytose von Bakterien durch Makrophagen freigesetzt wird, verantwortlich gemacht werden. Muramylpeptide können die Freisetzung von Zytokinen durch Makrophagen induzieren (Leclerc & Chedid, 1982), dies sind kleine, als Botenstoffe fungierende Proteine, die vorrangig von Immunzellen sezerniert werden. Daher kam das Immunsystem ins Gespräch, an der Schlafregulation beteiligt zu sein. Eine Reihe von Studien wurden durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen Immunsystem und Schlaf zu beleuchten.

1.1.2. Schlafverhalten bei Immunstimulation

Während Infektionen fühlt man sich verstärkt müde und braucht mehr Schlaf. Auch andere Eigenschaften ändern sich, so lassen das Interesse für die Umwelt (Neugierde) oder die Fähigkeit, sich Dinge zu merken, nach. Zahlreiche Untersuchungen an Probanden, die kontrollierte Infektionen vor allem mit Viren hatten, belegen neben körperlichen Symptomen wie Fieber und Kopfschmerzen auch eine Zunahme von Müdigkeit, Depressivität und Angst, Appetitlosigkeit und eine Verlangsamung von Reaktionen (Smith et al., 1987, 1988, 1992, 1993). Solche Beobachtungen legen nahe, daß das Immunsystem in die Ausübung von Verhaltensweisen einschließlich des Schlafverhaltens eingreifen kann. Eine Vielzahl vor allem tierexperimenteller Studien wurden durchgeführt, um die Zusammenhänge zwischen Immunsystem und Verhalten aufzudecken. Dabei bediente man sich besonders häufig der Gabe von LPS (=Lipopolysaccharid, ein gereinigter Zellwandbestandteil (Endotoxin) gram-negativer Bakterien) als Modell für die Akute-Phase-Reaktion bei Infektionen.

Die Verabreichung von Endotoxin stimuliert die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und auch IL-1 β . Infolge dieser Zytokinfreisetzung steigen die Plasmawerte der Stresshormone

ACTH und Cortisol, die ihrerseits gegenregulatorisch die Freisetzung von IL-1 β und TNF- α unterdrücken. Der Anstieg von IL-6 zieht eine Temperaturerhöhung nach sich (Burrell, 1994).

Hohe Dosierungen von Endotoxin, die beim Menschen Fieber von ca. 39 °C hervorrufen, stören den Schlaf, indem sie den non-REM-Schlaf inhibieren und den nächtlichen Wachanteil erhöhen (Bauer et al., 1995; Karacan et al., 1968; Mullington et al., 2000). Es ist unklar, ob diese Schlafstörungen auf eine starke Immunstimulation oder die daraus resultierenden körperlichen Beschwerden wie Kopfschmerzen und Übelkeit zurückzuführen sind. Zum Ausschluß des Einflusses körperlicher Nebenwirkungen wurden bei gesunden Probanden systematisch die Schlafveränderungen nach Gabe von *Salmonella abortus equi*-Endotoxin in Dosierungen untersucht, die eine Temperaturantwort lediglich im subfebrilen Bereich hervorrufen. Es stellte sich heraus, daß die Effekte auf den Schlaf vom Zeitpunkt der Immunstimulation und der verwendeten Dosierung abhängig sind (Tab. 1). Dosisabhängig verursachte Endotoxin einen Anstieg der Temperatur (unter 38 °C) sowie der Plasmawerte von TNF- α , IL-6, ACTH und Cortisol. Wurde die Immunstimulation direkt zu Beginn der Schlafaufzeichnungen durchgeführt, erwies sich eine geringe Endotoxinmenge (0,2 ng/kg Körpergewicht) als tiefschlaffördernd. Eine moderate Dosierung (0,4 ng/kg) verlängerte die REM-Latenz und unterdrückte den REM-Schlaf. Eine vergleichsweise hohe Endotoxindosis (0,8 ng/kg) wirkte sich als schlafstörend aus, was sich in einer Abnahme der Schlafeffizienz aufgrund einer Zunahme der intermittierenden Wachphasen äußerte (Mullington et al., 2000).

Tab. 1: Wirkungen von Endotoxin (LPS) auf den Schlaf des Menschen in Abhängigkeit von der Dosis und dem Verabreichungszeitpunkt (Pollmächer et al., 1993; Trachsel et al., 1994; Mullington et al., 2000).

Injektionszeitpunkt	LPS 4h vor Schlafbeginn		LPS zu Schlafbeginn		
	0,4 ng/kg	0,8 ng/kg	0,2 ng/kg	0,4 ng/kg	0,8 ng/kg
wach	↓	↓			↑
non-REM Stadium 2 SWS	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑		↓
REM REM-Latenz	↓ ↑			↓ ↑	
Schlafeffizienz			↑		↓

Wurde die moderate oder hohe Endotoxin-Dosierung am frühen Abend gegeben, so daß die Schlafregistrierung zu einem Zeitpunkt begann, zu dem die Stimulation der humoralen Immunfaktoren und der Stresshormone bereits wieder abklang, war der prozentuale Anteil des non-REM-Schlafes zugunsten einer Zunahme des Stadiums 2 und einer Abnahme des nächtlichen Wachseins erhöht (Pollmächer et al., 1993; Trachsel et al., 1994). Es zeigte sich eine Neigung zu

einer verlängerten REM-Latenz und eine statistisch signifikante Abnahme des prozentualen REM-Schlafanteils in der ersten Hälfte der Nacht (Pollmächer et al., 1993).

Die Befunde erweisen sich als konform zu den Ergebnissen aus Tierschlafstudien. Die systemische Verabreichung von *Salmonella abortus equi*-Endotoxin bei Ratten ergab einen biphasischen Verlauf der Schlafveränderungen. Zur Ruhephase von Ratten injiziert, waren die Tiere in den ersten beiden Stunden vermehrt wach. Den Rest der Ruhephase war der Schlaf nicht beeinflusst, in der folgenden Aktivitätsphase trat signifikant mehr non-REM-Schlaf auf (Lancel et al., 1995, Mathias et al., 2000). Dieselbe Dosierung zur Aktivitätsphase gegeben verursachte nach einer anfänglichen Erhöhung des Wachanteils eine Vermehrung des non-REM-Schlafes. Unabhängig von dem Zeitpunkt der Injektion war der REM-Schlaf in beiden Fällen signifikant unterdrückt. Bei langen Untersuchungszeiträumen wurde im späteren Verlauf der Schlafaufzeichnungen ein kompensatorischer Anstieg des REM-Schlafes registriert.

Zusammenfassend scheint in Abhängigkeit von der circadianen Phase zum Zeitpunkt der Endotoxin-Gabe eine starke Immunstimulation den non-REM-Schlaf zu stören, leichte und mäßige Stimulationen durch geringe Endotoxin-Dosierungen mit unterschiedlicher Latenzzeit zu einer Zunahme der non-REM-Schlafmenge und der EEG-Delta-Power zu führen. Unabhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung wirkt Endotoxin bei Kleinnagern REM-Schlaf-unterdrückend.

1.1.3. *Schlaf und Zytokine*

Ergänzt wurden diese Experimente durch Schlafaufzeichnungen nach Gabe von Zytokinen, um Beweise für die direkte Einflußnahme von Immunfaktoren auf das Schlaf-Wach-Verhalten zu erhalten. Umfangreiche Studien liegen für IL-1 vor. Ähnlich der Wirkungen von Endotoxin waren die Effekte einer systemischen oder zentralen Gabe von IL-1 auf den Schlaf von Ratten von der Dosis und dem Zeitpunkt der Injektion abhängig. Zur Ruheperiode (Lichtphase) verabreicht, konnte nur in wenigen Studien ein Einfluß von IL-1 auf die non-REM-Schlafdauer festgestellt werden, wobei mittlere Dosierungen den non-REM-Schlaf zu fördern scheinen, während sehr hohe Dosierungen ihn unterdrücken. Gleichzeitig wurde dosisunabhängig ein Anstieg der slow-wave Aktivität während non-REM gefunden (Opp et al., 1991; Lancel et al., 1996; Opp & Toth, 1998). IL-1 zur Aktivitätsperiode gegeben verlängerte die non-REM-Schlafdauer. Nur sehr hohe Dosierungen führten zu einer Unterdrückung des non-REM-Schlafes. Demgegenüber war die slow-wave Aktivität während non-REM im mittleren dosisbereich unverändert, sehr niedrige Dosierungen erhöhten die SWA, während hohe Injektionsmengen die SWA unterdrückten (Opp et al., 1991; Lancel et al., 1996; Gemma et al., 1997; Hansen & Krueger, 1997; Opp & Toth, 1998). Unabhängig vom Injektionszeitpunkt supprimieren mittel- und hochdosierte Gaben von IL-1 den REM-Schlaf, während geringe Dosierungen diesen unangetastet lassen. Die Tab. 2 faßt die Befunde zusammen.

Tab. 2: Überblick über die Wirkungen der zentralen oder systemischen Gabe von IL-1 auf den Schlaf in Abhängigkeit von der Dosis und dem Verabreichungszeitpunkt. ↑ = Zunahme; ↓ = Abnahme; ↔ = keine Veränderung; – = keine Daten erhoben (Zusammenstellung aus Opp et al., 1991; Lancel et al., 1996; Gemma et al., 1997; Hansen & Krueger, 1997; Opp & Toth, 1998).

Dosierung von IL-1						
<i>Verabreichung zu Beginn der Ruheperiode</i>						
Dosis absolut	—	1,0 ng i.c.v.	2,5 ng i.c.v.	5 ng i.c.v. 2 µg/kg i.p.	10 ng i.c.v.	25 ng i.c.v.
Non-REM-Schlafdauer		↔	↑	↑	↔	↓
SWA		↔	↑	↑	↑	↑
REM-Schlafdauer		↔	↔	↓	↓	↓
<i>Verabreichung zu Beginn der Aktivitätsperiode</i>						
Dosis absolut	0,5 ng i.c.v.	1,0 ng i.c.v. 0,1-0,5 µg/kg i.p.	2,5-5 ng i.c.v. 2 µg/kg i.p.	10 ng i.c.v. 2,5 µg/kg i.p.	25 ng i.c.v.	
Non-REM-Schlafdauer	↑	↑	↑	↑	↓	
SWA	↑	↔	↔	↓	—	
REM-Schlafdauer	↔	↔	↓	↓	↓	

Die Unterdrückung des non-REM-Schlafes durch hohe Dosierungen von IL-1 wurde u.a. auf gegenregulatorische Mechanismen wie die Freisetzung von CRH zurückgeführt, das bei Tieren den non-REM-Schlaf und die EEG-Delta-Aktivität hemmt (Opp et al., 1989). Zweifellos existiert ein effektiver Dosisbereich, in dem IL-1 schlaffördernd wirkt, entweder durch eine Verlängerung der Dauer des non-REM-Schlafes oder über eine Vermehrung der EEG-delta-Aktivität im non-REM-Schlaf.

Auch TNF- α führte bei Kaninchen (Shoham et al., 1987; Kapás et al., 1992; Takahashi et al., 1996b, 1999), Ratten (Nistico et al., 1992; Terao et al., 1998; Kubota et al., 2001), Mäusen (Fang et al., 1997) und Schafen (Dickstein et al., 1999) zu einer Zunahme des non-REM-Schlafes und der SWA und zu einer verkürzten REM-Schlafdauer. Die Wirkungen traten in der Regel bereits innerhalb der ersten beiden Stunden nach Injektion ein, so daß eine primäre Vermittlung durch die Induktion der Synthese von IL-1 durch TNF- α (Dinarello et al., 1986) nicht anzunehmen ist.

Diese Effekte der Zytokine TNF- α und IL-1 auf das Schlaf-Wach-Verhalten weisen starke Ähnlichkeiten mit jenen auf, die nach Endotoxin auftreten. Es ist daher anzunehmen, daß zumindest ein Teil der Schlafveränderungen nach Endotoxingabe auf die Freisetzung dieser Zytokine zurückzuführen ist.

Die Bildung von Zytokinen erfolgt nicht nur im Zusammenhang mit einer Immunantwort. In geringen Mengen sind Zytokine jederzeit im Blut und in Geweben nachweisbar, einschließlich des Gehirns. Astrozyten - spezielle Gliazellen, die an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind - exprimieren TNF- α (Breder et al., 1993; Lieberman et al., 1989). In Neuronen wurde die

mRNA von TNF- α und IL-1 β nachgewiesen (Hunt et al., 1992; Farrar et al., 1987a; Higgins & Olschowka, 1991), ebenso die Rezeptoren beider Zytokine (Farrar et al., 1987b; Takao et al., 1990; Schall et al., 1990; Kinouchi et al., 1991; Cunningham & de Souza, 1993). Diese Zytokine könnten daher nicht nur zu den Schlafveränderungen bei Infektionen sondern jederzeit zur Schlafregulation beitragen.

Umfangreich untersucht ist die Beteiligung von TNF- α und IL-1 β am spontanen Schlafverhalten und an den Schlaf-Rebound-Phänomenen nach Schlafdeprivation. Die Plasmawerte dieser Zytokine steigen während eines Schlafentzugs an (Moldofsky et al., 1986; Yamasu et al., 1992). Durch Blockade der biologischen Wirkungen von IL-1 oder TNF- α bei Kaninchen und Ratten durch die i.c.v. Verabreichung von IL-1Ra (Imeri et al., 1993), IL-1-Antikörpern (Opp & Krueger, 1994a, 1994b), Anti-TNF-Antikörpern (Takahashi et al., 1995a), Fragmenten des IL-1-Rezeptors (Takahashi et al., 1996a, 1997), des TNF-bindenden Proteins oder des löslichen TNF-R1 (Takahashi et al., 1995b, 1996c) oder die gemeinsame Verabreichung von Fragmenten des IL-1-R1 und TNF-R1 (Takahashi et al., 1999) wurde der spontane non-REM-Schlaf oder der non-REM-Schlaf-Rebound nach Schlafentzug unterdrückt. Der REM-Schlaf sowie die EEG-delta-Aktivität blieben meist unbeeinflusst. Weitgehend übereinstimmend mit diesen Befunden verbrachten auch IL-1R1- oder TNF-R1-Knock-Out-Mäuse im Vergleich zu intakten Mäusen weniger Zeit im non-REM-Schlaf (Fang et al., 1997, 1998).

Folglich erfüllen IL-1 β und TNF- α einige Kriterien, die von Borbély & Tobler (1989) und Krueger & Obál (1997) für schlafregulatorisch wirkende Substanzen aufgestellt worden sind:

- Die Verabreichung der Substanz führt zur Induktion, Zunahme oder Intensivierung des Schlafes
- Die Inaktivierung der Substanz oder ihrer Rezeptoren reduziert den spontanen Schlaf.

Um eine physiologische Rolle in der Schlafregulation wahrnehmen zu können, muß eine Substanz tageszeitlichen oder schlafabhängigen Schwankungen unterliegen; dies ist für IL-1 β und TNF- α der Fall: die zentrale oder systemische Produktion (Protein und mRNA) von TNF- α und IL-1 β nimmt während der Wachperiode bis zum Erreichen maximaler Werte zu Beginn der Schlafperiode zu und fällt während des Schlafes wieder ab (Hohagen et al., 1993; Floyd & Krueger, 1997; Bredow et al., 1997; Taishi et al., 1997). Damit sind IL-1 und TNF- α möglicherweise Ausdruck oder Bestandteil der homöostatischen Komponente S im Zweikomponentenmodell der Schlafregulation.

1.2. Clozapin

Chemisch gehört Clozapin (8-Chloro-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-5H-dibenzo[b,e][1,4]-diazepin) zu den Dibenzodiazepinen. Abb.2 zeigt die Strukturformel.

Die gelb gefärbte Verbindung ist löslich im sauren Milieu (unter pH 5) und in organischen Lösungsmitteln.

Nach Aufnahme in den Blutkreislauf wird Clozapin in der Leber, möglicherweise aber auch im Gehirn, durch Cytochrom-P450-Enzyme zu den Hauptmetaboliten N-Desmethylclozapin (Norclozapin) und Clozapin-N-Oxid abgebaut (Pirmohamed et al., 1995).

Clozapin zeigt ein umfangreiches Rezeptorbindungsprofil, so blockiert es Dopamin-, Serotonin-, muskarinische Acetylcholin- und Histamin-H₁-Rezeptoren sowie Adrenorezeptoren (siehe Tab. 3).

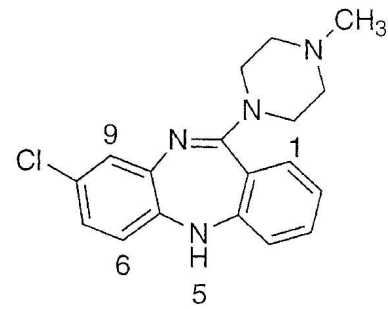


Abb. 2: Strukturformel von Clozapin

Tab. 3: Rezeptorbindungsprofil des Clozapins (Naber & Müller-Spahn, 1997)

Ligand	Rezeptortyp
Acetylcholin	M ₁ (muskarinisch)
Dopamin	D ₁ , D _{2a} , D _{2b} , D ₃ , D ₄ , D ₅
Histamin	H ₁
Serotonin	5HT _{2A} , 5HT _{2C} , 5HT ₆ , 5HT ₇
Noradrenalin/Adrenalin	α ₁ , α ₂

Auch das Abbauprodukt Norclozapin zeigt pharmakologische Wirkung, es ist ein potenter Serotonin-5HT_{2A/2C}-Rezeptorantagonist.

Außerdem erhöht Clozapin im Tierversuch die Konzentrationen von Dopamin (Bürki et al., 1974; Imperato & Angelucci, 1988), Homovanillinsäure (Bürki et al., 1974; Wiesel & Sedvall, 1975; Karoum & Egan, 1992) und Prolaktin (Meltzer et al., 1975; Gudelsky et al., 1987) im Gehirn und erhöht den Umsatz von GABA_A in der Substantia nigra (Marco et al., 1978) und im Nucleus accumbens und Globus pallidus (Marco et al., 1976).

1.3. Geschichte

Die Bezeichnung von Clozapin als 'atypisches Neuroleptikum' ist historisch bedingt. In den 50er Jahren wurde der Begriff 'Neuroleptika' für antipsychotisch wirkende Substanzen von Delay & Deniker geprägt (vgl. Dose, 1997). Die Wirkung der damals bekannten "frühen" Neuroleptika wurde auf die Gemeinsamkeit zurückgeführt, Dopaminrezeptoren postsynaptisch zu blockieren

(Carlsson, 1963). Diese 'klassischen Neuroleptika' erzeugten bei Tieren Katalepsien und antagonisierten ein Nageverhalten, das durch Apomorphingabe hervorgerufen wird. Mit diesen Tests erhielten die Forscher ein experimentelles Instrument, Substanzen im Tierversuch auf ihre antipsychotische Wirksamkeit zu prüfen. Durch Anwendung dieser Testverfahren wurden jedoch nur Wirkstoffe selektiert, die beim Menschen eine Reihe von Bewegungsstörungen, wie Pseudoparkinsonismus, Dystonien und Dyskinesien, verursachen, die unter dem Begriff 'extrapyramidal-motorisches Syndrom' zusammengefaßt werden. Trotzdem wurde die Wirksamkeit in diesen Test zum Dogma für Neuroleptika erhoben (vgl. Dose, 1997; Pajonk et al., 1997), wodurch die Arzneimittelentwicklung stark behindert wurde, wie am Beispiel des Clozapins deutlich wird.

Bereits 1958 wurde Clozapin bei der Firma Wander AG aus einem Pool von 2000 synthetisierten Substanzen zur weiteren Erforschung auserwählt. Im Tierversuch löste es keine Katalepsien aus und konnte das Apomorphin-induzierte Nagen nicht antagonisieren. Eigentlich hätte die Entdeckung eines Neuroleptikums mit nahezu keiner Potenz zur Entwicklung extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen Begeisterung auslösen müssen, stattdessen wurde der Substanz die antipsychotische Wirksamkeit abgesprochen und die Entwicklung des Medikaments nur langsam vorangetrieben. Leponex[®] kam erst 1972 auf den Markt. Der Beiname 'atypisches Neuroleptikum' war zunächst Ausdruck der allgemeinen Skepsis (Kane et al., 1988). In der Folgezeit mußten die Kritiker einsehen, daß es sich bei Clozapin um ein vollwertiges Neuroleptikum handelt, das in vielen Bereichen, z.B. der Behandlung persistierender Schizophrenien, den herkömmlichen Neuroleptika sogar überlegen ist. Einen erneuten Rückschlag erhielt das Medikament als es 1975 in Finnland zugelassen wurde: innerhalb des ersten Jahres starben acht Menschen unter Clozapin-Therapie an Agranulozytosen (Dose, 1997). Nur den enormen Bemühungen von Psychiatern und Industrievertretern ist es zu verdanken, daß Clozapin auch nach 1979 unter strikten Indikationsbeschränkungen und bei enggesteckten Blutbildkontrollen in deutschsprachigen Ländern weiter verschrieben werden durfte (Hippius, 1999). Erst zehn Jahre später wurde Clozapin unter dem Namen Clozaril[®] in den USA zugelassen. Nachdem einige amerikanische Studien veröffentlicht worden waren (Claghorn et al., 1987; Kane et al., 1988; Kane, 1992), die im übrigen keine anderen Erkenntnisse enthielten als jene, die in der deutschen Literatur schon lange bekannt waren, wurde Clozapin mit seinen positiven Eigenschaften zum »Goldstandard« der atypischen Neuroleptika erhoben (vgl. Hippius, 1999; Meltzer, 1995), auf dessen Grundlage nach Substanzen gesucht wird, die ein ähnliches Wirkprofil, aber wesentlich weniger Nebenwirkungen besitzen. Diese Suche ist aber nur dann gezielt möglich, wenn wir näheres über den bis heute ungeklärten Wirkmechanismus des Clozapins erfahren.

1.4. Theorien zur antipsychotischen Wirkung

Die Wirksamkeit der Neuroleptika bei der Behandlung der Schizophrenie wurde zunächst mit der Dopamintheorie erklärt. Demnach führt eine Überaktivität von Dopamin zu den schizophrenen Symptomen, die durch die Blockade von Dopamin-Rezeptoren durch Neuroleptika konteragiert wird. In diesem Modell ist die atypische Wirkung des Clozapins gegenüber klassischen Neuroleptika wie z.B. Haloperidol auf die Aktivität dieser Substanzen in unterschiedlichen Dopaminsystemen zurückzuführen.

Es sind drei dopaminerge Systeme im Gehirn bekannt. Beim tubero-infundibularen Dopaminsystem handelt es sich um eine Verschaltung vom Hypothalamus zur Hypophyse. Das nigrostriäre System umfaßt die Bahn von der Substantia nigra im Mittelhirn zu den Basalganglien im Nucleus caudatus, die der Abstimmung von Bewegungsabläufen dient. Im dritten Dopaminsystem projizieren die Axone von im Tegmentum (Mittelhirn) liegenden Zellkörpern zum limbischen System, insbesondere dem Nucleus accumbens und dem entorhinalen Kortex (mesolimbisches Dopaminsystem) und zum frontalen Kortex (mesocorticales Dopaminsystem). Diese Dopaminbahn ist an psychischen Prozessen, wie Emotionen, Kognition und Motivation beteiligt.

Die verschiedenen Projektionen benutzen unterschiedliche Rezeptoren. Die Dopamin-Rezeptoren D_1 und D_5 werden von Neuronen im Kortex und Hippocampus exprimiert, D_2 im Nucleus caudatus, im limbischen System (u.a. Nucleus accumbens) und im Kortex. Die Dopamin-Rezeptoren D_3 und D_4 befinden sich im limbischen System und im Kortex und nur vereinzelt in den Basalganglien.

Das atypische Neuroleptikum Clozapin bindet vornehmlich an die Dopamin-Rezeptoren D_1 (Meltzer et al., 1975) und D_4 (Seeman, 1992; Kusumi et al., 1995), blockiert also dopaminerge Synapsen hauptsächlich im mesolimbischen und mesocorticalen Dopaminsystem. Im Gegensatz dazu blockieren typische Neuroleptika am effektivsten Dopamin D_2 -Rezeptoren, erreichen also ihre therapeutische Wirksamkeit ebenfalls im mesolimbischen und mesocorticalen Dopaminsystem. Gleichzeitig hemmen sie jedoch die Dopaminaktivität im nigrostriären Dopaminsystem und verursachen damit das sogenannte extrapyramidalmotorische Syndrom.

Allerdings stellt die Reduktion sowohl der Schizophrenie als auch der Medikamentenwirkung auf den Neurotransmitter Dopamin eine Vereinfachung dar, die den wahren Zusammenhängen hinter der Krankheit und den Wirkungen der Neuroleptika nicht gerecht wird. So gibt zu denken, daß die Blockade der Dopamin-Rezeptoren wenige Stunden nach Verabreichung der Neuroleptika eintritt, die therapeutische Wirkung jedoch erst nach Wochen bis Monaten. Auch die Tatsache, daß die Patienten nicht gleichermaßen von den Dopamin-blockierenden Medikamenten profitieren, selbst wenn diese gleiche Bindungspräferenzen gegenüber den Dopamin-Rezeptoren besitzen, läßt erahnen, daß die wahren Zusammenhänge hinter der Krankheit und den Wirkungen der Neuroleptika wesentlich komplexer sind. Beispielsweise zeigt die Substanz Risperidon ein

atypisches Wirkungsprofil, bindet Dopamin-D₂-Rezeptoren jedoch gleichermaßen wie das typische Neuroleptikum Haloperidol.

Nach neueren Vorstellungen ist das Verhältnis der Rezeptorbindung an Serotonin-5HT₂- zu Dopamin-D₂-Rezeptoren für das Wirk- und Nebenwirkungsprofil eines Neuroleptikums entscheidender, als Art und Umfang der Dopamin-Rezeptorblockade. Mit wenigen Ausnahmen liegt der 5HT₂/D₂-Quotient atypischer Neuroleptika deutlich über eins, der typischer Neuroleptika unter eins. Doch auch diese Theorie bietet keine einfache Erklärung. So bindet das als atypisch eingeordnete Neuroleptikum Sulpirid überhaupt nicht an 5HT-Rezeptoren, sondern ist ein hochselektiver D₃-/D₂-Rezeptorantagonist.

Das breite Bindungsverhalten von Clozapin an den Synapsen einer Vielzahl von Neurotransmittersystemen beläßt weiteren Spielraum für das einzigartige Wirkspektrum des Clozapins, aber auch für eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen.

1.5. Nebenwirkungen von Clozapin

Nicht nur in Bezug auf das extrapyramidalmotorische Syndrom unterscheiden sich die Nebenwirkungen atypischer Neuroleptika von denen typischer Neuroleptika. Die Tab. 4 zeigt einen Überblick über häufige Begleiterscheinungen einer Clozapinbehandlung.

Tab. 4: Häufige Nebenwirkungen einer Clozapintherapie (laut Patienteninformation; Retz & Rösler, 1999; Pollmächer et al., 2000)

Begleiterscheinung
<i>Blutzellen und Immunsystem</i>
Agranulozytose, Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Eosinophilie
↑ TNF- α , lösliche TNF-R p55 und p75, lösliche IL-2-R
<i>Zentralnervöse Nebenwirkungen</i>
Sedierung
Schwindel
Epileptische Anfälle
<i>Kardiovaskuläre Nebenwirkungen</i>
Tachykardie, orthostatische Hypotonie
Hypertonie
<i>Gastrointestinale Nebenwirkungen</i>
Hypersalivation
Verstopfung, Mundtrockenheit
<i>Sonstige</i>
Gewichtszunahme

Die vermutlich auf die cholinerge Blockade im vegetativen Nervensystem zurückzuführenden kardiovaskulären und gastrointestinalen Nebenwirkungen teilt sich Clozapin mit einigen typischen Neuroleptika. Andere Nebenwirkungen wie Veränderungen im Blutbild oder epileptische Anfälle treten unter Clozapinbehandlung mit einer vielfach höheren Wahrscheinlichkeit oder, wie Sedierung und Gewichtszunahme, in bedeutend stärkerer Ausprägung auf als bei Therapie mit typischen Neuroleptika. Veränderungen humoraler Immundefaktoren, wie sie bei Clozapintherapie auftreten, wurden für das typische Neuroleptikum Haloperidol nicht gefunden (Pollmächer et al., 1997). Diese Nebenwirkungen des Clozapins werden im Folgenden gesondert erläutert.

1.5.1. EEG und Schlafverhalten unter Clozapingabe

Eine der häufigsten Nebenwirkungen von Clozapin, über die in der Literatur berichtet wird, ist die Sedierung, ca. 50 % der die Patienten fühlen sich tagsüber sehr müde (Angst et al. 1971; Baldessarini und Frankenburg, 1991; Coward 1992).

Mit gleicher Häufigkeit zeigt das Wach-EEG Clozapin-behandelter Patienten typische Veränderungen (Silvestri et al., 1998; Schuld et al., 2000; Centorrino et al., 2002). Es kommt zu einer Verlangsamung der EEG-Wellen. Bei einigen Patienten folgt dem Auftreten langsamer Wellen ein epileptischer Krampfanfall.

Über den Einfluß von Clozapin auf den Nachtschlaf von Patienten und Gesunden liegen trotz der markanten Vigilanzveränderung nur wenige, kontrollierte Studien vor. Erste bemerkenswerte Arbeiten waren die Versuche von Touyz et al. (1977, 1978), Clozapin an gesunden Probanden als Schlafmittel zu etablieren. Die akute Gabe von 25 mg Clozapin führte zu einer Vermehrung der totalen Schlafzeit und zu einer Verminderung des Tiefschlafstadiums 4 (Touyz et al., 1977). Bei Einnahme von 12,5 mg Clozapin über 15 Tage waren über den gesamten Versuchszeitraum der REM-Schlaf (vermutlich aufgrund einer Verminderung der Anzahl der REM-Schlaf-Episoden) im Vergleich zu den Kontrolltagen reduziert (Touyz et al., 1978). In beiden Studien klagten die Probanden in den ersten Tagen über eine erhöhte Müdigkeit.

Der Schlaf clozapinbehandelter Patienten wurde im Vergleich mit Gesunden (Lee et al., 2001), mit unbehandelten oder mit klassischen Neuroleptika-behandelter Schizophrenen (Wetter et al., 1996) und als Longitudinalstudien mit Baselineerhebungen (Hinze-Selch et al., 1997; Lee et al., 2001) untersucht. Alle drei Studien stellten übereinstimmend fest, daß Clozapin die Schlafeffizienz und die Schlafdauer aufgrund einer Vermehrung des non-REM-Stadiums 2 erhöhte. Die Dauer des Wachseins, die Häufigkeit der Aufwachereignisse und die Menge der Bewegungen während der Schlafphasen waren verringert. Schlafstadium 4 und der slow wave-Schlaf (Tiefschlaf) wurden durch Clozapin unterdrückt (Hinze-Selch et al., 1996). In einem Vergleich mit typischen Neuroleptika verlängerte Clozapin die REM-Latenz auf das Doppelte, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Wetter et al., 1996).

1.5.2. Clozapin und Immunsystem

Eine Agranulozytose ist mit einer Häufigkeit von maximal 1 % eine eher seltene, wenn auch lebensbedrohliche Komplikation unter Clozapintherapie (Alvir et al., 1993). Clozapin verursacht aber auch systematisch auftretende Veränderungen des Immunsystems. Untersuchungen der Immundefaktoren im Serum von Patienten ergaben erhöhte Konzentrationen von TNF- α , der löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 und der löslichen IL-2-Rezeptoren (Pollmächer et al., 1995, 1996; Hinze-Selch et al., 2000).

Mit einer Häufigkeit von bis zu 50 % entwickeln Patienten in den ersten drei Wochen einer Clozapintherapie Fieber (Blum & Mauruschat, 1972). Meist ist dieses Fieber jedoch nicht von einem Krankheitsgefühl begleitet und klingt von allein wieder ab. In der Zeit des Auftretens von Fieber ist das inflammatorische Zytokin IL-6 erhöht (Pollmächer et al., 1995; 1996).

1.5.3. Clozapin und Körpergewicht

Eine unerwünschte Begleitwirkung von Clozapin, die die Bereitschaft der Patienten, das Medikament einzunehmen, sehr negativ beeinflusst, ist eine starke Gewichtszunahme (Cohen et al., 1990; Umbricht et al., 1994). Leider entwickeln vor allem solche Patienten, die von der Clozapintherapie profitieren, einen ausgeprägten Heißhunger und nehmen rasch an Gewicht zu. Das spricht dafür, daß die Gewichtszunahme durch Eingriffe des Clozapin in zentrale Mechanismen der Gewichtsregulation verursacht wird. So korreliert der Anstieg des Körpergewichtes clozapinbehandelter Patienten mit erhöhten Serum-Leptin-Werten, einem Protein, daß für die Regulation von Appetit und Hungergefühl von Bedeutung ist (Kraus et al., 1999; Hinze-Selch et al., 2000).

1.6. Interaktionen der Clozapinwirkungen

Auf den ersten Blick scheinen die antipsychotische Wirkung einer Substanz, Schlafveränderungen, Gewichtszunahme und veränderte Immunparameter nichts miteinander gemein zu haben. Allerdings sind Zusammenhänge schon seit langer Zeit bekannt. Bereits 1887 berichtete Wagner-Jauregg von einem positiven Einfluß akuter Infektionen und experimentell induziertem Fiebers auf psychiatrische Erkrankungen (Wagner, 1887), ein Ansatz, der leider nie systematisch untersucht wurde. Über die Rolle des Immunsystems und insbesondere der Zytokine bei der Generierung oder Behandlung psychiatrischer Erkrankungen kann daher bis heute nur spekuliert werden.

Mehr bekannt ist über den Einfluß des Immunsystems auf das Schlafverhalten. Es ist auffällig, daß die Schlafveränderungen unter Clozapin denen bei schwachen Immunstimulationen ähneln (siehe Kapitel 1.1.2, Seite 4), speziell der Anstieg der non-REM-Schlafmenge Stadium 2 und die Verbesserung der Schlaffeffizienz. Unter Clozapinbehandlung kommt es wie bei leichten Infektionen zu einer moderaten Erhöhung der Serumkonzentration des schlafregulatorischen

Zytokins TNF- α (vgl. Kapitel 1.1.3, Seite 6). Es kann daher angenommen werden, daß die Veränderungen des Schlafverhaltens unter Clozapin durch eine Erhöhung von TNF- α vermittelt werden.

Desweiteren existieren Vorstellungen, daß TNF- α auch an der Entstehung der Agranulozytose einen entscheidenden Beitrag liefert. Zu den biologischen Funktionen des TNF- α zählen die Aktivierung von Zellen und die Stimulierung der Granulopoese. Stimulierte Granulozyten verstoffwechseln Clozapin jedoch über kurzlebige toxische Metabolite (Gardner et al., 1998; Williams et al., 2000). Diese Metabolite sind aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenspiel mit ungünstigen genetischen und möglicherweise weiteren Faktoren für die Entstehung der Agranulozytose verantwortlich (vgl. Pollmächer et al., 2001).

TNF- α ist als eine Substanz bekannt, die die Nahrungsaufnahme bei Nagetieren unterdrückt (Ling et al., 1997; Swiergiel et al., 1997; Kouhata et al., 2001). Andererseits induziert TNF- α die Freisetzung von Leptin (Grunfeld et al., 1996; Sarraf et al., 1997). Über diesen Weg, aber auch über direkte Aktion im Gehirn (Plata-Salamán et al., 1988) nimmt TNF- α Einfluß auf den Appetit und die Nahrungsaufnahme.

Das Immunsystem, insbesondere das TNF- α -System, kommt also als zentraler Vermittler einer Reihe von Nebenwirkungen des Clozapins in Frage, insbesondere jener, die es von den typischen Neuroleptika unterscheiden. Allerdings wurde aus der Gruppe der typischen Neuroleptika, die keine starke Sedierung und Gewichtszunahme verursachen, nur Haloperidol bezüglich seiner Wirkung auf die Zytokinfreisetzung untersucht, wobei keine Änderungen von TNF- α , dessen löslichen Rezeptoren, IL-6, den IL-1-Rezeptorantagonisten IL-1Ra und den löslichen IL-2-Rezeptor sIL-2R gefunden wurden (Kim, 1986; Rapaport et al., 1991; Pollmächer et al., 1997).

Von einigen Psychopharmaka, die gleichzeitig eine starke Gewichtszunahme und eine starke Sedierung verursachen, ist eine Einflußnahme auf TNF- α und/oder dessen lösliche Rezeptoren sTNFRp55 und sTNFRp75 bekannt. Die Tab. 5 zeigt eine Übersicht über die Wirkung von Psychopharmaka in Bezug auf Sedierung, Körpergewicht, sowie das TNF- α -System.

Tab. 5: Effekte verschiedener Psychopharmaka auf Gewicht, Vigilanz und die Plasmakonzentrationen von TNF- α und den löslichen TNF-Rezeptoren sTNFRp55 und sTNFRp75 (nach Pollmächer et al., 2000).

Substanz	Gewicht	Sedierung	TNF- α	sTNFR p55	sTNFR p75
Clozapin	↑↑↑	+++	↑	↑	↑
Amitriptylin	↑↑↑	++	↔	↑	↑
Lithium	↑↑↑	++	↑	↔	↑
Olanzapin	↑↑↑	+	↔	↑	↑
Haloperidol	↑	+	↔	↔	↔
Paroxetin	↑	+	↔	↔	↔

Es wird daher vermutet, daß ein Zusammenhang zwischen einer stark sedierenden Wirkung, erheblicher Gewichtszunahme und dem TNF- α -System besteht (Pollmächer et al., 2000). Von besonderem Interesse sind die kausalen Beziehungen dieser Wirkungen, da sich hieraus nicht nur ein größeres Wissen über Entstehung und Behandlung psychiatrischer Erkrankungen ergibt, sondern auch eine gezieltere Suche nach wirksamen Substanzen mit weniger Nebenwirkungen und vielleicht auch eine Voraussage des zu erwartenden Behandlungserfolges und des Risikos für Nebenwirkungen möglich wird. Funktionelle Zusammenhänge sind allerdings nur durch eine gezielte Beeinflussung, im speziellen Blockade einzelner Systeme zu klären, die nur im Tierversuch durchgeführt werden können. Grundvoraussetzung für die Sinnhaftigkeit eines Tierversuches ist jedoch dessen Übertragbarkeit auf den Menschen oder den Nutzen für die Veterinärmedizin. Da psychiatrische Erkrankungen bei Tieren nicht bekannt sind, ist letzter Grund nicht gegeben. Daher bleibt zunächst zu klären, ob Tiere, im speziellen Ratten, in Bezug auf den Schlaf, die Futteraufnahme und das TNF- α -System in vergleichbarer Weise auf Clozapin reagieren wie der Mensch.

1.7. Clozapin im Tierversuch

Obwohl Clozapin als Medikament zugelassen ist und daher im Tierversuch getestet worden sein muß, sind erstaunlich wenige Tierstudien vor allem bezüglich oben erwähnter Nebenwirkungen des Clozapins veröffentlicht worden. Insbesondere Daten über den Einfluß einer Clozapinbehandlung auf Zytokine und Immunfunktionen existieren nicht. Lediglich eine von Rolsten et al. (1979) durchgeführte Studie schenkt dem hämatopoetrischen System Beachtung und stellt bei Langzeitbehandlung alternder Mäuse mit Clozapin eine verminderte Leukozytenzahl fest.

Clozapininduziertes Fieber konnte bisher in Tierstudien nicht beobachtet werden. Konsistent wird stattdessen von einem kurzzeitigen Abfall der Körpertemperatur männlicher Laborratten und -mäuse nach Clozapingabe berichtet (Menon et al., 1988; Salmi et al., 1994; Millan et al., 1995; Salmi & Ahlenius, 1996; Oerther & Ahlenius, 2000). In einer Studie wurde auch bei Patienten ein Absinken der Körpertemperatur um 0,1 K im Vergleich zu einem Zeitraum vor und nach Clozapingabe festgestellt (Heh et al., 1988). Doch konnten die Ergebnisse dieser sehr systematisch in Bezug auf Temperaturveränderungen unter Neuroleptika-Behandlung durchgeführten Untersuchung in keiner anderen Studie bestätigt werden.

Die Tierdaten bezüglich der Körpertemperatur unterliegen dem Nachteil, punktuell mit Meßfühlern erhoben worden zu sein, die den Ratten in das Rektum (Mastdarm) eingeführt werden, was für die Tiere eine Stresssituation darstellt. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß eine verminderte Temperatur unter diesen Bedingungen Ausdruck einer verbesserten Stressbewältigung darstellt. Anxiolytische Eigenschaften des Clozapins sind bereits seit längerem

bekannt (Shopsin et al., 1979; Griebel, 1995; Rex et al., 1998). Es existieren keine Daten über die Körpertemperatur von Tieren unter Verwendung streßfreier Meßmethoden oder bei chronischer Gabe von Clozapin.

Die Effekte von Clozapin auf den Tierschlaf wurden in zwei Studien an Ratten untersucht. Clozapin wurde in akut-Versuchen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Ruheperiode verabreicht, die Wirkungen auf den Schlaf in den folgenden Stunden waren dosisabhängig. Die geringe Dosis von 0,3 mg/kg s.c. verlängerte die totale Schlafzeit und die non-REM-Schlafdauer (Spierings et al., 1977). Ab einer Dosis von 1 mg/kg Körpermasse s.c. (bis max 40 mg/kg täglich) unterdrückte Clozapin den REM-Schlaf (Spierings et al., 1977; Ongini et al., 1993). Ongini et al. (1993) konnten dies auf eine Verminderung der Anzahl der REM-Episoden, eine Verkürzung der Dauer der REM-Episoden und eine Verlängerung der REM-Latenz zurückführen.

Bei chronischer Gabe von s.c. 2 x 20 mg/kg Clozapin täglich fanden Spierings et al. (1977) eine Vermehrung des non-REM-Schlafes. Allerdings ist dieser Befund nicht mit den anderen Ergebnissen vergleichbar, da Aufnahmezeitraum und Injektionszeitpunkt der Droge stark voneinander abweichen.

Bei einer Studie an Katzen führten 5 mg/kg Clozapin zu einer Unterdrückung des non-REM- und REM-Schlafes und zu einem Anstieg von Wach- und Döszuständen (Scorungskriterien nach Serman et al., 1965). In den folgenden Tagen kam es zunächst zu einem kompensatorischen Anstieg des REM- und danach des non-REM-Schlafes (Susic et al., 1977).

Keine der Studien berücksichtigte eine Spektralanalyse oder ermöglicht einen Vergleich akuter und chronischer Effekte von Clozapin auf den Tierschlaf. Zudem ist aufgrund der meist relativ kurzen Aufnahmezeiträume eine selektive Erfassung nur eines Teiles der Effekte von Clozapin nicht ausgeschlossen. Das Kriterium von Spierings et al. (1977), hohe Amplituden im EEG gepaart mit einem hochamplitudigen EMG als non-REM-Schlaf zu deklarieren, entspricht einem eher ungewöhnlichen Scorungsstandard und mindert möglicherweise den Wert dieser Studie.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung bei Langzeitbehandlung mit Clozapin existiert bei Laborratten ein altersabhängiger Geschlechtsdimorphismus: Männliche Laborratten und Nestjunge nehmen dosisabhängig weniger an Körpermasse zu, als Placebo-behandelte, gleichgeschlechtliche Kontrollgruppen, während bei weiblichen Laborratten keine Gewichtsveränderungen auftreten (Cuomo et al., 1983; Rupniak et al., 1985; Nylander & Terenius, 1986; Baptista et al., 1993; Schmitt et al., 1999). Über die Ursachen ist wenig bekannt. Baptista et al. (1993) bestimmten eine verminderte Futteraufnahme bei männlichen Tieren und führten dies auf eine toxische Wirkung von Clozapin zurück. Salamone et al. (1996) fanden ebenfalls eine Verringerung der Futteraufnahme und machten hierfür den sedierenden Effekt von Clozapin verantwortlich. Zudem tranken die Versuchstiere in einer Studie von Schmitt et al. (1999) bei oraler Gabe von Clozapin über das Trinkwasser signifikant weniger als die gleichaltrige Vergleichsgruppe. Unklar bleibt, ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung des Clozapins handelt oder ob die Tiere das Wasser

aufgrund einer eventuell toxischen Wirkung des Clozapins mieden. Eine gleichzeitige Erhebung von Daten zu Freß- und Trinkverhalten sowie Aktivität der Versuchstiere würde tiefere Einblicke in diese Zusammenhänge gestatten.

Die lokomotorische Aktivität gilt zudem als Marker für die therapeutische Wirkung anti-psychotischer Medikamente im Tierexperiment (Ögren, 1996; Schmitt et al., 1999). Aus der Literatur ist bekannt, daß die akute Gabe von Clozapin dosisabhängig die lokomotorische Aktivität von Ratten verringert (Bardgett et al., 1998). Bei chronischer Verabreichung verändert sich die Lokomotorik von Ratten im open field (Fischer et al., 1998; Schmitt et al., 1999). Bei diesen Versuchen wurden die Ratten für die lokomotorischen Tests aus ihren vertrauten Käfigen genommen und kurzzeitig in eine fremde Umgebung gebracht. Daten über die längerfristige und spontane Lokomotion von Tiere unter Clozapinbehandlung existieren nicht.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Datenlage zur Wirkung des Clozapins im Tierversuch vor allem in Bezug auf das Spontanverhalten zu verbessern und einige der von Patienten bekannten Wirkungen bzw. Nebenwirkungen des Clozapin an dem Labortier Ratte nachzuvollziehen. Dies hatte den Hintergrund, die Ratte als Modelltier für Untersuchungen der Interaktionen zwischen Psychopharmaka, Schlaf und Immunsystem zu etablieren.

Dazu wurden Versuche mit folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- Einfluß einer akuten und subchronischen Behandlung mit Clozapin auf den Schlaf der Ratte während der zwölfstündigen Ruhephase unter Berücksichtigung der Vigilanzstadien, der Schlafarchitektur, der Aktivität langsamer Wellen im EEG des non-REM-Schlafes und der Gehirntemperatur,
- Veränderungen der Futter- und Wasseraufnahme, lokomotorischen Aktivität und Körpertemperatur von Ratten über 24 Stunden nach akuter und subchronischer Verabreichung von Clozapin unter Überwachung der Gewichtsentwicklung,
- Einfluß der akuten und subchronischen Gabe des Neuroleptikums Clozapin auf die Serumkonzentrationen von Leptin und auf die Konzentrationen des Zytokins TNF- α im Serum und im Gehirn der Ratte,
- Bestimmung der Serumkonzentration von Clozapin und seines Hauptmetaboliten Norclozapin nach akuter und subchronischer Applikation bei der Ratte.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Verwendung fanden männliche Wistarratten (Charles River, Deutschland), die unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 21 ± 2 °C, Luftfeuchtigkeit 50 - 70 %, Beleuchtungsstärke 60 - 90 lux) und einem 12/12 Licht/Dunkel-Rhythmus zunächst in Gruppen zu drei oder vier Tieren bei Standarddiät (Altromin® 1324) und Wasser ad libitum gehalten wurden.

Die Operationen wurden frühestens am dritten Tag nach Ankunft der Ratten durchgeführt. Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt.

Die Ratten wurden täglich aus den Käfigen genommen, mehrfach hochgehoben und gestreichelt und an die Handhabung bei einer Injektion (Einwickeln in ein Tuch) gewöhnt. Dieses Verfahren diente dazu, die Tiere an den Kontakt zu dem Menschen zu gewöhnen, um die Versuche streßarm durchführen zu können.

2.2. Pharmakon

Da Clozapin wasserunlöslich ist, wurde für die intraperitoneale Verabreichung auf die handelsübliche Leponex®-Injektionslösung (Novartis, Deutschland) zurückgegriffen. Die Bestandteile waren pro 2 ml: 50 mg Clozapin, Butylhydroxyanisol, Laurinsäure und mittelkettige Triglyceride. Als Vehikel diente das wirkstofffreie Lösungsmittel des Präparates. Die Rezeptur und die Chemikalien zur Herstellung des Lösungsmittels wurden freundlicherweise von Novartis zur Verfügung gestellt. Das Lösungsmittel, im Folgenden Vehikel genannt, enthielt folgende Komponenten: Butylhydroxyanisol, Laurinsäure und mittelkettige Triglyceride. Das Vehikel wurde von der Apotheke des Schwabinger Krankenhauses München zubereitet und sterilisiert. Für die niedrige Dosierung wurde die Leponex®-Injektionslösung mit dem Vehikel verdünnt (2 Teile Vehikel auf ein Teil Leponex®-Injektionslösung), so daß die Tiere aller Konditionen in Relation zum Körpergewicht das gleiche Injektionsvolumen erhielten (30 µl / 100 g).

2.3. Ableitung von EEG, EMG und Gehirntemperatur

2.3.1. Operation

Die Operationen wurden am dritten bis fünften Tag nach Ankunft der Tiere durchgeführt. Unter tiefer Isofluran-Narkose wurden die Tiere in einen Stereotaxen eingespannt. Die Kalotte wurde freigelegt, um Elektroden zur Ableitung des EEGs und EMGs sowie einen Thermistor zur Messung der Gehirntemperatur zu implantieren. Dazu wurden mit einem Zahnarztbohrer Löcher für die EEG-Elektroden sowie eine der Stabilisierung dienende Stahlschraube (Z in Abb. 3) und eine Rinne für den Thermistor in die Schädeldecke gebohrt. Die Bohrungen erfolgten +3.9 mm

rostral sowie ± 2 mm lateral zum Bregma (Paxinos & Watson, 1982) und - 6.4 mm kaudal sowie ± 4.0 mm lateral zum Bregma (Abb. 3). Als Ableitelektroden dienten stumpfe Stahlschrauben (V2A, \varnothing 1.2 mm, Länge 3.4 mm), die derart in den Bohrungen verankert wurden, daß die stumpfen Enden der Dura auflagen.

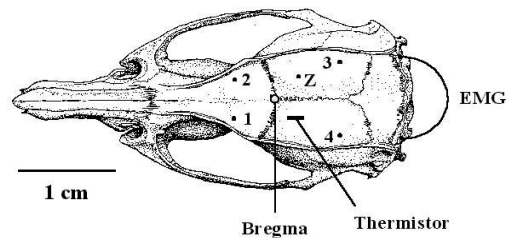


Abb. 3: Position der Elektroden zur Ableitung des Elektroencephalogramms (1-4), des Elektromyogramms (EMG), des Thermistors und der Zusatzschraube (Z) (verändert nach Schiffelholz, 1998).

Für die Ableitung des EMGs wurden zwei Stahlschrauben am Hinterkopf implantiert. Dazu mußten stumpfe Risse in die Halsmuskulatur eingebracht werden. Die Rinne für den Thermistor (Typ 10K3MCD1, Beta Therm, Galway, Irland) wurde linksseitig zwischen der vorderen und hinteren EEG-Elektrode gebohrt, in die der Thermistor gelegt und mit Knochenwachs fixiert wurde. Thermistor sowie EEG- und EMG-Schrauben waren über Golddrähte bzw. isolierte Stahldrähte mit einer Buchse verbunden (Abb. 4), die dem Anschluß des Kabels diente. Der Aufbau wurde mit Palladur (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) auf der Kalotte fixiert und isoliert. Die Operationswunde wurde gereinigt, desinfiziert und vernäht.

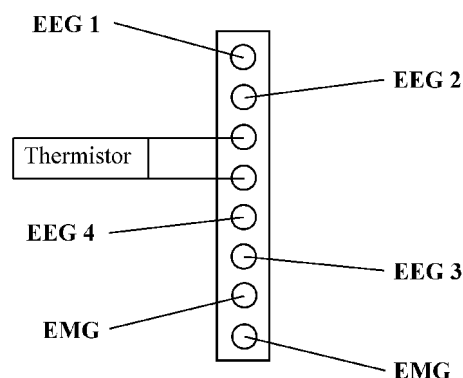


Abb. 4: Schema der Buchse und Belegung der Kontakte mit Ableitungen vom EEG, EMG und Thermistor.

Mit den Versuchen wurde fünf Wochen nach der Operation begonnen. Zuvor erhielten die Ratten mindestens drei Tage, um sich an die Versuchsbedingungen (Ableitekäfige mit Kabel) zu gewöhnen.

2.3.2. EEG-Ableitungen

Die Ratten wurden in nach oben offene Plexiglaskäfige eingesetzt und mit der Buchse an ein drehbares, federnd gelagertes Kabel angeschlossen, das es ihnen ermöglichte, sich nahezu uneingeschränkt zu bewegen (Abb. 5). Das Kabel wurde mit der Aufnahmeeinheit verbunden.

Die Versuche wurden in einem Faraday-Käfig in einer temperaturkontrollierten, licht- und schallgeschützten Versuchskammer durchgeführt. Es standen zwei derartige Kammern zur Verfügung, in der einen konnten vier, in der anderen zwei Tiere gleichzeitig abgeleitet werden.



Abb. 5: Ratte im Aufnahmekäfig mit federnd gelagertem Kabel auf dem Kopf.

(Foto A. Langebartels)

Es wurden zwei EEG-Kanäle und ein EMG-Kanal aufgezeichnet, EEG-Kanal 1 wurde rostrocaudal contralateral (1 gegen 3) und EEG-Kanal 2 rostrocaudal ipsilateral (2 gegen 3) abgeleitet. Elektrode 4 diente der Erdung (Abb. 3). Die EEG-Signale wurde 25 000-fach verstärkt und gefiltert (Hochpaßfilter, Burr Braun, 0,3 Hz und Tiefpaßfilter, Burr Braun, 29 Hz, Dämpfung 49 dB/Oktave). Die Aktivität der Nackenmuskulatur wurde als Spannungspotential zwischen den beiden EMG-Elektroden abgegriffen, 50-fach verstärkt, gefiltert (Hochpaßfilter 16 Hz und Tiefpaßfilter 3000 Hz, 6 dB/Oktave), gleichgerichtet und als Integral dargestellt. Die Muskelaktivität diente in dieser Form als Scoringhilfe, insbesondere zur Unterscheidung der Vigilanzstadien Wach und REM.

EEG und EMG wurden mit einer Rate von 64 Hz abgetastet. Während der EEG-Aufnahmen führte das Aufzeichnungsprogramm über 2-Sekunden-Abschnitte jedes EEG-Kanals eine Spektralanalyse in Form einer Fast-Fourier-Transformation durch. Die Spektralanalyse erfolgte von 0,5 bis 25 Hz in 0,5 Hz-Schritten. Die Werte wurden über 10-Sekunden-Epochen gemittelt.

2.3.3. EEG-Auswertung

Die Auswertung der EEG-Daten erfolgte mit dem Vigilanzprogramm EGERA Vigilanz 2.2x (S.E.A.). Den EEG-Daten wurden visuell in 10-Sekunden-Epochen die Vigilanzstadien Wach, non-REM, pre-REM und REM zugeordnet (sogenanntes *scoren*). Das Programm gestattete es, dem Vigilanzstadium ein positives oder negatives Vorzeichen zu geben. Dadurch war es möglich, für die Berechnung des Anteils der einzelnen Stadien alle gleichbeträglich gescorten Epochen einzubeziehen, für die Spektralanalyse dagegen nur solche Epochen zu berücksichtigen, die frei von Artefakten oder Übergängen zwischen den Vigilanzstadien waren (sprich, die mit einem **** gescort waren).

Vigilanzstadium Wach ist gekennzeichnet durch niedrige Amplituden im EEG und hohe, unregelmäßige Ausschläge im EMG der Nackenmuskulatur (Abb. 6a). Im non-REM-Schlaf ist die Muskelaktivität (EMG) niedrig, während die Amplitudenhöhe im EEG ansteigt. Charakteristisch für non-REM-Schlaf sind spindelförmige EEG-Signale an- und abschwelliger Amplitude im sigma-Frequenzbereich von 12 - 16 Hz und einer Dauer von bis zu zwei Sekunden (sogenannte Spindeln). Mit zunehmender Schlafdauer treten Wellen hoher Amplitude, die sogenannten langsamen Wellen, im delta-Frequenzbereich von 0,5 - 4 Hz, (= *slow waves*, Abb. 6b). Mit zunehmender non-REM-Schlafdauer tritt ein Vigilanzstadium auf, das im Ratten-EEG das Auftreten von REM-Schlaf ankündigt. Daher erhielt dieses Stadium die Bezeichnung pre-REM-Schlaf. Häufig wachen die Ratten aus diesem Stadium auf. Das EEG zeigt während des pre-REM-Schlafes gleichmäßig hochamplitudige Wellen, die durch Theta-Rhythmen (6- 9 Hz) unterbrochen sein können (Gandolfo et al., 1994). Das EMG bleibt flach (Abb. 6c). REM-Schlaf (Abb. 6d) zeichnet sich durch ein niedrigamplitudiges EEG mit einem gleichmäßigen theta-Rhythmus (4 - 7 Hz) aus. EMG-Aktivität ist nicht vorhanden oder beschränkt sich auf kleine, charakteristische Zucken (*twitches*) (Scorungskriterien siehe Neckelmann und Ursin, 1993).

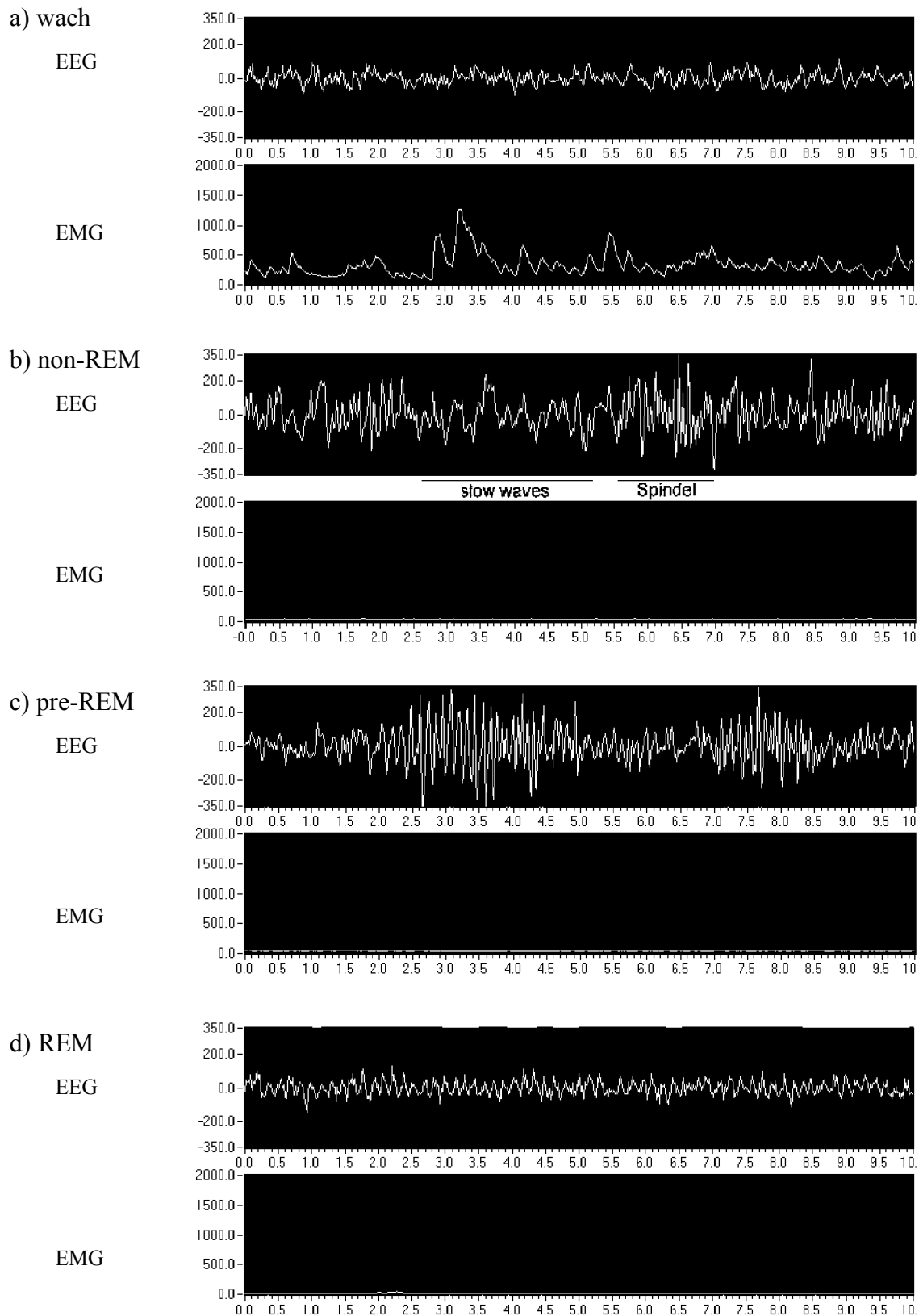


Abb. 6: EEG-Beispiele der Ratte für die Vigilanzstadien a) Wach, b) non-REM, c) pre-REM und d) REM. Die obere Spur zeigt jeweils 10 Sekunden EEG in μV , die untere das zugehörige, integrierte EMG in mV.

Wistarratten neigen außerdem zu Absence-Epilepsien. Dabei handelt es sich um hochamplitudige Spike-Wave-Muster im EEG, die nicht von Krämpfen begleitet werden, jedoch mit einem Verharren in der Bewegung einhergehen (Abb. 7).

Ausgelöst durch die Behandlung mit Clozapin wurden auch atypische Signale beobachtet, bei denen spindelähnliche non-REM-artige Signale in den EEG-Kanälen von hoher, oftmals myoklonieartiger EMG-Aktivität begleitet wurden (Abb. 7, siehe auch Ergebnisse S.43).

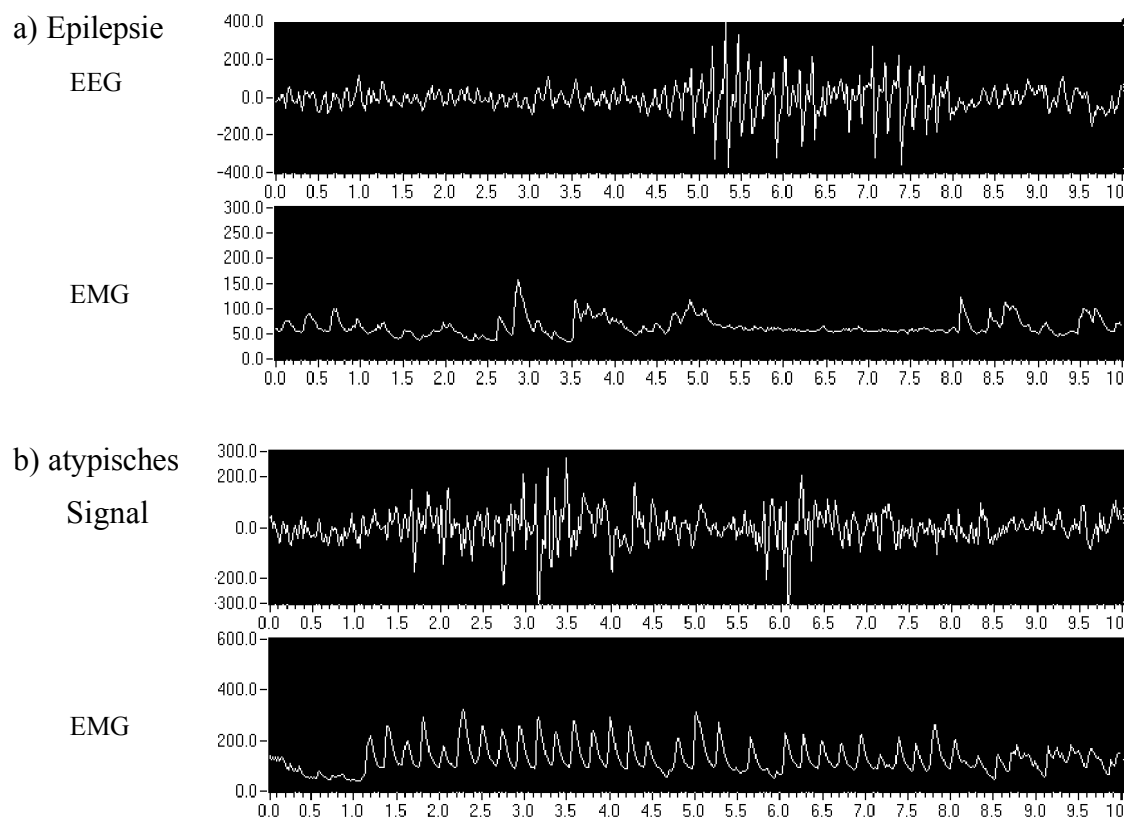


Abb. 7: EEG-Beispiele der Ratte für die Sonderstadien a) Absence Epilepsie und b) untypische Wachsignale. Die obere Spur zeigt jeweils 10 Sekunden EEG in μV , die untere das zugehörige, integrierte EMG in mV. Absence Epilepsie ist gekennzeichnet durch ein typisches spike-wave Muster während dessen die Muskelaktivität zum Erliegen kommt.

Die Clozapin-induzierten Signale sind im EEG hochamplitudig wie während non-REM-Schlaf und im EMG von Zuckungen begleitet.

Absence-Epilepsien und atypische Signale wurden als eigenständige Stadien erfaßt, für die Berechnung der Verteilung der Vigilanzstadien aber Stadium Wach zugeordnet.

Da keine Unterschiede zwischen den Kontrolltagen (Verabreichung von Saline versus Verabreichung von Vehikel) auftraten, wird im Folgenden als Vergleich nur der Tag herangezogen, an dem Vehikel verabreicht wurde. Dieser Tag wird nachfolgend als Placebotag bezeichnet.

Für die statistische Auswertung wurde für jedes Tier der prozentuale Anteil der Vigilanzstadien für 2-h-Blöcke berechnet. Diese 2-h-Werte wurden auf den prozentualen 12-h-Mittelwert des Vigilanzstadiums aller Tiere der entsprechenden Gruppe am Placebotag normiert.

Aufgrund technischer Probleme mit den Thermistoren wiesen die Daten der Gehirntemperatur der Tiere bereits an den Kontrolltagen im Vergleich untereinander große Unterschiede auf. Daher wurde auf die Verwendung von Absolutwerten verzichtet und stattdessen Temperaturdifferenzen zur Durchschnittstemperatur am Placebotag betrachtet. Es wurde die durchschnittliche Gehirntemperatur jedes Tieres am Placebotag (12 Stunden) ermittelt. Von jedem Zeitintervall (Zweistundenmittelwert) wurde der 12-h-Mittelwert des Placebotages abgezogen. Die Differenzen wurden statistisch ausgewertet.

Die Latenzen für den Eintritt des non-REM- und REM-Schlafes wurden willkürlich als die Zeit bis zur zwanzigsten non-REM-Epoche bzw. bis zur dritten REM-Epoche festgelegt.

Es wurden außerdem für jedes Tier für den 12-h-Aufnahmezeitraum eines jeden Versuchstages die Anzahl und durchschnittliche Dauer der non-REM-Schlaf- und REM-Schlaf-Episoden ermittelt und auf den Gruppendurchschnittswert am Placebotag normiert. Diese Werte dienen einer Aussage über die Fragmentierung des Schlafes.

Aus der Fast-Fourier-Transformation wurde die Aktivität langsamer Wellen (slow wave activity = SWA), also die EEG-Leistungsdichte der Frequenzen zwischen 0,5 und 4 Hz, während des non-REM-Schlafes für jedes 2-Stundenintervall berechnet. Die SWA wurde normiert, da die Absolutwerte der SWA im allgemeinen große interindividuelle Unterschiede aufweisen. Zur Normierung wurden die 2-Stundenwerte als Prozent des 12-Stundenmittelwertes des Tieres am Placebotag ausgedrückt. Für die statistische Analyse wurde der dekadische Logarithmus dieser Werte gebildet, da andernfalls hochfrequente Wellen mit hohen Amplituden zu stark gewichtet würden.

2.3.4. *Versuchsdesign*

Der Versuch bestand aus zehn aufeinanderfolgenden Tagen, während derer die Ratten zu Beginn der Lichtperiode eine intraperitoneale Injektion erhielten (siehe Abb. 8). Die ersten beiden Tage dienten als Kontrolltage. Am ersten Tag wurde den Ratten 0,9 %ige NaCl-Lösung injiziert, am zweiten Tag wurde Vehikel verabreicht, um zu prüfen, ob die Bestandteile des Lösungsmittels einen Einfluß auf das Schlaf-Wach-Verhalten ausüben.

An den darauffolgenden acht Tagen erhielten die Ratten entweder weiterhin Vehikel oder Clozapin in den Dosierungen 2,5 oder 7,5 mg/kg Körpergewicht injiziert (Behandlungstage). Am letzten Behandlungstag wurden die Tiere sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase dekapitiert (Abb. 8). Das Blut der Tiere wurde aufgefangen, gekühlt und nach dem Gerinnen 10 min zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und in Stickstoff eingefroren. Die Gehirne wurden auf einer gekühlten Unterlage in die Regionen frontaler Kortex, Neokortex, Amygdala, Hippocampus,

Thalamus mit Mittelhirn, Hypothalamus und Cerebellum zerlegt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Tötungsblut und Gehirnregionen wurden bis zu weiteren Untersuchungen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert.

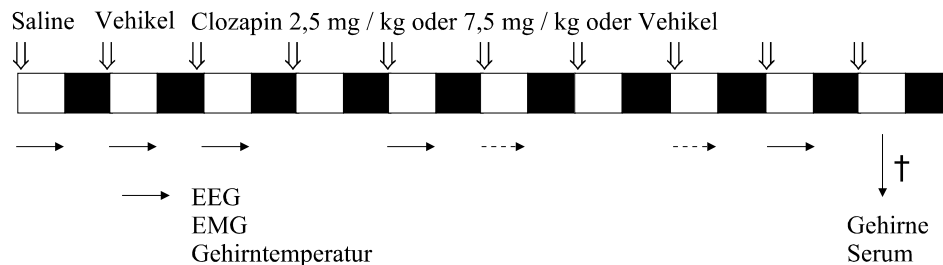


Abb. 8: Schema des Versuchsablaufes zur Aufzeichnung der Polysomnographie.

Gestrichelte Pfeile verdeutlichen Versuchstage, deren Aufzeichnungen nicht ausgewertet wurden. Am letzten Behandlungstag wurden die Ratten sechs Stunden nach Injektion dekapitiert.

Am Tag vor Versuchsbeginn, sowie am vierten und siebten Versuchstag (=zweiter und fünfter Behandlungstag) wurden sechs Stunden nach Licht an die Käfige der Tiere gereinigt. Die Ratten wurden gewogen und falls erforderlich Dosiskorrekturen vorgenommen.

Die Gruppenstärke betrug $n = 8$, die Tiere hatten am Tag vor Versuchsbeginn ein Gewicht zwischen 280 - 470 g. Die Schlafaufzeichnung wurde direkt nach Injektion an beiden Kontrolltagen und am ersten, dritten, vierten, sechsten und siebten Behandlungstag für die gesamte Dauer der Lichtphase (12 h) gestartet. Ausgewertet wurden beide Kontrolltage sowie der erste, dritte und siebte Behandlungstag (siehe Abb. 8). Bei technischen Problemen während der Schlafableitung konnte in der Auswertung der dritte Behandlungstag durch den vierten (1 Tier) und der siebte Behandlungstag durch den sechsten (4 Tiere) ersetzt werden.

2.3.5. Statistik

Die statistische Evaluierung der Daten erfolgte über eine Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA) für die einzelnen Behandlungstage mit dem interindividuellen Faktor Gruppe (Vehikel, 2.5 oder 7.5 mg/kg Clozapin) und dem intraindividuellen Faktor Zeit (sechs 2-Stundenintervalle). Bei Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurden Tests mit Kontrasten durchgeführt (Tukey Test). Aufgrund eines biphasischen Verlaufes der Reaktion auf Clozapin wurde am ersten Behandlungstag zusätzlich eine ANOVA über die normierten 12-Stundenmittelwerte der Gruppen durchgeführt.

2.4. Registrierung von Aktivität, Körpertemperatur, Futter- und Wasseraufnahme

2.4.1. Implantation eines Bauchsenders

Die Operationen wurden in der zweiten oder dritten Woche nach Ankunft der Tiere durchgeführt. Unter tiefer Isofluran-Narkose wurde das Abdomen der Ratten in Höhe des Bauchnabels rasiert und unter sterilen Bedingungen die Bauchdecke und anschließend das Peritoneum eröffnet. Ein batteriebetriebener Sender (TA.F540; Data Sciences International) wurde lateral in die Bauchhöhle eingeführt, anschließend Peritoneum und Bauchdecke separat vernäht. Die Sterilität des Senders wurde gewährleistet, indem dieser 45 min in 1 %-iger Benzalkoniumchloridlösung oberflächensterilisiert wurde, anschließend zweimal in steriler Saline gespült und bis zur Implantation mindestens 30 min in steriler Saline gelagert wurde. Nach der Operation erhielten die Tiere mindestens vier Tage, um sich von der Operation zu erholen und anschließend mindestens eine Woche, um sich an die Versuchsanordnung zu gewöhnen.

2.4.2. Versuchsanordnung

Die Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität wurden radiotelemetrisch mit dem Dataquest IV System (Data Science International, St. Paul, USA) erfaßt. Zur Ermittlung der Körpertemperatur sendete der den Tieren in den Bauchraum implantierter Sender alle drei Minuten ein Signal an einen unter dem Käfig befindlichen Receiver (Abb. 9). Die Frequenz des Signals war proportional zur Körpertemperatur.

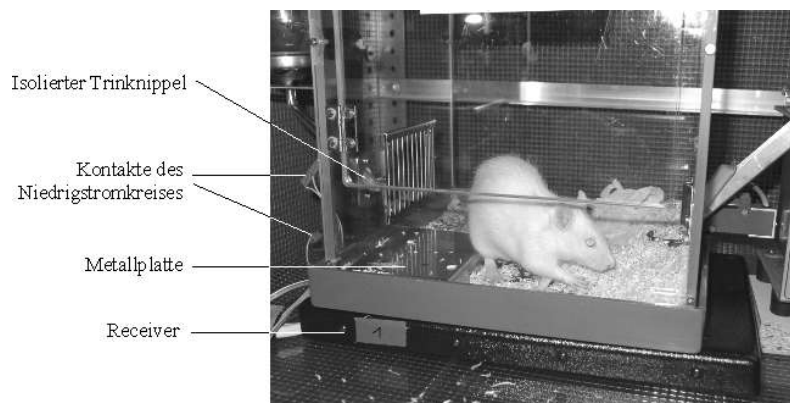


Abb. 9: Ratte in der Versuchsanordnung. Rechts Food Dispenser, links Wasserflasche mit Lick-Sensor. Berührt die Ratte Metallplatte und Trinknippel gleichzeitig, schließt sie einen Niedrigstromkreis.

Die lokomotorische Aktivität wurde mit willkürlicher Einheit ausgedrückt. Die Messung erfolgte aus die Stärke eines Signals, daß bei Bewegungen der Ratten in ihren Käfigen modifiziert wurde. Änderungen der Signalstärke erzeugten digitale Impulse, die vom Dataquest IV System gezählt wurden. Ab einer Lokalisationsänderung von mehr als 1 cm/s hing die Anzahl der

generierten Impulse zuverlässig von der von den Tieren zurückgelegten Wegstrecke ab. Die lokomotorische Aktivität wurde in 3-min-Intervallen zusammengefaßt. Alle von dem Dataquest IV System erfaßten bzw. gezählten Signale wurden in einen IBM Computer übertragen und von einer zum System gehörenden speziellen Erfassungssoftware berechnet.

Zur Bestimmung der Futteraufnahme wurden die Käfige der Ratten mit Futterautomaten (Lafayette Instruments, Lafayette, IN, USA) ausgerüstet (Abb. 10). Durch Drücken einer Taste erhielten die Ratten normierte Pellets (45 mg, Bilaney, Kent, UK). Die Rate des Tastendrucks wurde in counts / 3 min aufgezeichnet. Den Ratten wurde mindestens eine Woche Zeit zum Erkennen des Zusammenhanges zwischen Tastendruck und Futterversorgung und zur Gewöhnung an die Versuchsbedingungen zur Verfügung gestellt. Bis auf wenige Ausnahmen erlernten die Tiere die Bedienung der Futterautomaten bereits während der ersten Aktivitätsphase nach Einsetzen in die Versuchsanordnung innerhalb von vier bis zehn Stunden.

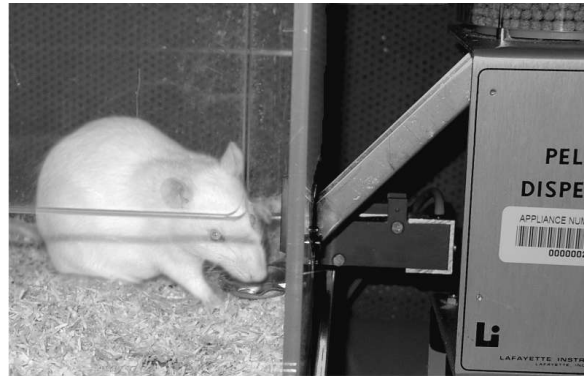


Abb. 10: Ratte beim Bedienen des Futterautomaten.

Zur Erfassung der Leckrate wurden die Wasserflaschen mit lick-Sensoren ausgerüstet (Data Sciences International). Das Sensorsystem war einerseits mit dem Trinknippel der Wasserflasche und andererseits mit einer Metallplatte verbunden, die sich unterhalb der Wasserflasche im Käfig befand (Abb. 9). Um zu trinken, mußte das Tier diese Metallplatte betreten. Nun schloß jede Berührung der Ratte an der Trinkkugel des Nippels (andere Teile des Nippels waren isoliert) einen Niedrigstromkreis und wurde als Impuls vom Dataquest IV System erfaßt und gezählt. Die Leckrate wurde in licks / 3 min aufgezeichnet.

Das verwendete Setup erlaubte die gleichzeitige Überwachung von sechs Tieren.

2.4.3. *Versuchsablauf*

Der Versuchsablauf entsprach dem für die Aufzeichnung der Schlafableitung. An zehn aufeinanderfolgenden Tagen erhielten die Ratten zu Beginn der Lichtperiode eine intraperitoneale Injektion. An den ersten beiden Tage Kontrolltage wurde 0,9 %ige NaCl-Lösung und Vehikel verabreicht, um den Einfluß der Bestandteile des Lösungsmittels auf das Verhalten zu prüfen.

An den darauffolgenden acht Behandlungstagen erhielten die Ratten entweder Vehikel oder Clozapin in den Dosierungen 2,5 oder 7,5 mg/kg Körpergewicht. Am letzten Versuchstag wurden die Tiere sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase dekapitiert (Abb. 2). Tötungsblut und Gehirne wurden für weitere Untersuchungen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff verwahrt.

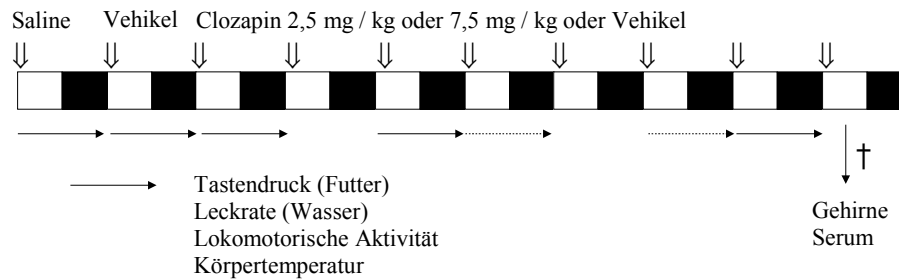


Abb. 11: Schema des Versuchsablaufes zur Aufzeichnung von Verhaltensparametern.

Zur Überwachung der Gewichtsentwicklung wurden die Tiere vor dem Versuch (und vor der Operation) in regelmäßigen Abständen (alle drei Tage) sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase gewogen, um eine Vorstellung von der normalen Massenentwicklung bei männlichen Ratten zu erhalten. Am Tag vor Versuchsbeginn, sowie am vierten und siebten Versuchstag (=zweiter und fünfter Behandlungstag) wurden die Ratten sechs Stunden nach Licht an und am letzten Versuchstag vier Stunden nach Licht an (zwei Stunden vor dem Tötungszeitpunkt) gewogen.

Die Aufnahme von Aktivität und Nahrungsaufnahme wurde nach Einsetzen der Tiere in die Versuchsapparatur gestartet. Anhand der Aufzeichnungen konnte der Eingewöhnungserfolg geprüft werden. Ausgewertet wurden die Kontrolltage und der erste, dritte und siebte Behandlungstag (Abb. 11). Bei technischen Problemen wurde der dritte Behandlungstag durch den vierten und der siebte Behandlungstag durch den sechsten ersetzt. Die Behandlungsgruppen bestanden aus je 7 Tieren für Vehikel und 2,5 mg/kg Clozapin und 8 Tieren für 7,5 mg/kg Clozapin. Die Körpermassen der Tiere lagen am Tag vor Versuchsbeginn zwischen 250 - 365 g.

2.4.4. Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Daten folgendermaßen aufbereitet:

Körpertemperatur: Die Meßwerte wurden für jedes Tier zu Zweistundenmittelwerten zusammengefaßt. Anschließend wurde die Differenz aus den Zweistundenmittelwerten und der Durchschnittstemperatur des entsprechenden Tieres über 24 h am Placebotag ermittelt. Diese Differenzen flossen in die statistische Auswertung.

Lokomotorische Aktivität: Es wurden aus den Daten jeden einzelnen Tieres Vierstundenmittelwerte berechnet und diese auf den 24-h-Mittelwert der Gruppe des Tieres am Placebotag normiert.

Futter- und Wasseraufnahme: Es wurden die Summen für vier Stunden der aufgezeichneten Werte eines jeden Tieres gebildet und diese auf den Mittelwert der Summen aller Tiere einer Gruppe über 24 h am Placebotag normiert.

2.4.5. Statistik

Für die statistische Bewertung der Daten wurde eine Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA) für die einzelnen Behandlungstage mit dem interindividuellen Faktor Gruppe (Vehikel, 2.5 oder 7.5 mg/kg Clozapin) und dem intraindividuellen Faktor Zeit (sechs 4-Stundenintervalle) durchgeführt. Bei Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurden Tests mit Kontrasten durchgeführt (Tukey Test).

2.5. Konzentrationen von Clozapin und seinem Abbauprodukt Norclozapin

Die Bestimmung von Clozapin und seinem Abbauprodukt Norclozapin (Desmethylclozapin) wurde freundlicherweise von der Klinischen Chemie, Arbeitsgruppe Dr. Uhr, Max-Planck-Institut für Psychiatrie München, durchgeführt.

2.5.1. Proben

Es wurden Serumproben des Tötungsblutes von Ratten verwendet, die sechs Stunden nach der letzten intraperitonealen Injektion dekapitiert wurden. Da sich altersabhängige Unterschiede in den Konzentrationen von Clozapin und Norclozapin im Serum herausstellten, wurde nach jungen Tieren (190 - 250 g) und alten Tieren (380 - 580 g) unterteilt (siehe Tab. 5). Die Proben einiger Vehikel-behandelter Tiere dienten als Negativkontrollen. Die Konzentrationen von Clozapin und Norclozapin in den Proben wurde nach Flüssig-Flüssig-Extraktion durch eine HPLC-Analyse ermittelt.

Tab. 6: Übersicht über die Serumproben zur Bestimmung von Clozapin und Norclozapin sechs Stunden nach der letzten Injektion. Ersichtlich sind die Clozapin-Dosierung, die Anzahl der Tage, an denen die Tiere die entsprechende Dosierung zu Beginn der Lichtphase erhalten haben und die Anzahl der jeweils verwendeten Tiere.

Dosierung in mg/kg Clozapin i.p.	Anzahl der Injektionen an aufeinanderfolgenden Tagen	Anzahl der Tiere	
		jung (190-250g)	alt (380-580g)
0 (Vehikel)	1	n = 4	n = 2
	8		n = 8
2,5	8		n = 8
7,5	1	n = 6	n = 8
	8		n = 9
15	1	n = 10	

2.5.2. *Extraktion*

Die Messungen erfolgten in Einfachbestimmung. Ein Gemisch aus:

- 400 μ l Serum
- 100 μ l Protriptylin (I.S.)
- 200 μ l 6N NaOH
- 5000 μ l n-Hexan

wurde 20 min im Überkopfschüttler geschüttelt, 15 min mit 4000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert und 15 min bei -80 °C gefroren. Der Überstand der gefrorenen Probe (n-Hexanphase) wurde in 250 μ l 0,85 %ige Phosphorsäure überführt und erneut 20 min im Überkopfschüttler geschüttelt und 15 min mit 4000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Phasengrenze absaugt und verworfen, die untere Phase wurde in die Analyse per HPLC gegeben.

2.5.3. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Die Auftrennung in Clozapin und Desmethylozapin (Norclozapin) erfolgte über eine C18-Säule (Luna 5 μ C18(2) 250 x 4,6 mm, Phenomenex OOG-4252-E0, Säulentemperatur 60 °C; Vorsäule: C18 ODS, Octadecyl, 4 x mm, Phenomenex AJ0-4287 10/pk) unter Anwendung eines Gradienten (Uhr et al., 2000).

2.5.4. *Statistik*

Vehikelbehandelte Tiere, in deren Seren erwartungsgemäß weder Clozapin noch Norclozapin nachgewiesen wurden, fanden bei der statistischen Auswertung keine Berücksichtigung. Aufgrund der geringen bzw. unterschiedlichen Gruppenstärken und da häufig die Kriterien für eine Normalverteilung und die Varianzhomogenität nicht erfüllt waren, wurde einheitlich ein Mann-Whitney Rank Sum Test zwischen zu vergleichenden Gruppen durchgeführt.

2.6. **Bestimmung von TNF- α**

2.6.1. *Proben*

TNF- α wurde sowohl im Serum (gewonnen aus Tötungsblut) als auch im Gehirn der Ratten bestimmt. Für Werte nach akuter Stimulierung wurden Ratten (je n = 10) zu Beginn der Lichtphase i.p. mit Vehikel (Lösungsmittel der Leponex-Injektionslösung), 7,5 mg/kg oder 15 mg/kg Clozapin injiziert und sechs Stunden später getötet. Für Daten nach subchronischer Behandlung mit Clozapin oder Vehikel wurden Serum und Gehirne der Tiere aus den Versuchen zur EEG-Ableitung und zur Aufzeichnung von Futter- und Wasserkonsum, Aktivität und Körpertemperatur verwendet (achtmalige Gabe von Verum zu Beginn der Lichtperiode und Tötung sechs Stunden nach der letzten Injektion).

2.6.2. Präparation der Gehirne

Für die Messungen von TNF- α -Konzentrationen im Gehirn existiert keine validierte Methode. Es wurden mehrere Varianten, vornehmlich einer Bestimmung aus Gehirnhomogenaten, versucht. Da, ausgehend von den Erfahrungen in humanen Serumproben, keine enormen Unterschiede in den TNF- α -Levels der Ratten zu erwarten waren, konnte auf die Bestimmung über mRNA oder in situ-Hybridisierung nicht zurückgegriffen werden.

Zur Bestimmung des TNF- α -Gehaltes im Gehirn der Ratten nach akuter Gabe von Clozapin wurde je n=8 Tieren zu Beginn der Lichtphase (=Ruhephase) 7,5 bzw. 15 mg/kg Clozapin oder Vehikel intraperitoneal injiziert. Sechs Stunden nach Beginn der Lichtphase wurden die Tiere nach einer kurzen Halothan-Betäubung (max. 30 s) dekapitiert.

Das Tötungsblut wurde aufgefangen, gekühlt und nach dem Gerinnen 10 min zentrifugiert, aliquotiert und in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Gehirne wurden sofort präpariert und auf einer gekühlten Unterlage in die Regionen frontaler Kortex, Neokortex, Amygdala, Hippocampus, Thalamus mit Mittelhirn, Hypothalamus und Cerebellum zerlegt. Die Gehirnregionen wurden augenblicklich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Aufarbeitung im Cryostaten über flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6.3. Homogenisation der Gehirne

Die Hirnregionen wurden unaufgetaut mittels eines Potters (900 min^{-1}) sorgfältig auf Eis homogenisiert. Folgende Puffer bzw. Medien wurde getestet (durch Spike-Versuche sowie das Anfertigen einer zusätzlichen Eichkurve):

Puffer I:

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

250 mM Sucrose

0,2 mM DTT

Puffer II:

RBMI-Medium

10 % fetales Kälberserum

Puffer III:

PBS

Protease-Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, complete, Mini, EDTA-free)

0,1 - 0,5 % Triton X-100.

Puffer III hat sich als geeignet erwiesen. In diesem System sollte das Verhältnis von Gewebemasse zu Puffer optimalerweise 1:50 betragen, 1:20 nicht unterschreiten und 1:100 nicht überschreiten. Die Homogenate wurden nach Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, cell disrupter B15, pulsed 30 x, output 3,5, duty cycle 30 %) abzentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, 1h bei 100000 g). Die Überstände wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bestimmung des TNF- α mittels ELISA und des Proteingehaltes bei -80°C gelagert.

2.6.4. *in vitro*-Versuche

Der Kortex dekapitierter Ratten wurde separiert und mit einem Gewebeschnider frontal in Schnitte der Dicke 0.35 mm zerkleinert. Die Schnitte wurden bis zu sechs Stunden in RBMI-Medium, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum, in einem Brutschrank kultiviert (37°C , 5 % CO_2 -Atmosphäre). Dem Kulturmedium wurde Clozapin (Sigma-Aldrich) in den Konzentrationen 3, 30 und 150 μM in DMSO gelöst zugegeben. Kontrollschnitten wurde DMSO in äquivalenter Konzentration (max. 0.5 %) zugefügt. Zum Ausschluß der Aktivität von Makrophagen in den Gewebeschnitten wurden einige Schnitte mit Chlodronat (10 % liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate = Cl_2MDP -Liposomen) im Kulturmedium kultiviert. In Liposomen eingeschlossenes Chlodronat tötet selektiv phagozytierende Zellen, da diese die Liposomen aufnehmen und nach Aufschluß an dem Chlodronat zugrunde gehen (Claassen et al., 1990; Van Rooijen et al., 1996). Für eine vollständige Eliminierung der Makrophagen wurden die Schnitte zunächst zwei Stunden mit Cl_2MDP -Liposomen (und zu Kontrollzwecken ohne Chlodronat) inkubiert, bevor Clozapin und DMSO zugegeben wurden. Vor Zugabe von Clozapin/DMSO sowie eine Stunde und zwei Stunden nach Zugabe von Clozapin/DMSO wurde Kulturlösung entnommen und zur Bestimmung der TNF- α -Konzentration und des Proteingehaltes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.6.5. *ELISA*

Die Messung der TNF- α -Konzentrationen in den Überständen der Gehirnhomogenate, in Serum und in den Kulturlösungen erfolgte in Doppelbestimmung mit einem handelsüblichen, ultrasensitiven ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-Kit (Biosource) nach Anleitung. Der Assay hatte einen Nachweisbereich von 0,7 - 150 pg/ml. Mit jedem Assay wurde eine Standardkurve mit folgenden TNF- α -Konzentration aufgetragen: 0; 2,3; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; 100 und 150 pg/ml. Serumproben wurden mit Standarddiluent verdünnt. Die optische Dichte in den Wells wurde mit einem Reader Dynatech MR 7000 bei 450 nm bestimmt. Das Gerät berechnete anhand der Eichkurve die Konzentrationen des TNF- α in den Wells, die im Anschluß auf den Proteingehalt umgerechnet wurden.

2.6.6. *Bestimmung des Proteingehaltes*

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford unter Zuhilfenahme eines handelsüblichen Kits (Bio-Rad Protein Assay). Es wurde eine Eichkurve mit den Meßpunkten 0, 70, 140, 280, 510, 750 und 980 mg/ml Protein erstellt. Die Proben wurden zehnfach mit a.d. verdünnt und die Messungen in Doppelbestimmung laut Anleitung mit einem Spectrophotometer DU-62 (Beckman) durchgeführt. Das Gerät berechnete anhand der Eichkurve den Proteingehalt.

2.6.7. *Statistik*

Die ermittelten TNF- α -Konzentrationen in den Gehirnhomogenaten wurden einer One-Way-ANOVA unterzogen. Bei Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurden Tests mit Kontrasten durchgeführt (Tukey Test).

Zur statistischen Auswertung der *in vitro*-Kultivierungsversuche von Gehirnschnitten wurde eine Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA) mit den Faktoren Gruppe (= Behandlung) und Zeit (= Meßzeitpunkt) durchgeführt. Bei Vorliegen von signifikanten Unterschieden wurden Tests mit Kontrasten durchgeführt (Tukey Test).

2.7. **Bestimmung der Serum-Leptin-Konzentrationen**

Die Leptinkonzentrationen wurden als Doppelbestimmungen im Serum von Ratten mit einem handelsüblichen RIA (radioactive immune assay)-Kit (Linco, USA) bestimmt. Der Kit hatte einen Nachweisbereich von 0,5 - 50 ng/ml Leptin. Es wurde eine Standardkurve mit den Werten 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 und 50 ng/ml Leptin mitgeführt. Der Kit wurde laut Anleitung durchgeführt und die Radioaktivität durch einen Gamma Counter Cobra II Auto-Gamma (Canberra-Packard GmbH; Dreieich, Deutschland) gemessen. Das Gerät berechnete anhand der Eichkurve die Leptinkonzentrationen.

Die statistische Auswertung erfolgte bei zwei zu vergleichenden Gruppen über *t*-Tests, bei mehreren zu vergleichenden Gruppen über eine ANOVA. Bei Auftreten signifikanter Unterschiede (ANOVA) wurden Tests mit Kontrasten durchgeführt (Tukey Test) .

3. Ergebnisse

3.1. Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten während der Ruheperiode

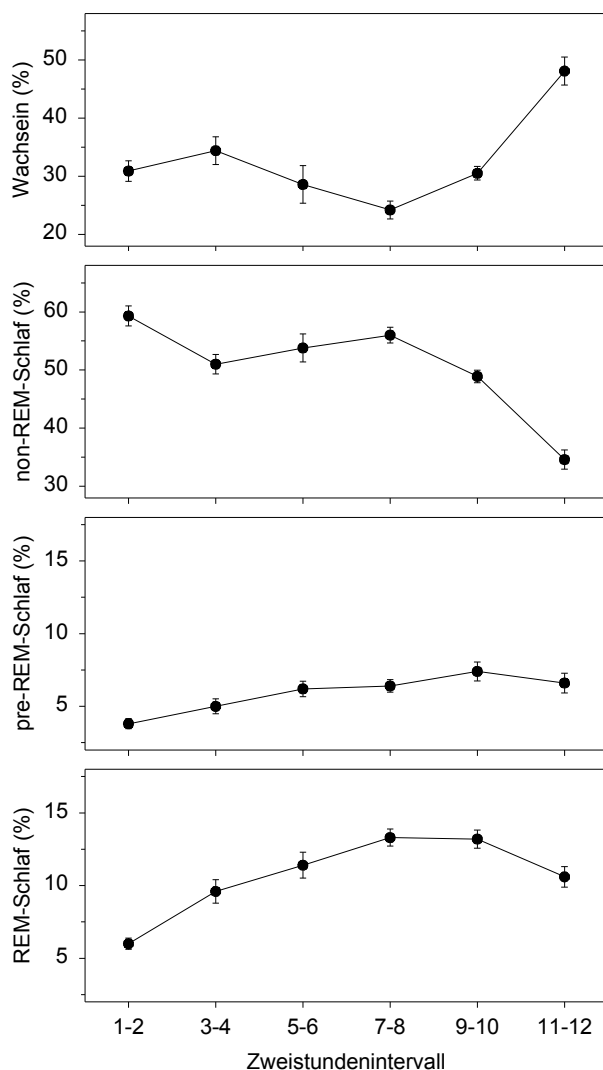


Abb. 12: Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten (n=24) nach einer Vehikel-Injektion zu Beginn der Lichtphase. Daten vom Placebotag aller Tiere (MW \pm SEM). Bitte Achseneinteilung beachten.

Abb. 12 zeigt in Zweistundenmittelwerten das Schlaf-Wach-Verhalten der Ratten unter Kontrollbedingungen über die Dauer der zwölfstündigen Lichtphase. Bis zur zehnten Stunde der Lichtphase sind die Ratten nur wenig wach, erst in der elften und zwölften Stunde steigt der Anteil des Wachseins sprunghaft an.

Innerhalb der ersten beiden Stunden verbringen die Ratten die meiste Zeit, nämlich ca. 60 % im non-REM-Schlaf. Sein Anteil bleibt bis zur achten Stunde auf einem konstant hohen Niveau und fällt dann kontinuierlich stark ab.

Der REM-Schlaf und das Übergangsstadium von non-REM- zu REM-Schlaf, der pre-REM-Schlaf, haben zu Beginn der Ruhephase den geringsten Anteil (5 %) und treten erst im Verlauf der Lichtperiode stärker in Erscheinung. In der siebten bis zehnten Stunde erreicht der REM-Schlaf mit einem Anteil von ca. 12 % seinen Höhepunkt und fällt zum Ende der Lichtphase wieder stark ab.

3.2. Effekte von Clozapin auf den Schlaf der Ratte

3.2.1. Verteilung der Vigilanzstadien

Die Daten wurden normiert (siehe Kapitel 2.3.4, Seite 25), um Unterschiede der Tiere am Placebotag auszugleichen. Sowohl der Anteil als auch der Verlauf der Vigilanzstadien wach, non-REM-, pre-REM- und REM-Schlaf war danach für alle drei Behandlungsgruppen nahezu gleich (siehe Abb. 13). Für die Ergebnisse der statistischen Analyse siehe Tab. 7, Seite 38.

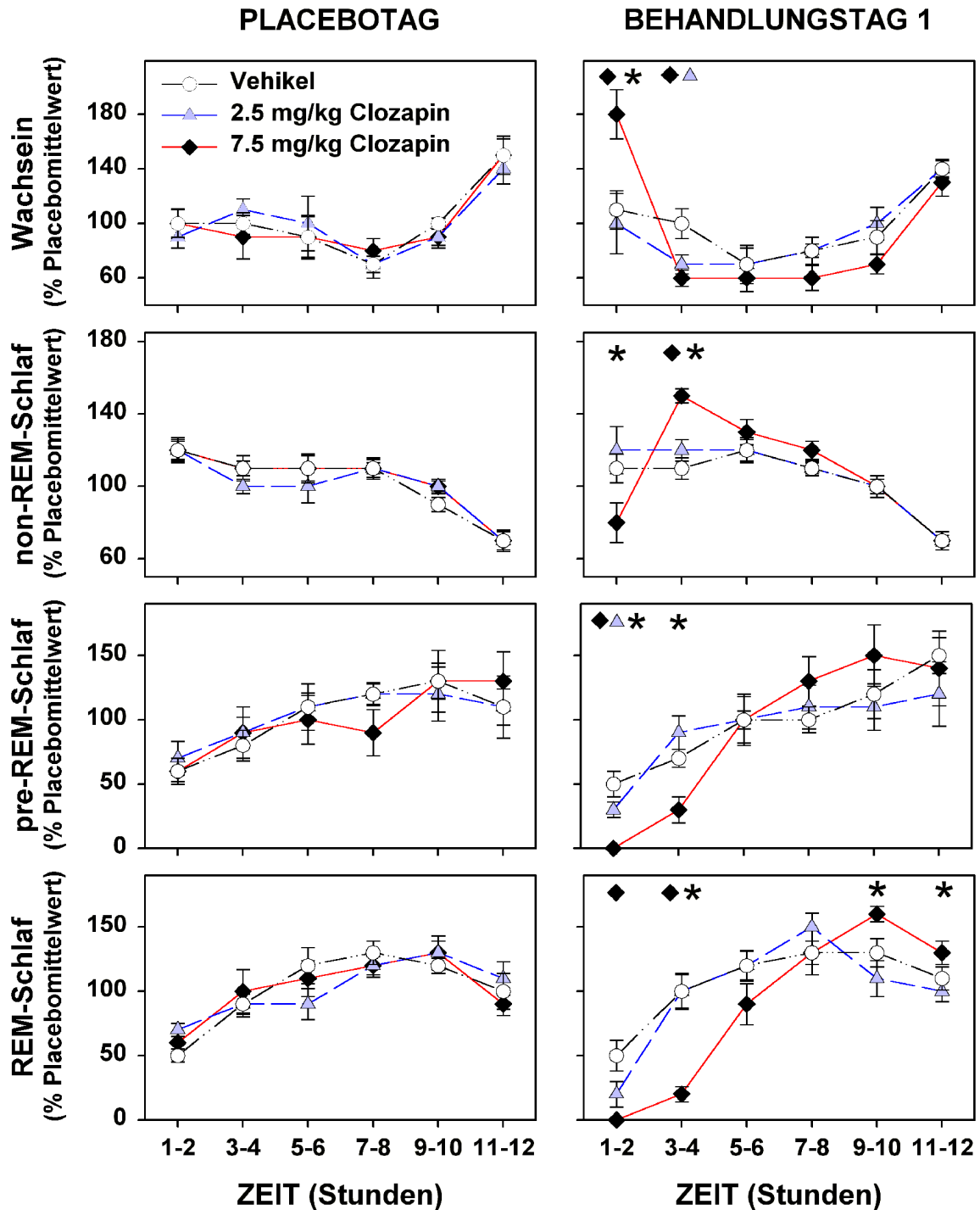
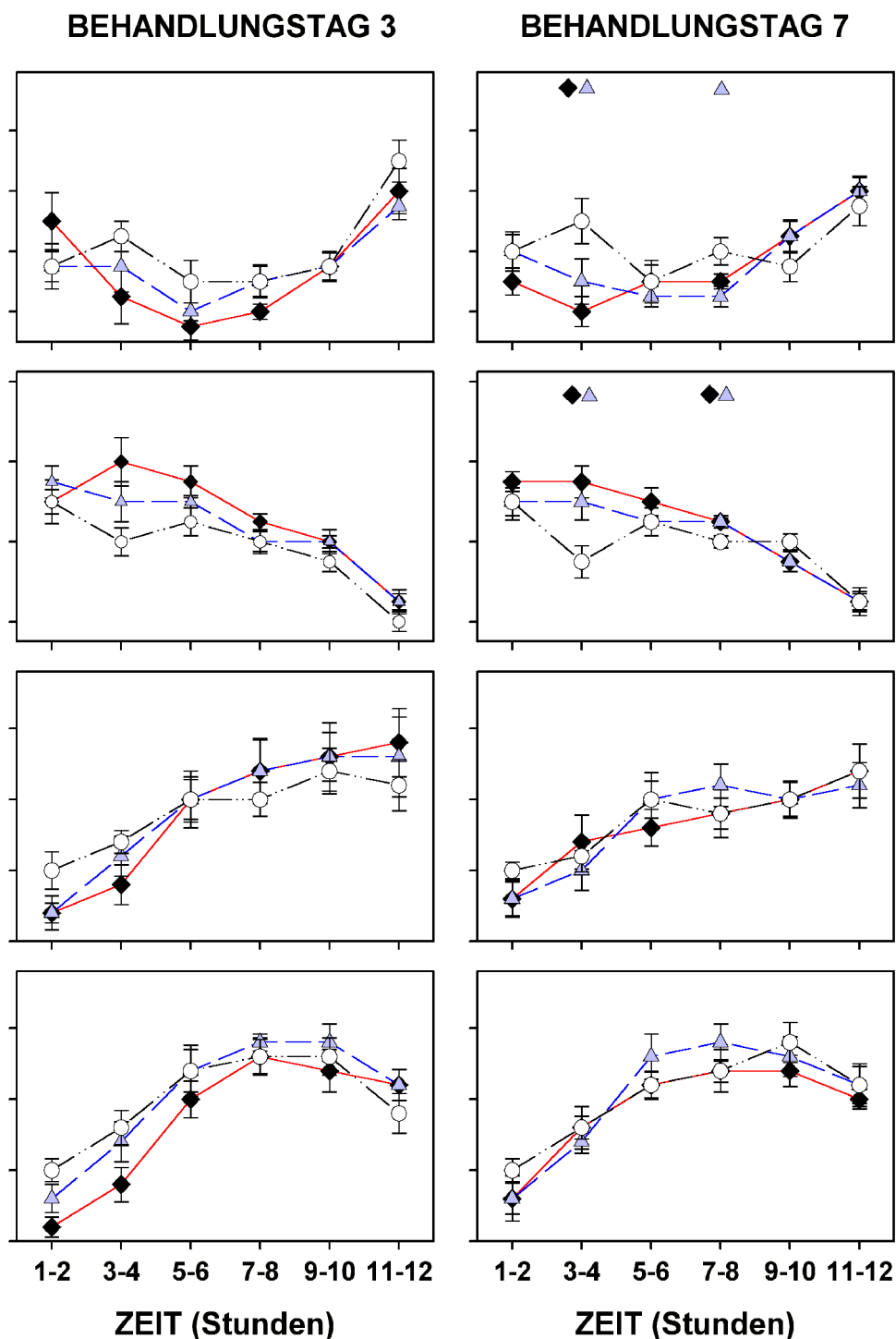


Abb. 13: Anteil der Vigilanzstadien Wachheit, non-REM-, pre-REM- und REM-Schlaf in Prozent des 12h-Mittelwertes am Placebotag nach i.p. Injektion von Vehikel oder Clozapin am Placebotag und am ersten, dritten und siebten Tag der Behandlung mit Vehikel oder 2,5 bzw. 7,5 mg/kg Clozapin (je n = 8, MW ± SEM). Signifikante Unterschiede zur Vehikelgruppe sind durch Gruppensymbole (◆ ▲) verdeutlicht. Der Stern (★) symbolisiert Unterschiede zwischen den Clozapin-Behandlungsgruppen (p < 0.05, Tukey Test). Am ersten Behandlungstag waren die Tiere der hochdosierten Gruppe innerhalb der ersten beiden Stunden auf Kosten aller Schlafstadien erheblich mehr wach. In dem folgenden Zweistundenintervall war der Anteil des Wachsein für die hochdosierte Behandlungsgruppe reduziert und der non-REM-Schlaf vermehrt. Der REM-Schlaf und im Vergleich zur niedrigdosierten Behandlungsgruppe auch der pre-REM-Schlaf wurden weiterhin unterdrückt.



Über den gesamten Zeitraum der Lichtperiode verbrachten die Tiere der hochdosierte Gruppe mehr Zeit im non-REM-Schlaf als die beiden anderen Behandlungsgruppen. Bei der niedrigdosierte Behandlungsgruppe war in den ersten beiden Stunden nach Injektion der pre-REM-Schlaf unterdrückt und während der dritten bis vierten Stunde der Anteil des Stadiums Wach gegenüber der Kontrollgruppe verringert.

Am dritten Behandlungstag traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Am siebten Behandlungstag verbrachten die clozapinbehandelten Tiere unabhängig von der Dosierung temporär mehr Zeit im non-REM-Schlaf und weniger Zeit im Wachzustand als die Vehikel-behandelte Kontrollgruppe.

Bei akuter Gabe von 7,5 mg/kg Clozapin verbrachten die Tiere über den Gesamtzeitraum der Lichtphase mehr Zeit im non-REM-Schlaf als die Tiere der Vehikelgruppe und der niedrig-dosierten Behandlungsgruppe. Jedoch waren die Tiere in den ersten zwei Stunden nach Injektion zunächst erheblich mehr wach. Korrespondierend hierzu waren der non-REM-Schlaf vermindert sowie REM-Schlaf und pre-REM-Schlaf signifikant unterdrückt. Im folgenden Zweistundenintervall verbrachten die hochdosiert behandelten Tiere signifikant mehr Zeit im non-REM-Schlaf, der Anteil des Wachzustandes nahm drastisch ab. Der REM-Schlaf war gegenüber den anderen Gruppen und der pre-REM-Schlaf gegenüber der niedrigdosierten Clozapingruppe noch immer unterdrückt. In den letzten vier Stunden der Ruhephase kam es zu einer signifikanten Zunahme des REM-Schlafes gegenüber der niedrigdosierten Behandlungsgruppe äußerte.

Tab. 7: Effekte der Clozapinbehandlung auf den Anteil der Vigilanzstadien.
Ergebnisse der ANOVA über die einzelnen Behandlungstage.

Parameter	ANOVA			
	Effekt			
	Gruppe (Behandlung)		Gruppe x Zeit	
	F _{2,21} =	p ≤	F _{10,105} =	p ≤
<i>Placebotag</i>				
Wachsein	--	--	0,5	0,9
non-REM-Schlaf	--	--	0,6	0,8
pre-REM-Schlaf	--	--	0,8	0,6
REM-Schlaf	--	--	0,8	0,6
<i>erster Behandlungstag</i>				
Wachsein	1,6	0.2	4,3	0.0009
non-REM-Schlaf	3.8	0.04	5,1	0.0003
pre-REM-Schlaf	0,2	0.9	3,5	0.007
REM-Schlaf	2,0	0.2	6,6	0.0001
<i>dritter Behandlungstag</i>				
Wachsein	1.8	0.2	1,1	0,4
non-REM-Schlaf	3.2	0.07	1,4	0,3
pre-REM-Schlaf	0	1	1,1	0,4
REM-Schlaf	1.3	0.3	1,5	0,2
<i>siebter Behandlungstag</i>				
Wachsein	2,3	0.2	2,3	0.04
non-REM-Schlaf	3,1	0.07	2,7	0.02
pre-REM-Schlaf	0,2	0.9	1,2	0.4
REM-Schlaf	0,9	0.5	0,8	0.6

Nach akuter Gabe von 2,5 mg/kg Clozapin war innerhalb der ersten beiden Stunden nach Injektion signifikant nur der pre-REM-Schlaf unterdrückt. Zur gleichen Zeit war eine Unterdrückung des REM-Schlaf zu beobachten, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. In der dritten und vierten Stunde waren die Tiere signifikant weniger wach als die Vehikelgruppe, ohne daß sich dies spezifisch in einem der anderen Vigilanzstadien niederschlug.

Am dritten Behandlungstag traten keine signifikanten Gruppenunterschiede auf. Tendentiell verbrachten die clozapinbehandelten Tiere über die Gesamtdauer der Ruhephase mehr Zeit im non-REM-Schlaf.

Auch am siebten Behandlungstag verbrachten die Tiere der hochdosierten Behandlungsgruppe während der Ruhephase tendentiell mehr Zeit im non-REM-Schlaf als die Vehikelgruppe. Beide Behandlungsgruppen wiesen in der dritten bis vierten und siebten bis achten Stunde signifikant mehr non-REM-Schlaf auf als die Vehikelgruppe. Korrespondierend hierzu war der Anteil des Wachseins in der dritten bis vierten Stunde für beide Behandlungsgruppen und in der siebten bis achten Stunde für die niedrigdosierte Behandlungsgruppe vermindert.

3.2.2. *Architektur des Schlafes*

Der Begriff Schlafarchitektur charakterisiert den Schlaf qualitativ bezüglich seiner Struktur. Ermittelt wurden die Einschlaf latenz, die REM-Latenz und die Anzahl und Dauer der Episoden des non-REM- und des REM-Schlafes. Abb. 14 gibt einen Überblick über die Veränderungen der Architektur des Schlafes nach Clozapinverabreichung im Vergleich zum Placobotag.

Die non-REM-Schlaf latenz (Einschlaf latenz) wurde durch Clozapin nicht beeinflusst. Sie liegt während der Ruhephase individuell verschieden zwischen 10-60 min.

Die Anzahl der non-REM-Episoden innerhalb der zwölfstündigen Lichtphase war unter der hohen Dosierung am ersten Behandlungstag signifikant verringert (für statistische Details siehe Tab. 9). Gleichzeitig waren die non-REM-Episoden während des gesamten Versuches für die 7,5 mg/kg Clozapin-Gruppe verlängert. Beide Effekte traten nach akuter Gabe am stärksten auf und schwächten während des Fortganges des Experimentes ab (siehe Abb. 14).

Für die mit 2,5 mg/kg Clozapin behandelte Gruppe wurde ebenfalls eine Verringerung der Anzahl bei gleichzeitiger Verlängerung der Dauer der non-REM-Episoden beobachtet, jedoch entwickelten sie bei dieser Gruppe die Effekte erst im Laufe der Behandlung. Die Anzahl der non-REM-Episoden war am dritten Behandlungstag signifikant verringert, die Dauer der non-REM-Episoden am dritten und siebten Behandlungstag signifikant erhöht (siehe Abb. 14).

Die REM-Schlaf latenz war am ersten und dritten Tag der Behandlung mit der hohen Clozapin-Dosis erheblich verlängert. Diese Wirkung nahm über den Verlauf des Versuches ab und trat am siebten Tag nicht mehr auf. Korrespondierend hierzu war die Anzahl der REM-Schlaf-Episoden am ersten Behandlungstag signifikant vermindert. Im Laufe des Versuches steigerte sich die Anzahl der Episoden wieder und erreichte am siebten Behandlungstag Normalwerte. Die Dauer der REM-Schlaf-Episoden war im Vergleich zur Vehikelgruppe zu keinem Zeitpunkt des Behandlungszeitraumes beeinflusst. Für die niedrigdosierte Behandlungsgruppe verlängerte sich im Laufe des Versuches die REM-Schlaf latenz (Abb. 14). Effekte auf die Anzahl und Dauer der REM-Schlaf-Episoden konnten nicht gefunden werden.

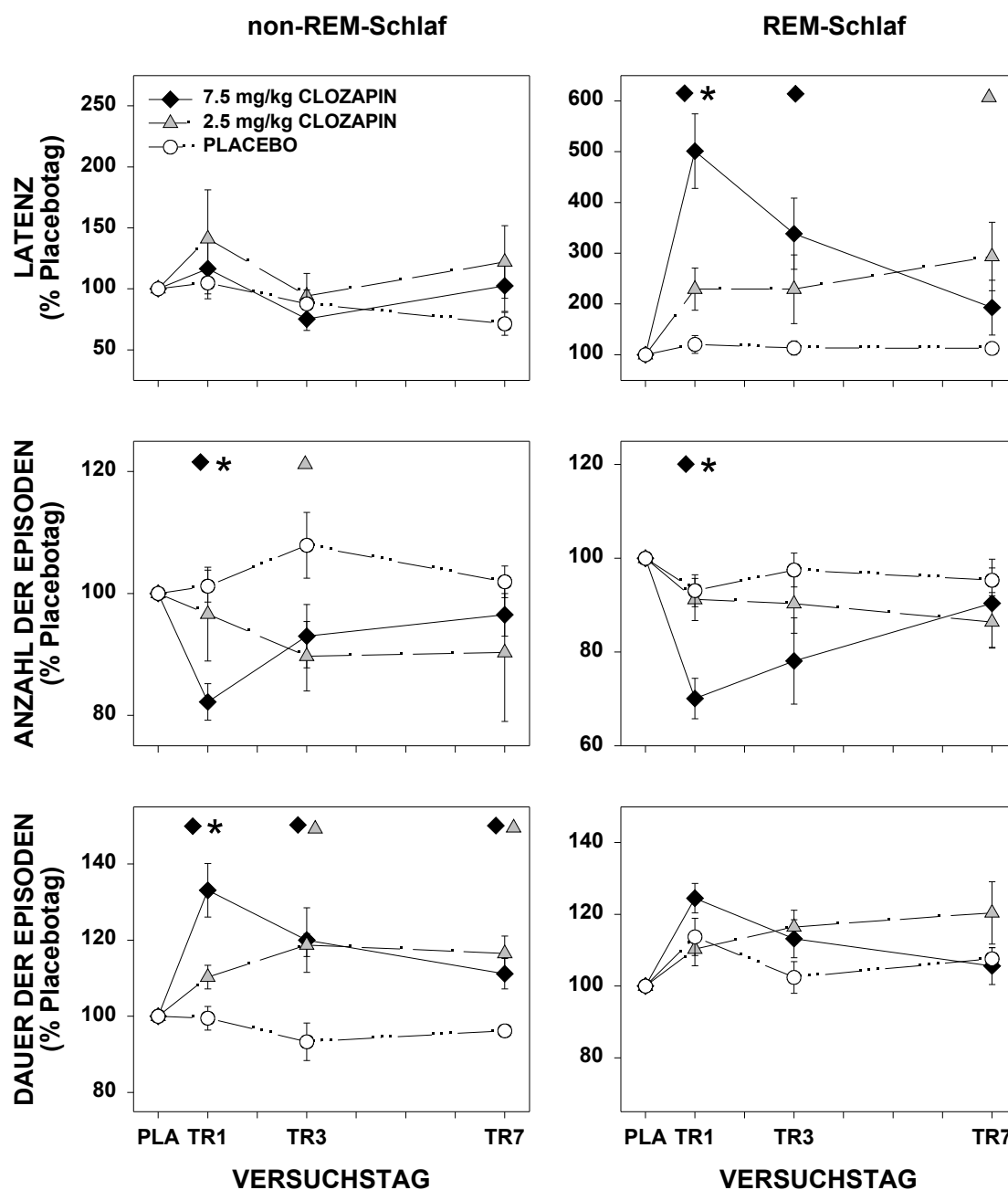


Abb. 14: Latenzen bis zum Auftreten von non-REM- und REM-Schlaf sowie Anzahl und durchschnittliche Dauer der non-REM- und REM-Schlaf-Episoden (in Prozent vom Placebotag) am Placebotag und den Behandlungstagen. PLA = Placebotag, TR1 = akute Gabe, TR3 = dritter Behandlungstag, TR7 = siebter Behandlungstag. MW \pm SEM. Signifikante Unterschiede zur Vehikelgruppe sind durch Gruppensymbole (◆ ▲) verdeutlicht, Unterschiede zwischen den Clozapin-Behandlungsgruppen durch den Stern (★). $p < 0.05$ (Tukey Test)

Tab. 8: Effekte der Clozapinbehandlung auf die Schlafarchitektur. Ergebnisse der ANOVA über die einzelnen Behandlungstage.

Parameter	Mittelwerte			ANOVA		
	Gruppe			Effekt		
	Vehikel	Clozapin		Gruppe		
		2,5 mg/kg	7,5 mg/kg	$F_{2,21} =$	$p \leq$	
<i>Placebotag</i>						
non-REM-Schlaf:	Latenz (min)	29.9	21.7	25.3	-	-
	Anzahl der Episoden	121	119	120	-	-
	Dauer der Episoden (min)	1.8	1.8	1.9	-	-
REM-Schlaf:	Latenz (min)	50.7	46.7	55.3	-	-
	Anzahl der Episoden	42	35	34	-	-
	Dauer der Episoden (min)	1.1	1.0	1.2	-	-
<i>erster Behandlungstag</i>						
non-REM-Schlaf:	Latenz (min)	30.2	27.6	27	0.5	0.6
	Anzahl der Episoden	122	114	99	12.7	0.0002
	Dauer der Episoden (min)	1.7	2.1	2.5	12.8	0.0002
REM-Schlaf:	Latenz (min)	57.5	102.4	250.8	15.5	0.0001
	Anzahl der Episoden	39	32	24	9.7	0.001
	Dauer der Episoden (min)	1.2	1.1	1.4	2.6	0.1
<i>dritter Behandlungstag</i>						
non-REM-Schlaf:	Latenz (min)	25.7	17.8	17.4	0.5	0.6
	Anzahl der Episoden	130	106	112	4.7	0.02
	Dauer der Episoden (min)	1.6	2.2	2.3	6.5	0.006
REM-Schlaf:	Latenz (min)	55.6	92.5	176.6	3.9	0.04
	Anzahl der Episoden	41	32	26	2.1	0.1
	Dauer der Episoden (min)	1.1	1.2	1.4	2.4	0.1
<i>siebter Behandlungstag</i>						
non-REM-Schlaf:	Latenz (min)	19.1	21.9	21	1.4	0.3
	Anzahl der Episoden	123	107	115	2.9	0.08
	Dauer der Episoden (min)	1.7	2.3	2.2	8.6	0.002
REM-Schlaf:	Latenz (min)	57.7	126.7	95.2	3.3	0.05
	Anzahl der Episoden	40	30	30	0.5	0.6
	Dauer der Episoden (min)	1.1	1.2	1.3	1.7	0.2

3.2.3. SWA während non-REM-Schlaf

Unter Kontrollbedingungen fällt die slow-wave Aktivität während des non-REM-Schlafes in allen drei Gruppen über die Dauer der Lichtphase kontinuierlich ab (siehe Abb. 15 oben).

Nach akuter Gabe von 7.5 mg/kg Clozapin war die SWA innerhalb der ersten beiden Stunden gegenüber der Vehikelgruppe und der niedrigdosierten Behandlungsgruppe erheblich unterdrückt (Statistik siehe Tab. 7). Im weiteren Verlauf der Ruheperiode unterschied sich die SWA der drei

Gruppen nicht. Der Effekt der Unterdrückung der SWA trat am dritten Behandlungstag mit schwächerer Ausprägung auf. Am siebten Behandlungstag hatte sich für diese Wirkung des Clozapins Toleranz entwickelt. Die niedere Clozapindosierung übte keine Effekte auf die slow-wave Aktivität aus (Abb. 15).

Tab. 9: Effekte der Clozapinbehandlung auf die slow-wave Aktivität während non-REM-Schlaf. Ergebnisse der ANOVA für die einzelnen Behandlungstage.

Versuchstag	ANOVA			
	Effekt			
	Gruppe (Behandlung)		Gruppe x Zeit	
	$F_{2,21} =$	$p \leq$	$F_{10,105} =$	$p \leq$
<i>slow-wave Aktivität</i>				
Placebotag	1.3	0.3	0.8	0.6
Behandlungstag 1	0.6	0.6	12.4	0.0001
Behandlungstag 3	1.3	0.3	5.8	0.001
Behandlungstag 7	1.4	0.3	1.2	0.4

3.2.4. Besondere EEG-Signale

Einige Ratten zeigten im EEG das typische Spike-Wave-Muster der Absence Epilepsie (vgl. Abb. 7, Seite 24), bei der die Tiere bis zu fünf Sekunden in ihrer Bewegung verharren (Vergnes et al., 1982). Absence Epilepsie trat vor allem während des Wachseins und kurz vor dem Einschlafen auf. Abb. 15, Seite 44, zeigt das Vorkommen von Epilepsie am Placebotag. Mit Fortschreiten der Ruhephase tritt dieses Sonderstadium stärker in Erscheinung, vermutlich wegen des zunehmenden Anteils des Vigilanzstadiums Wach (vgl. Abb. 13, Seite 36). 50 Prozent der Ratten wiesen unter Kontrollbedingungen Absence-Epilepsie auf (3 Tiere der Vehikel-Gruppe, 5 Tiere der 2,5 mg/kg und 4 Tiere der 7,5 mg/kg Clozapin-Gruppe).

Nach Verabreichung von Clozapin wurde die Häufigkeit von Absence-Epilepsien vor allem innerhalb der ersten beiden Stunden nach Injektion verstärkt. Bei je einem Tier pro Behandlungsgruppe ließen sich Absence-Epilepsien durch Clozapingabe induzieren.

Bei der mit 7,5 mg/kg Clozapin behandelten Gruppe traten nach akuter Gabe Absence-Epilepsien vor allem innerhalb der ersten beiden Stunden der Ruhephase auf, während der die Ratten verstärkt wach waren. Nach dreimaliger Gabe des Clozapins waren Absence-Epilepsien innerhalb der ersten vier Stunden nach Injektion vermehrt. Am siebten Behandlungstag hatten die Tiere Toleranz gegenüber dieser Wirkung des Clozapin entwickelt (siehe Abb. 15, Seite 44/41).

Die 2,5 mg/kg Clozapin-Gruppe zeigte über die Gesamtdauer des Versuches eine sichtbare Vermehrung des Auftretens von Absence-Epilepsien vor allem innerhalb der ersten beiden Stunden nach Injektion ohne Toleranzentwicklung über die Dauer des Versuches (Abb. 15).

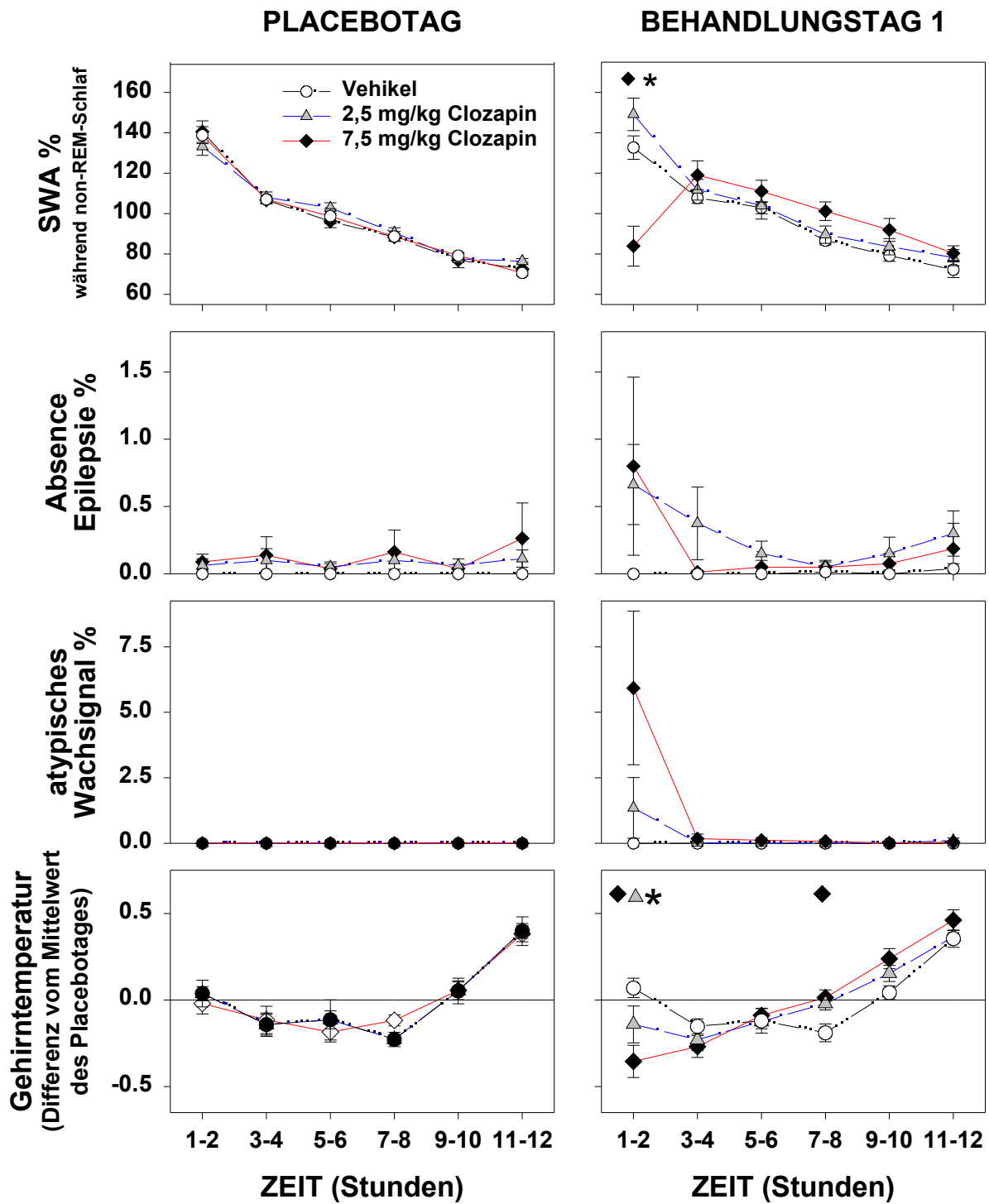
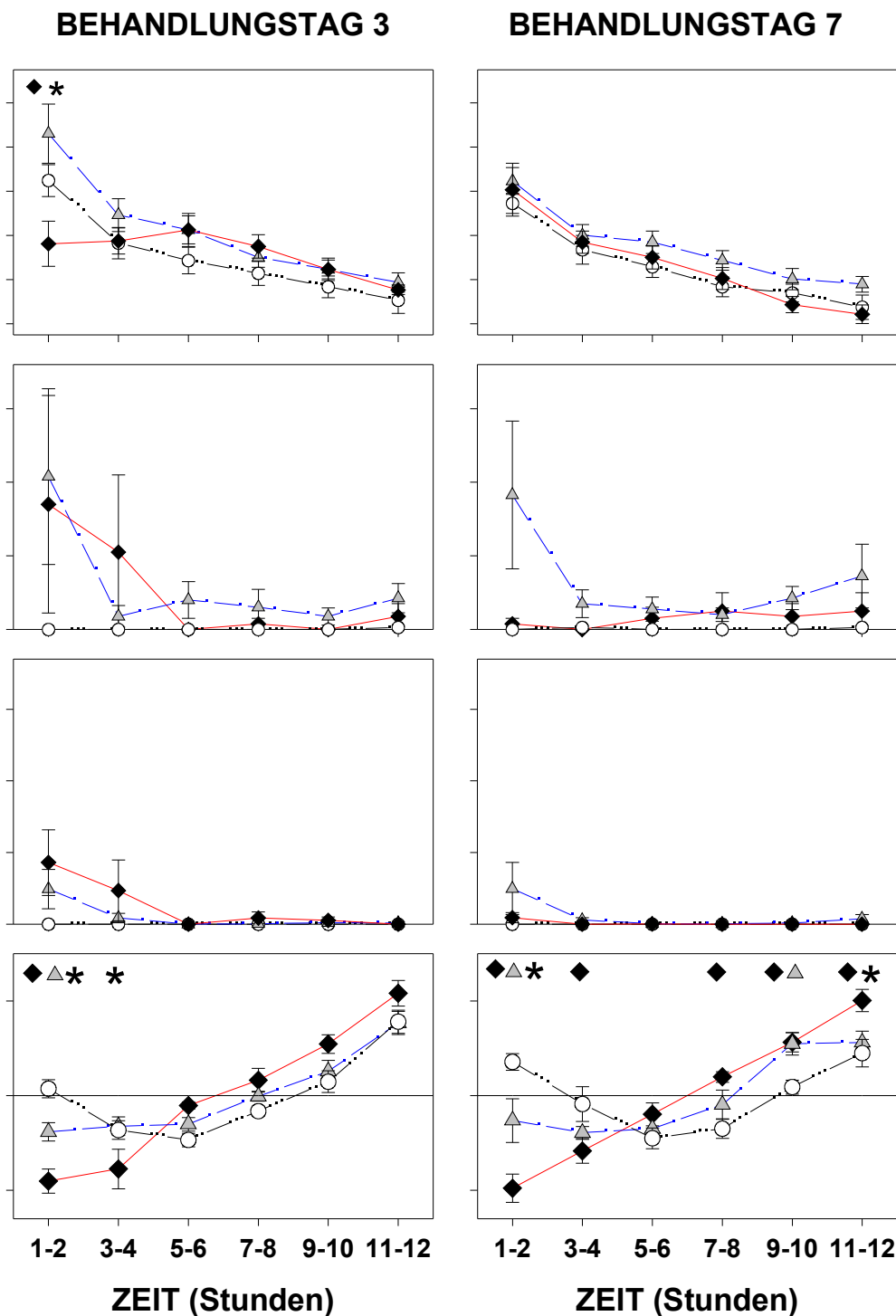


Abb. 15: Aktivität langsamer Wellen (SWA) während des non-REM-Schlafes in Prozent des 12h-Mittelwertes am Placebotag, prozentualer Anteil der Absence Epilepsie und eines Clozapin-induzierten, atypischen Wachsignals und die Gehirntemperatur (als Differenz vom 12h-Mittelwert des Placebotages) am Placebotag und nach akuter und subchronischer Applikation von Vehikel (n = 8, außer Gehirntemperatur n = 6) oder Clozapin (je Gruppe n = 8, außer Gehirntemperatur: für 2,5 mg/kg n = 6; für 7,5 mg/kg n = 7). MW ± SEM. Signifikante Unterschiede zur Vehikelgruppe sind durch Gruppensymbole (◆ △) verdeutlicht. Der Stern (★) symbolisiert Unterschiede zwischen den Clozapin-Behandlungsgruppen. p < 0.05 (Tukey Test)



7,5 mg/kg Clozapin unterdrückte zu Beginn der Lichtphase erheblich die SWA während gleichzeitig Absence Epilepsien und ein Clozapin-typisches Wachsignal gehäuft auftraten. Für die hohe Dosierung entwickelte sich über den Verlauf des Versuches Toleranz für diese Wirkungen des Clozapins. Bei der niedrigdosierten Behandlungsgruppe wurden ebenfalls Absence-Epilepsie und atypische Wachsignale registriert, ohne daß diese Gruppe Toleranz entwickelte. Über die Gesamtdauer des Versuches senkte Clozapin in den ersten beiden Stunden dosisabhängig die Gehirntemperatur, gefolgt von einer Erhöhung der Gehirntemperatur gegenüber der Vehikelgruppe in der zweiten Hälfte der Ruhephase.

Unter Clozapingabe traten bei 75 % der Tiere der 7,5 mg/kg und 50 % der 2,5 mg/kg Clozapin-Gruppe auffällige EEG-Signale auf. Hierbei waren die EEG-Kurven hochamplitudig und oft spindelartig wie während des non-REM-Schlafes, gleichzeitig traten EMG-Signale hoher Amplitude auf mit häufig Spike-artiger Form wie bei Myoklonien (Abb. 7, Seite 24). Da Epochen bzw. Phasen derartiger Signale stets von "normalen" Wach-Epochen umgeben waren, wurden nach zusätzlicher Auswertung von Videoaufnahmen diese ungewöhnlichen EEG-Signale dem Stadium Wach zugeordnet.

Abb. 15 (Seite 44/45) zeigt, daß die Clozapin-induzierten Signale am Placebotag selbstverständlich nicht auftraten. Für die 7,5 mg/kg Clozapin-Gruppe stellten sie eine akute Reaktion auf das Clozapin vor allem innerhalb der ersten zwei Stunden nach Injektion dar, für die sich im Laufe des Versuches Toleranz entwickelte. Bei der 2,5 mg/kg Clozapin-Gruppe traten die Clozapin-induzierten Wach-Signale mit bedeutend geringerer Häufigkeit und im wesentlichen nur innerhalb der ersten beiden Stunden nach Clozapin-Injektion auf. Diese Gruppe entwickelte bis zum siebten Tag keine Toleranz für diese Wirkung des Clozapins.

3.2.5. *Gehirntemperatur*

Die Gehirntemperatur wird von dem Vigilanzstadium beeinflusst. Abb. 15, Seite 44/39 stellt in der unteren Reihe die Gehirntemperatur in Zweistundenmittelwerten als Abweichung von der Durchschnittstemperatur der Ruheperiode des Placebotages dar. Aufgrund von technischen Problemen mit den Thermistoren flossen die Temperaturdaten von 19 Tieren in die statistische Auswertung ein: für die Vehikelgruppe und die 2,5 mg/kg Clozapingruppe je $n = 6$, für 7,5 mg/kg Clozapin $n = 7$.

Während der ersten acht Stunden am Placebotag blieb die Gehirntemperatur auf einem konstanten Niveau (ca. 36 °C) und stieg gegen Ende der Lichtperiode an, korrespondierend zu einer Zunahme des Vigilanzstadiums Wach. An allen Behandlungstagen war die Gehirntemperatur während der ersten zwei Stunden nach Injektion dosisabhängig erniedrigt (Statistik vgl. Tab. 10). Am dritten Behandlungstag war die Gehirntemperatur der hochdosierten Clozapingruppe auch während der dritten bis vierten Stunde gegenüber der niedrigdosierten Gruppe und am siebten Behandlungstag gegenüber der Vehikel-Gruppe erniedrigt (Abb. 15).

Während der zweiten Hälfte der Lichtphase war die Gehirntemperatur der Clozapin-behandelten Tiere im Vergleich zu Vehikelgruppe erhöht. Dieser Effekt wurde für die hohe Clozapindosierung am ersten Behandlungstag während der siebten bis achten Stunde und am siebten Behandlungstag von der siebten bis zwölften Stunde signifikant, für die niedrige Dosierung am siebten Tag während der neunten bis zehnten Stunde (Abb. 15).

Die Wirkungen von Clozapin auf die Gehirntemperatur wurden in einem weiteren Versuch auch für die Körpertemperatur bestätigt.

Tab. 10: Effekte der Clozapinbehandlung auf die Gehirntemperatur. Ergebnisse der ANOVA für die einzelnen Behandlungstage.

Versuchstag	ANOVA			
	Effekt			
	Gruppe (Behandlung)		Gruppe x Zeit	
	$F_{2,16} =$	$p \leq$	$F_{10,80} =$	$p \leq$
<i>Gehirntemperatur</i>				
Placebotag	0.8	0,5	0,8	0.6
Behandlungstag 1	0.09	0,9	3,6	0.001
Behandlungstag 3	0.06	0,9	4.8	0.001
Behandlungstag 7	0.9	0.4	7.8	0.001

3.3. Tageszeitliche Änderungen von Nahrungsaufnahme, Aktivität und Körpertemperatur bei Laborratten

Abb. 16 zeigt die typische 24-h-Rhythmik von Laborratten. Ratten sind nachtaktive Tiere, die sich während der Lichtphase nur wenig bewegen und kaum Futter und Wasser zu sich nehmen. Dementsprechend liegt auch die Körpertemperatur in der Lichtphase unter den Werten der Aktivitätsphase, während sie in der Dunkelphase auf konstant hohem Niveau bleibt.

Der Beginn der Lichtphase stellt für die Ratten den Übergang ihrer aktiven Phase in die Ruhephase dar. Aktivität und Körpertemperatur sind in den ersten Stunden der Ruhephase noch relativ hoch. In den folgenden Stunden der Ruhephase bleiben alle ermittelten Parameter über lange Zeit auf einem niedrigen Niveau. Erst gegen Ende der Lichtphase steigt die Futteraufnahme sprunghaft an und die Körpertemperatur steigt, bereits hier erfolgt der Übergang zur Aktivitätsphase. Zu Beginn der Dunkelphase liegt der Schwerpunkt der Nahrungsaufnahme, die Aktivität nimmt deutlich zu und die Körpertemperatur steigt auf das hohe Niveau, das sie während der gesamten Dunkelphase hält. Im weiteren Verlauf der Aktivitätsphase fressen die Ratten wieder weniger. Ihr Aktivitätsmaximum erreichen sie am Ende der Dunkelphase. Die Wasseraufnahme unterliegt sowohl zum Schwerpunkt der Futteraufnahme als auch zum Aktivitätsschwerpunkt einem Maximum. Wie schon beschrieben, sinken Körpertemperatur und Aktivität der Ratten erst wieder mit Beginn der Lichtphase.

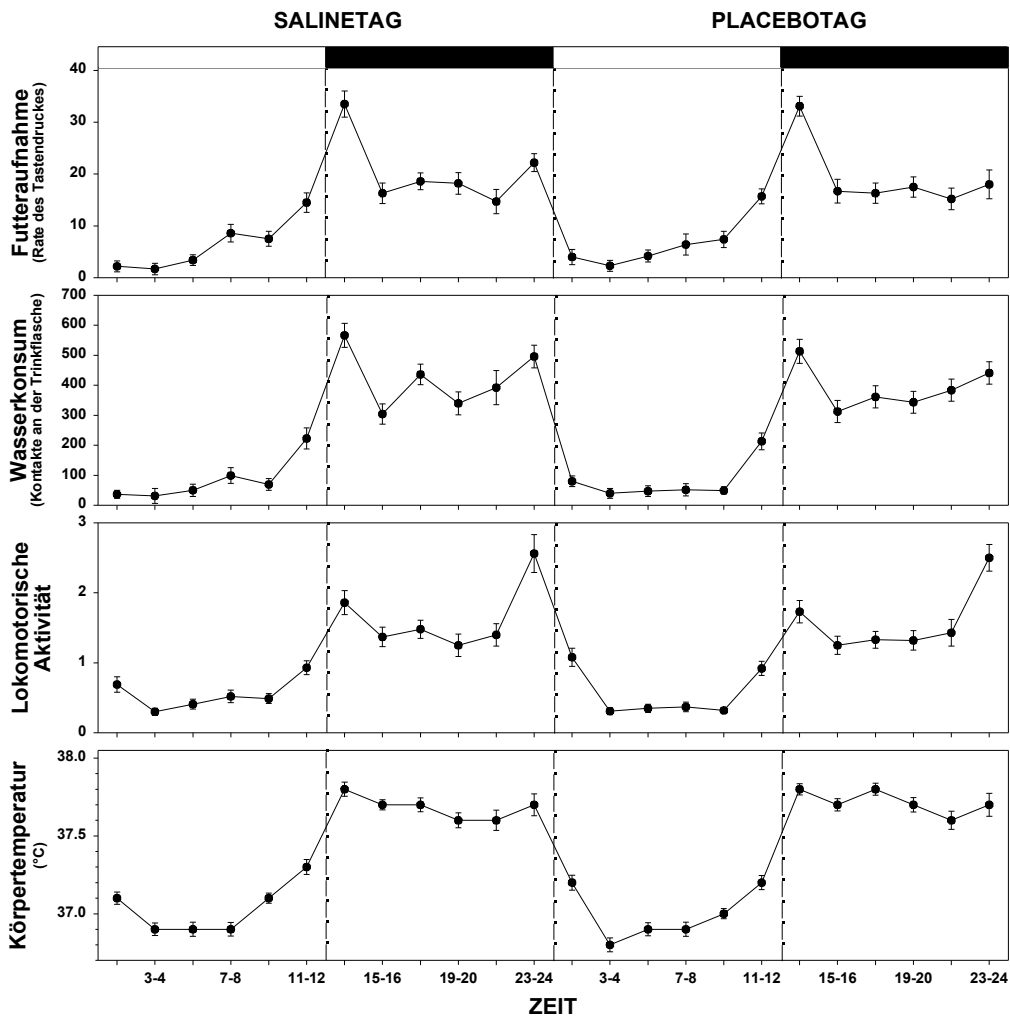


Abb. 16: 24h-Rhythmus von Laborratten (n = 22) für die Parameter Futteraufnahme (als Tastendruck am Futterautomaten), Wasseraufnahme (in Berührungen an der Trinkflasche), lokomotorische Aktivität (in willkürlicher Einheit) und Körpertemperatur (in °C). Dargestellt sind Licht- und Dunkelperiode des Salinetages und des Placebotages in Folge (bitte beachten, daß zu Beginn der Lichtphasen Saline bzw. Vehikel injiziert wurden!). MW ± SEM

3.4. Effekte von Clozapin auf Futter- und Wasseraufnahme, Aktivität und Körpertemperatur

3.4.1. Aktivität und Körpertemperatur

Wie bereits im Rahmen der Schlafaufzeichnungen für die Gehirntemperatur gefunden, war an allen Behandlungstagen während der ersten beiden Stunden nach der Injektion die Körpertemperatur der Clozapin-behandelten Tiere dosisabhängig erniedrigt (siehe Abb. 17, Statistik Tab. 8). Zudem war am ersten Behandlungstag die Körpertemperatur der hochdosierten Gruppe auch im zweiten Zweistundenintervall gegenüber der Vehikel-Gruppe erniedrigt.

Die Aktivität der Tiere war zum gleichen Zeitpunkt unverändert. Lediglich während der Dunkelperiode (Aktivitätsphase), während der keine Unterschiede in der durchschnittlichen Körpertemperatur aller Gruppen auftraten, zeigte die mit 2,5 mg/kg Clozapin behandelte Gruppe weniger Aktivität als die hochdosierte Behandlungsgruppe, ein Unterschied, der am Placebotag nicht zu beobachten war (vgl. Abb. 17). Aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Gruppen war der Unterschied nicht signifikant.

Tab. 11: Effekte der Clozapinbehandlung auf die Körpertemperatur und die Aktivität. Ergebnisse der ANOVA für die einzelnen Behandlungstage.

Versuchstag	ANOVA			
	Effekt			
	Gruppe (Behandlung)		Gruppe x Zeit	
	$F_{2,19} =$	$p \leq$	$F_{22,209} =$	$p \leq$
<i>Körpertemperatur</i>				
Placebotag	3.9	0.04	0.7	0.9
Behandlungstag 1	1.7	0.2	3.4	0.001
Behandlungstag 3	0.1	0.9	5.2	0.001
Behandlungstag 7	0.4	0.7	4.8	0.001
<i>Aktivität</i>				
Placebotag	0.4	0.6	0.5	1.0
Behandlungstag 1	1.1	0.4	1.4	0.1
Behandlungstag 3	0.6	0.6	0.9	0.6
Behandlungstag 7	1.3	0.3	1.4	0.1

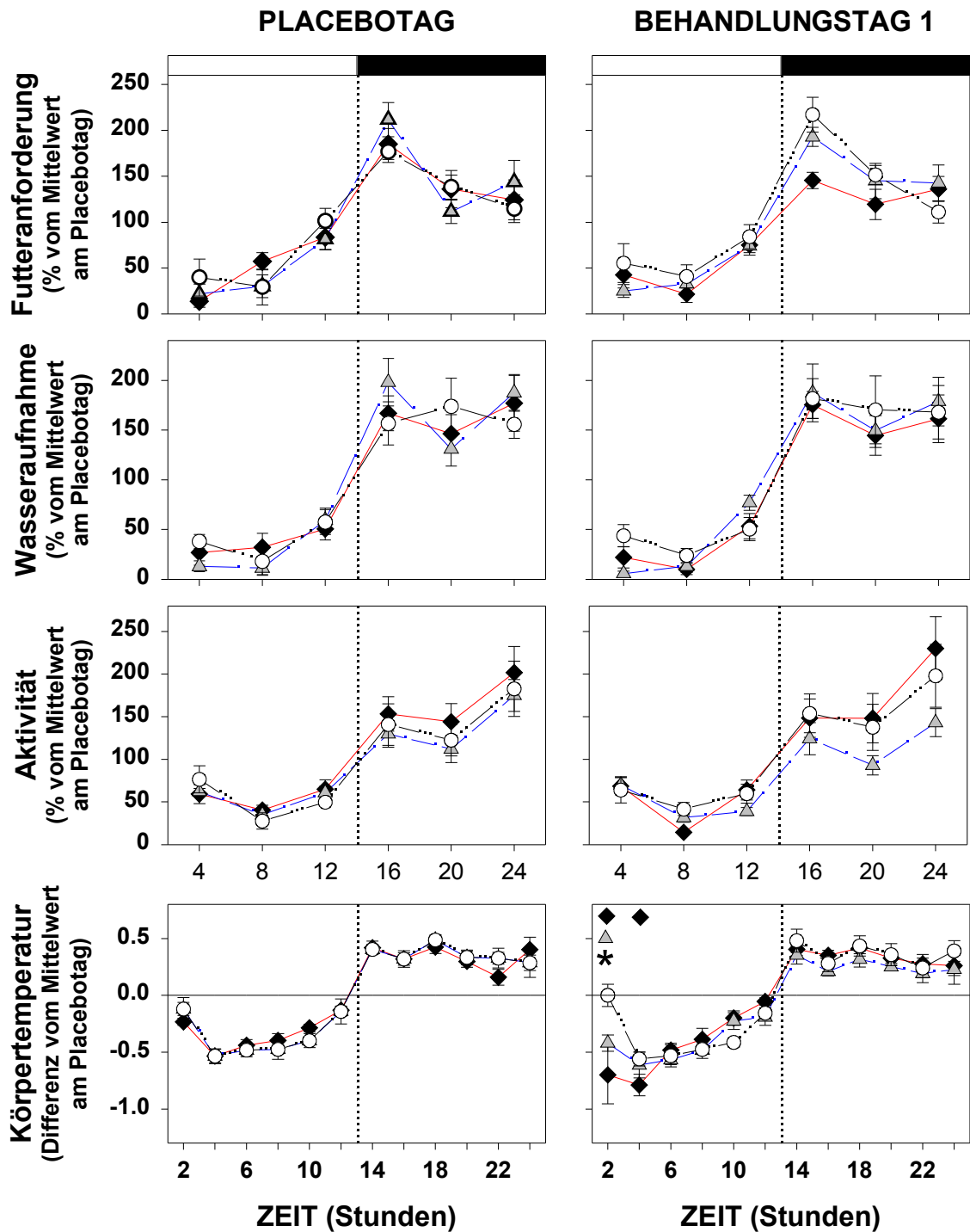
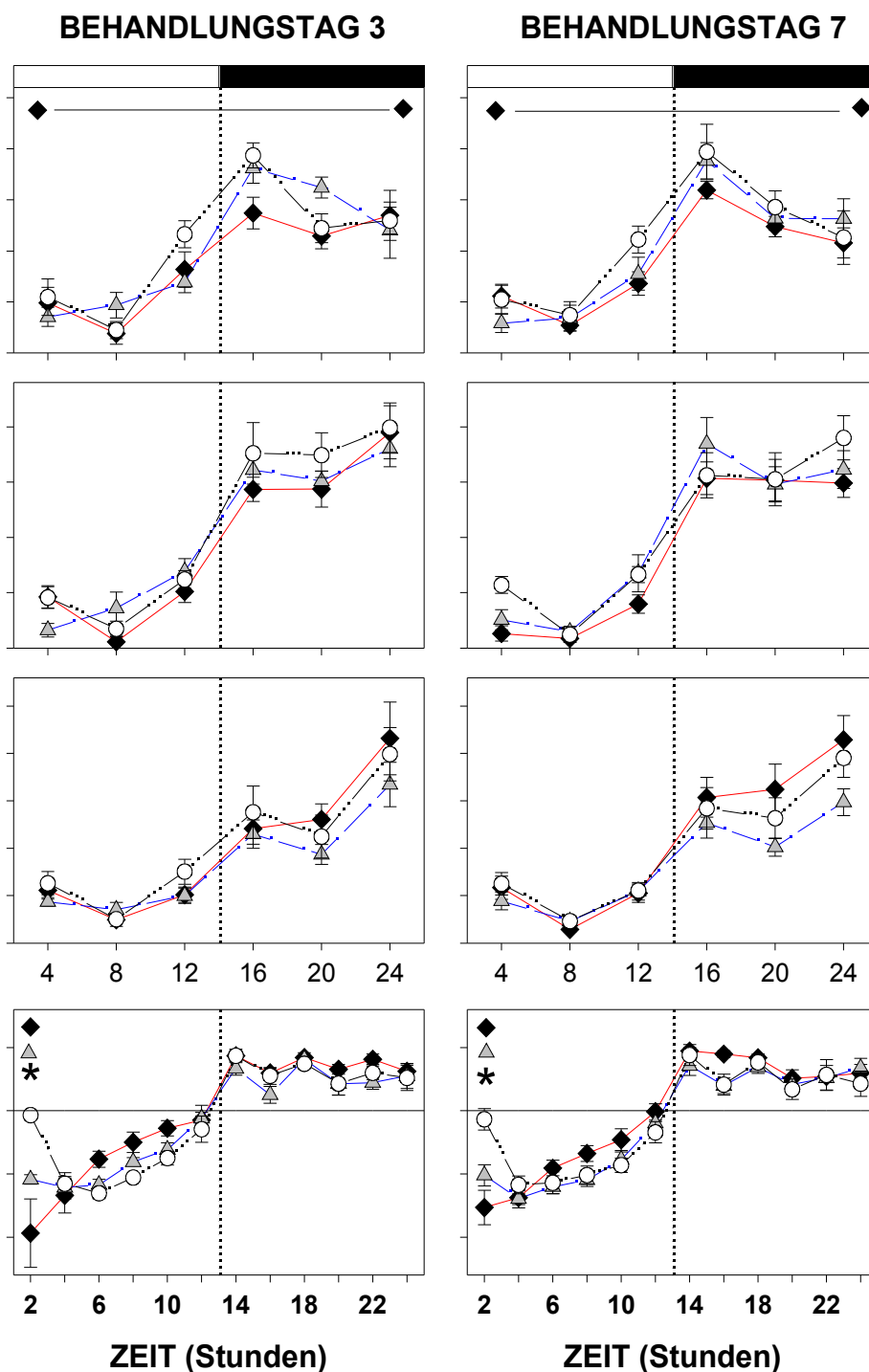


Abb. 17: Futteraufnahme (Tastendruck am Futterautomaten), Wasserkonsum (Berührungen an der Trinkflasche), Aktivität (willkürlich) und Körpertemperatur (Differenz vom Mittelwert am Placebotag) während der Licht- und Dunkelperiode nach i.p. Injektion von Vehikel (n = 7) oder 2,5 (n = 7) bzw. 7,5 mg/kg Clozapin (n = 8). MW ± SEM. Signifikante Unterschiede zur Vehikelgruppe sind durch Gruppensymbole (◆ ▲) verdeutlicht. Der Stern (★) symbolisiert Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Ein in den entsprechenden Gruppensymbolen eingefasster Strich stellt einen Gruppeneffekt über 24 Stunden dar, der sich nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt wiederfinden läßt. $p < 0.05$ (Tukey Test)



Am dritten und siebten Behandlungstag fraßen die Tiere der hochdosierten Behandlungsgruppe während der Licht- und Dunkelperiode weniger als die Tiere der beiden anderen Gruppen. Es traten keine Unterschiede in der Wasseraufnahme und auch nicht im Aktivitätsverhalten der Tiere auf, obwohl es den Anschein hat, daß die niedrigdosiert behandelten Tiere während der Dunkelphase weniger Aktivität zeigten als die Tiere der hochdosierten Behandlungsgruppe. Die Körpertemperatur der Clozapin-behandelten Tiere war über die Gesamtdauer der Clozapinbehandlung im Anschluß an die Injektion dosisabhängig erniedrigt.

3.4.2. Futter- und Wasseraufnahme

Am Kontrolltag traten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen im Freß- oder Trinkverhalten auf. Die Wasseraufnahme war zu keinem Zeitpunkt des Versuches verändert. Für die Futteranforderung ergab die ANOVA am dritten und siebten Behandlungstag einen Gruppeneffekt ($F_{2,19} = 3,4$; $p = 0,05$; bzw. $F_{2,19} = 3,8$; $p = 0,04$). Abb. 17 (Seite 50) zeigt den Verlauf der Futter- und Wasseraufnahme über 24 Stunden in Vierstundenintervallen. Die hochdosierte Gruppe nahm am dritten und siebten Behandlungstag weniger Nahrung zu sich als die beiden anderen Gruppen.

3.4.3. Körpermasse

Bis zu einem Gewicht von ca. 600 g nehmen Ratten täglich an Masse zu. Abb. 18 zeigt den täglichen Massenzuwachs der Tiere vor und während des Biotelemetrie-Versuches. Dazu wurde die Differenz der Massen zweier Meßzeitpunkte durch die Anzahl der dazwischenliegenden Tage geteilt.

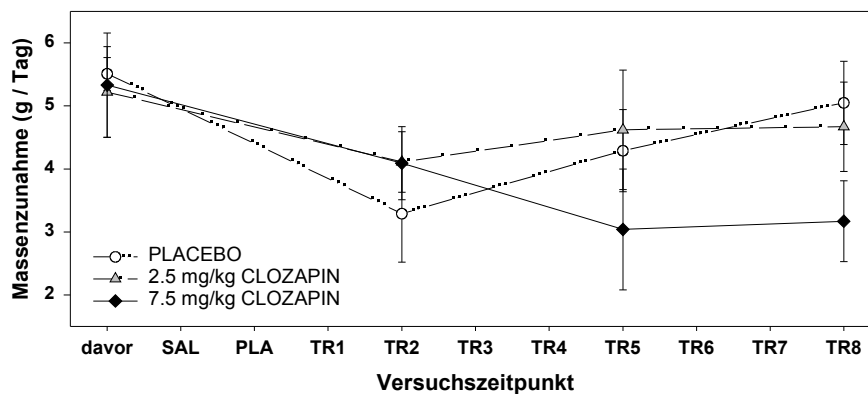


Abb. 18: Massenzuwachs von Ratten während eines Versuches zur subchronischen Gabe von Vehikel ($n = 7$) und Clozapin in den Dosierungen 2,5 ($n = 7$) oder 7,5 mg/kg ($n = 8$) und im Zeitraum davor. Angegeben ist der tägliche Massengewinn in g ($MW \pm SEM$), Meßzeitpunkte sind durch die Gruppensymbole verdeutlicht. SAL = Salinetag, PLA = Vehikeltag, TR1-TR8 = Behandlungstag 1-8. Während der ersten vier Versuchstage nahmen alle Gruppen unabhängig von der Behandlung weniger zu als im Zeitraum vor dem Versuch. Ein Gruppenunterschied und Effekt Gruppe x Zeit wurde nicht gefunden, jedoch befindet sich die Gewichtszunahme der Placebogruppe und der niedrigdosierten Behandlungsgruppe zum Ende des Versuches auf dem Niveau wie vor Beginn des Versuches, während die hochdosierte Behandlungsgruppe weiterhin weniger an Masse zunimmt als vor dem Versuch und als die beiden anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt.

Es wird deutlich, daß allein die Durchführung des Versuches (im vorliegenden Fall die Gabe von Injektionen) eine Verminderung der Gewichtszunahme verursachte, es ergab sich ein Effekt für den Faktor Versuchstag ($F_{3,57}$; $p = 0.04$), der sich nach Tests mit Kontrasten (Tukey Test) als signifikanter Unterschied zwischen dem ersten Meßpunkt während des Versuches und dem Zeitraum vor Beginn des Versuches ermitteln ließ und unabhängig von der Behandlung war.

Im weiteren Versuchsverlauf normalisierte sich die Gewichtszunahme der Vehikelgruppe und der 2,5 mg/kg Clozapin Gruppe rasch wieder, während die Ratten, die 7,5 mg/kg Clozapin erhielten, beständig weniger zunahmten als vor dem Versuch und als die beiden anderen Gruppen zum gleichen Versuchszeitpunkt. In dieser Behandlungsgruppe kam es vor, daß Tiere vorübergehend überhaupt nicht an Masse zulegten. Eine ANOVA konnte jedoch keine Unterschiede aufzeigen.

3.5. Weitere Verhaltensbeobachtungen

Nach intraperitonealer Injektion von Clozapin in Dosierungen ab 7,5 mg/kg Körpergewicht wurden bei vielen, vor allem älteren Tieren (ab 380 g Körpergewicht) folgende Krankheitserscheinungen und Verhaltensabnormalitäten beobachtet: apathisches Dösen, rhythmisches Kopfnicken (Myoklonien) mit gelegentlichem in-den-Nacken-Werfen des Kopfes, verkrampfte, abnorme Haltung (Verdrehen, Anwinkeln) der Vordergliedmaßen, unsichere, verlangsamte Bewegungsabläufe, unmotiviertes Schnüffeln, Luftkauen und Nagen an Einstreu, unregelmäßige, verlangsamte Atmung (selten). Bei einigen Tieren wurde direkt nach Injektion auch ein vorübergehender Abfall der Muskelspannung (insbesondere der Bauchmuskulatur) beobachtet.

Die Symptome traten wenige Minuten nach Verabreichung des Medikamentes auf und hielten bis zu sechs Stunden an. Wiederholte Gabe von Clozapin an den darauffolgenden Tagen verkürzte die Dauer der Symptomphase.

3.6. Einfluß von Clozapin auf humorale Parameter

3.6.1. Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin

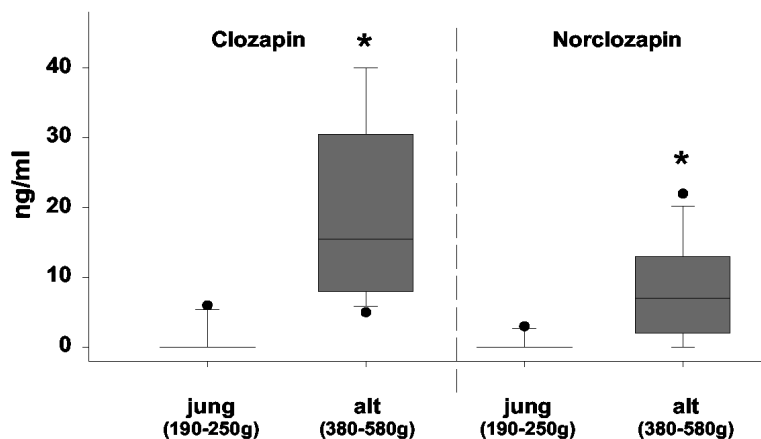


Abb. 19: Box-Plot der Serumkonzentration von Clozapin (links) und seines Metaboliten Norclozapin (rechts) sechs Stunden nach einmaliger Verabreichung von 7,5 mg/kg Clozapin zu Beginn der Lichtphase bei jungen (n = 6) und alten Ratten (n = 8). Dargestellt ist die Streuung der Meßwerte zwischen der 25. und 75. Perzentile sowie der Median und die Standardabweichung, Punkte zeigen Ausreiß-Meßwerte. Die Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin sind bei älteren Tieren signifikant höher als bei jungen Tieren. * Clozapin: $p < 0,005$, * Norclozapin: $p < 0,03$, Mann-Whitney Rank Sum Test

Die meßbaren Konzentrationen von Clozapin und seinem Hauptmetaboliten Norclozapin im Serum erwiesen sich als abhängig von der Körpermasse der Tiere. Schwere Tiere (380 - 580 g) hatten bei gleicher Behandlung höhere Konzentrationen an Clozapin und Norclozapin im Serum als leichte Tiere (190 - 250 g) (siehe Abb. 19).

Bei männlichen Ratten steht das Gewicht in direktem Verhältnis zum Alter. Daher wurde nach jungen und älteren Tieren unterteilt.

Im Serum der vehikelbehandelten Ratten wurden erwartungsgemäß weder

Clozapin noch Norclozapin nachgewiesen. Die Daten dieser Tiere sind daher nicht dargestellt und fanden auch bei der statistischen Bewertung keine Berücksichtigung.

Bei jungen Ratten waren akut nach Gabe von 15 mg/kg Clozapin (n = 10) sechs Stunden nach der Injektion die Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin höher als bei Gabe von 7,5 mg/kg Clozapin (n = 6) (7,5 mg/kg Clozapin: $1,0 \pm 0,8$ ng/ml Clozapin, $0,5 \pm 0,4$ ng/ml Norclozapin; 15 mg/kg Clozapin: $6,9 \pm 2,4$ ng/ml Clozapin, $5,4 \pm 1,9$ ng/ml Norclozapin; $p < 0,05$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

Nach achtmaliger Injektion von 7,5 mg/kg Clozapin war sechs Stunden nach der letzten Applikation die Serumkonzentration von Clozapin, aber nicht von Norclozapin signifikant geringer als zum gleichen Zeitpunkt nach einmaliger Gabe derselben Dosierung (Abb. 20). Nach achtmaliger Gabe von 2,5 mg/kg Clozapin war zu diesem Zeitpunkt weder Clozapin noch Norclozapin im Serum nachweisbar.

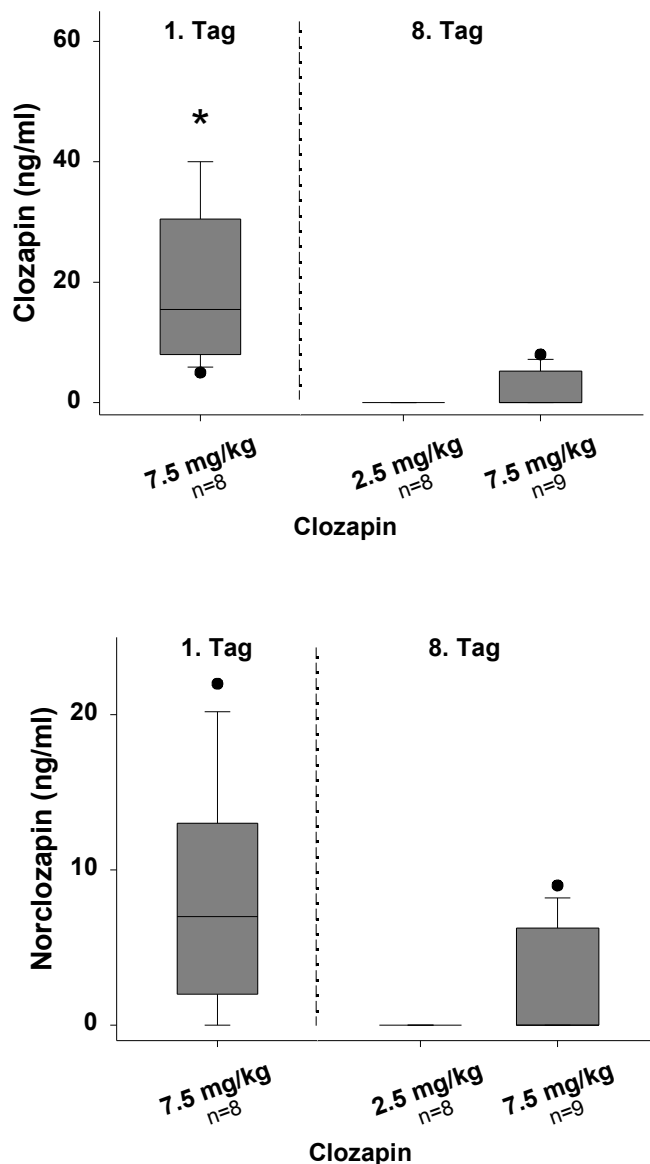


Abb. 20: Box-Plot der Serumkonzentration des Clozapins (oben) und seines Metaboliten Norclozapin (unten) nach einmaliger und achtmaliger Verabreichung von Clozapin in verschiedenen Dosierungen zu Beginn der Lichtphase sechs Stunden nach der letzten Injektion. Dargestellt ist die Streuung der Meßwerte zwischen der 25. und 75. Percentile sowie die Standardabweichung und der Median, Punkte zeigen Ausreiß-Meßwerte. Sowohl ein Einfluß der Dosierung als auch der Anzahl der Verabreichungen auf den Abbau des Clozapins ist erkennbar. * Clozapin: $p < 0,005$, Norclozapin: $p = 0,09$ n.s., Mann-Whitney Rank Sum Test.

3.6.2. Konzentrationen von TNF- α

Serum: Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Stimulation durch Clozapin lagen die Konzentrationen von TNF- α im Serum der Ratten unter der Nachweisgrenze des Kits von 0,7 pg/ml.

in vitro-Kultivierung von Gehirnschnitten: Über die Technik der *in vitro*-Kultivierung von Gehirnschnitten in Kulturmedium ließen sich keine konstanten Ergebnisse bezüglich der Bildung von TNF- α nach Stimulation durch Clozapin erzielen. In Abhängigkeit von den Versuchsansätzen wurden entweder erhöhte oder unveränderte Konzentrationen von TNF- α nach Zugabe von Clozapin im Vergleich zu clozapinfreien Ansätzen gemessen und die Technik als unzuverlässig aufgegeben.

Bei selektiver Beseitigung phagozytischer Zellen durch Clodronat wurde ein veränderter Verlauf der Bildung von TNF- α beobachtet (siehe Abb. 21). Zwei Stunden vor Zugabe von Clozapin inkubierten die Gehirnschnitte teils ohne, teils mit Clodronat. In dieser Zeit wurde kein TNF- α gebildet (Zeitpunkt 0 in Abb. 21). Nach Zugabe von Clozapin (gelöst in DMSO) bzw. DMSO (zu Kontrollzwecken) setzte in nicht vorbehandelten Schnitten eine sofortige Produktion von TNF- α ein (offene Symbole in Abb. 21). In Gehirnschnitten mit eliminerter Makrophagen-Population (gefüllte Symbole in Abb. 21) begann eine nennenswerte Bildung von TNF- α mit einer Stunde Verzögerung und erfolgte dann mit äquivalentem Anstieg zu den unbehandelten Proben.

Gehirngewebe in vivo: Im frontalen Kortex von Ratten wurde nach einmaliger Injektion von 7,5 oder 15 mg/kg Clozapin sechs Stunden später eine dosisabhängige Erhöhung von TNF- α im Vergleich zu Vehikel-Gabe gefunden ($F_{2,26} = 6$, $p = 0.004$, ANOVA). Diese Erhöhung wurde für die hohe Dosierung statistisch signifikant (siehe Abb. 22). Nach subchronischer Behandlung

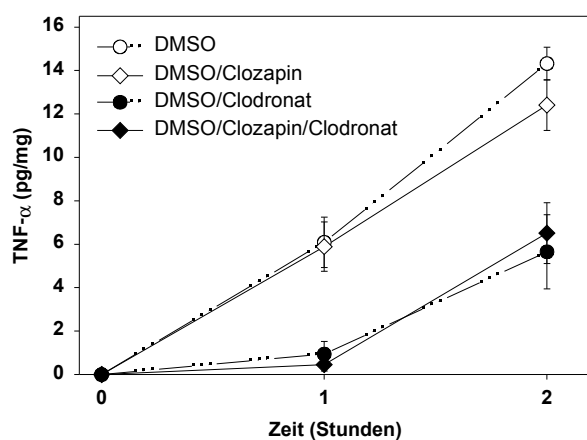


Abb. 21: In vitro Produktion von TNF- α durch Gehirnschnitte (Kortex; je $n = 8$) nach Stimulation mit Clozapin und/oder DMSO mit und ohne Elimination phagozytischer Zellen durch Clodronat. Zum Zeitpunkt 0 inkubierten die Schnitte seit zwei Stunden mit (gefüllte Symbole) oder ohne Clodronat (offene Symbole). Es erfolgte eine Probenahme und die Zugabe von Clozapin (gelöst in DMSO) oder DMSO (zu Kontrollzwecken). In mit Clodronat vorbehandelten Schnitten setzte die Bildung von TNF- α mit einer Stunde Verzögerung ein.

mit 2,5 oder 7,5 mg/kg Clozapin (über acht Tage) wurde kein Unterschied der TNF- α -Konzentrationen im frontalen Kortex gefunden (siehe Abb. 22).

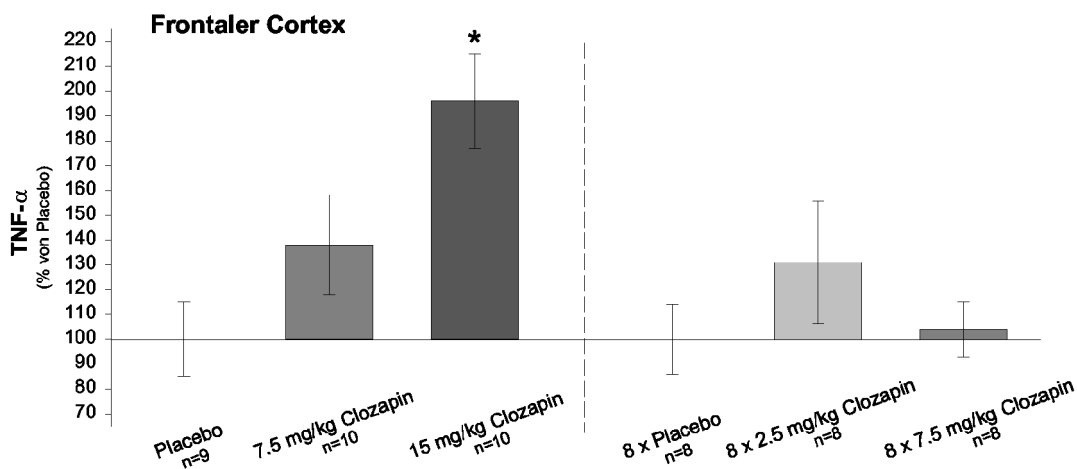
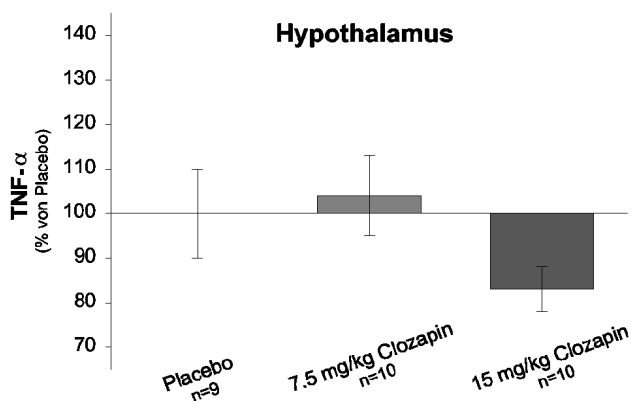


Abb. 22: TNF- α -Konzentrationen im frontalen Kortex nach akuter und subchronischer Behandlung (i.p.) mit verschiedenen Dosierungen von Clozapin in Prozent von Vehikel sechs Stunden nach der letzten Injektion. Nach akuter Gabe einer hohen Clozapindosis waren die TNF- α -Level erhöht, nach subchronischer Verabreichung traten keine Unterschiede zu Vehikel-behandelten Tieren auf. MW \pm SEM, * $p < 0.005$ (Tukey Test)



Im Hypothalamus von Ratten konnten nach akuter Behandlung mit 7,5 oder 15 mg/kg Clozapin sechs Stunden nach Injektion im Vergleich zur Vehikel-Behandlung keine Veränderungen der TNF- α -Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 23).

Abb. 23: TNF- α -Konzentrationen im Hypothalamus nach akuter Gabe (i.p.) von Clozapin (in Prozent von Vehikel) sechs Stunden nach der letzten Injektion. MW \pm SEM

3.6.3. Serumkonzentrationen von Leptin

Die Konzentrationen von Leptin im Serum unterlagen einer Abhängigkeit vom Alter bzw. vom Gewicht der Tiere. Ältere, bzw. schwere Tiere (380 - 580 g) wiesen nach einmaliger Verabreichung von Vehikel sechs Stunden nach Injektion höhere Serumkonzentrationen von Leptin auf als junge Tiere (190 - 250 g) (Abb. 24).

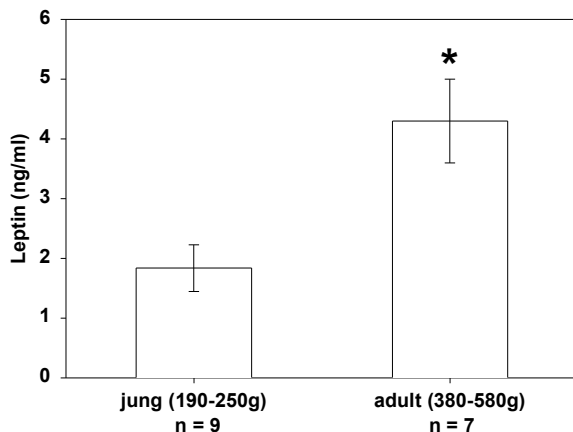


Abb. 24: Serumkonzentrationen von Leptin bei jungen (190 - 250 g) und adulten Ratten (380 - 580 g) zur Mitte der Ruheperiode nach einer Vehikelinjektion zu Beginn der Ruheperiode. Junge Ratten weisen niedrigere Leptinwerte im Serum auf als ältere Tiere. MW ± SEM. * p < 0.01, t-test

Eine Behandlung mit Clozapin resultierte bei den älteren Tieren (380 - 580 g) unabhängig von der Anzahl der Behandlungswiederholungen nicht in einer Veränderung der Serum-Leptinkonzentrationen (Tab. 12).

Tab. 12: Serumkonzentrationen von Leptin in ng/ml bei adulten Ratten (380 - 580 g) nach Vehikel- oder Clozapingabe.

Behandlung	Anzahl der Behandlungen	
	1	8
Vehikel	4,26	4,11
2,5 mg/kg Clozapin	—	4,19
7,5 mg/kg Clozapin	4,55	4,85

Bei den jungen Tieren (Abb. 25) führte die Gabe von Clozapin (7,5 oder 15 mg/kg) zu einer dosis-abhängigen Erhöhung der Serumkonzentrationen von Leptin ($F_{2,22} = 7.8$, $p < 0.005$, ANOVA).

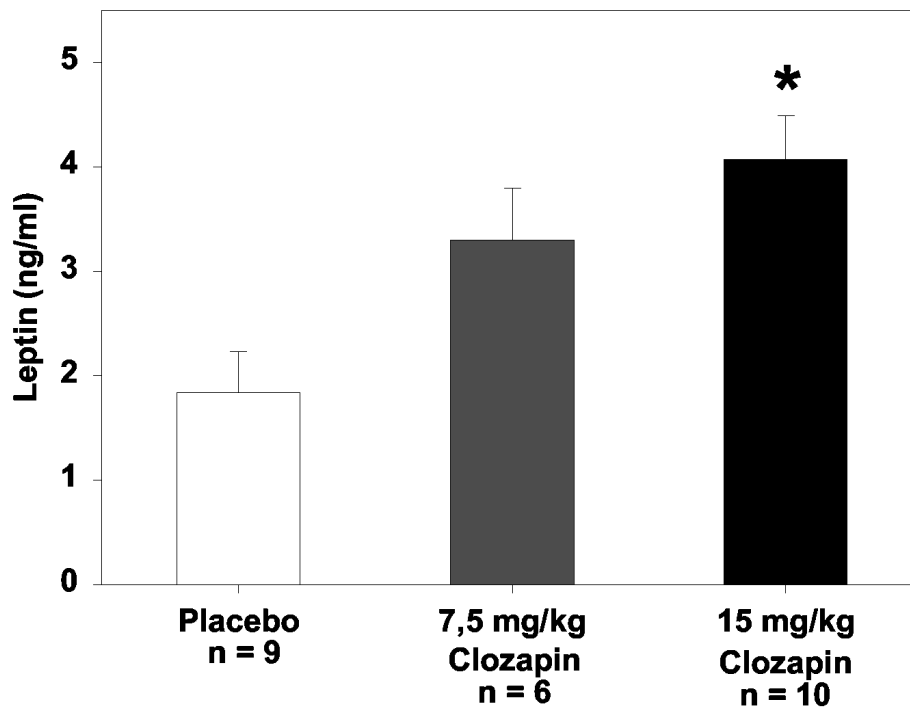


Abb. 25: Konzentrationen von Leptin im Serum junger Ratten nach einmaliger Behandlung mit Clozapin (7,5 oder 15 mg/kg) im Vergleich zu einer Vehikelbehandlung sechs Stunden nach Injektion. Clozapin verursacht einen dosisabhängigen Anstieg von Leptin. MW \pm SEM, * $p < 0.005$ (Tukey Test)

4. Diskussion

Eine Vielzahl von Effekten von Clozapin auf das Verhalten, insbesondere das Schlafverhalten, und auf Immunparameter von Ratten konnte gefunden werden. Dies waren im einzelnen:

- Förderung des non-REM-Schlafes bei akuter und subchronischer Behandlung nach anfänglicher Störung des Schlafes bei Verwendung hoher Dosierungen,
- Verringerung des pre-REM- und des REM-Schlafes unter Verlängerung der REM-Schlaf-Latenz,
- Verbesserung der Schlafkontinuität (Verminderung der Anzahl bei Verlängerung der Dauer der non-REM-Schlaf-Episoden),
- vorübergehende Unterdrückung der Aktivität langsamer Wellen im EEG des non-REM-Schlafes bei Anwendung hoher Dosierungen von Clozapin,
- Generierung von EEG-Veränderungen während des Wachseins,
- dosisabhängige Senkung der Gehirn- und Körpertemperatur, der frühestens sechs Stunden nach akuter und subchronischer Behandlung eine leichte Erhöhung der Temperatur folgt,
- Verminderung der Futter-, aber nicht der Wasseraufnahme nach wiederholter Behandlung mit hohen Dosierungen bei tendentiell geringerem Gewichtszuwachs,
- dosisabhängiger Anstieg der Konzentration von TNF- α im Frontalen Kortex und der Serumkonzentration von Leptin sechs Stunden nach einer Akutbehandlung,
- Verzögerte Eliminierung von Clozapin und seinem Hauptmetaboliten Norclozapin aus dem Serum von schweren (älteren) Ratten im Vergleich zu leichten (jüngeren) Ratten,
- Beschleunigte Eliminierung von Clozapin, aber nicht von Norclozapin, aus dem Serum von Ratten nach subchronischer Behandlung im Vergleich zu einer Akutbehandlung mit Clozapin.

4.1. Effekte von Clozapin auf den Schlaf der Ratte

Bei einmaliger Verabreichung von Clozapin wurde der non-REM-Schlaf der Ratte über die Gesamtzeit der Ruhephase gefördert, jedoch nicht durch eine Erhöhung der Aktivität langsamer Wellen intensiviert. Auch nach chronischer Behandlung mit Clozapin war die Dauer des non-REM-Schlafes zeitweilig vermehrt. Dabei nahm die Anzahl der non-REM-Episoden ab, die Dauer der einzelnen Episoden zu. Die Einschlaf-Latenz war nicht beeinflusst. Clozapin sorgte also für eine verbesserte Aufrechterhaltung des Schlafes wobei Aufwachmechanismen unterdrückt wurden, nicht jedoch für eine Vertiefung des Schlafes oder für seine Initialisierung.

Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den konsistenten Befunden aus

Patientenstudien, daß Clozapin eine Verbesserung der Schlafkontinuität, respektive eine Vermehrung der totalen Schlafzeit aufgrund einer Vermehrung des non-REM-Schlafes Stadium 2 und eine Reduktion der Wachzeit hervorruft (Wetter et al., 1996; Hinze-Selch et al., 1997; Lee et al., 2001). Dabei wurde der Tiefschlaf nicht beeinflusst (Wetter et al., 1996; Lee et al., 2001) oder unterdrückt (Hinze-Selch et al., 1997). Wetter et al. (1996) fanden außerdem eine Verkürzung der Einschlafzeit, die auch in anderen Studien tendentiell zu beobachten ist, im Tierversuch jedoch nicht nachvollzogen werden konnte. Eine Erklärung findet sich möglicherweise im Design der Studien. Als Kontrollgruppen dienten Wetter et al. unbehandelte schizophrene Patienten, deren Einschlafzeit bekanntermaßen verlängert ist (Kupfer et al., 1979; Jus et al., 1973; Ganguli et al., 1987; Tandon et al., 1992; Lauer et al., 1997). Im Vergleich der Clozapin-behandelten Patientengruppe mit Patienten unter Medikation mit typischen Neuroleptika (Wetter et al., 1996) oder mit Gesunden findet sich dagegen kein Unterschied in der Einschlafzeit (Lee et al., 2001). Da an der vorliegenden Tierstudie gesunde Ratten teilgenommen haben, war Clozapin möglicherweise nicht in der Lage, die Einschlafzeit unter das normale Maß zu verkürzen.

Ganz im Gegenteil, nach erstmaliger Gabe der hohen Clozapindosierung wurde die Schlafkonsolidierung zunächst empfindlich gestört. Die Ratten schliefen ein, wachten jedoch kurz darauf wieder auf, wodurch der Wachanteil auf 80 % stieg. Die sehr kurzen non-REM-Schlaf-Episoden stellen einen möglichen Grund dar, weshalb die Aktivität langsamer Wellen in diesem Zeitraum beträchtlich vermindert war und REM-Schlaf überhaupt nicht auftrat. Allerdings waren die slow-wave Aktivität und in geringem Ausmaß der REM-Schlaf auch zu Beginn des dritten Behandlungstages unterdrückt, während der non-REM-Schlaf zu diesem Zeitpunkt nicht beeinflusst war. bemerkenswerterweise folgte diesen Reduktionen der Aktivität langsamer Wellen keine kompensatorische Erhöhung der SWA in den den folgenden Stunden, wie es nach einem Schlafentzug der Fall ist (Meerlo & Turek, 2001).

Ein Nachweis einer schlafstörenden Wirkung des Clozapins mit ähnlichem Profil existiert in der Humanliteratur in Zusammenhang mit Clozapin-induziertem Fieber, wobei die Schlafeffizienz aufgrund einer Zunahme der Wachzeit und einer Unterdrückung des Tief- und des REM-Schlafes abnahm (Hinze-Selch et al., 1995). Ein weiterer Hinweis könnte eine bereits 1973 veröffentlichte Arbeit von Blum & Girke sein. Die Autoren fanden bei Patienten unter Clozapin-induziertem Fieber einen Anstieg des REM-Schlafes auf über 85%, wie er in keiner folgenden Studie verifiziert werden konnte. Angesichts der Tatsache, daß Clozapin die Muskelaktivität im EMG vermindert, ist möglicherweise ein anhaltender Wachzustand irrtümlich als REM-Schlaf ausgewiesen worden (Hinze-Selch et al., 1995).

Die schlafstörende Wirkung des Clozapins ist in diesen Fällen vermutlich auf die Stimulation des Immunsystems zurückzuführen. Clozapin-induziertes Fieber geht mit einem erheblichen Anstieg der Zytokine IL-6 und TNF- α einher (Pollmächer et al., 1996), die ihrerseits in hohen Konzentrationen eine Störung des Schlafes verursachen (Späth-Schwalbe et al., 1998; Mullington

et al., 2000). Diese Mechanismen könnten auch für die anfängliche Unterdrückung des Schlafes von Ratten nach hochdosierter Behandlung mit Clozapin verantwortlich sein, da gezeigt werden konnte, daß Clozapin bei Ratten einen dosisabhängigen Anstieg von TNF- α bewirkt (s.u.).

Unabhängig von den Effekten auf den non-REM-Schlaf unterdrückte Clozapin zu Beginn der Lichtphase signifikant den REM-Schlaf, was sich in einer erheblichen Verlängerung der REM-Latenz und einer Verminderung der Anzahl der REM-Episoden am ersten Behandlungstag widerspiegelte. Dem Auftreten von REM-Schlaf geht stets das Stadium non-REM-Schlaf voraus. Eine starke Fragmentierung des non-REM-Schlafes resultiert unweigerlich in einer Limitierung des REM-Schlafes. Zusätzlich war der REM-Schlaf auch dann vermindert, wenn der non-REM-Schlaf stark vermehrt war, woraus sich schlußfolgern läßt, daß Clozapin den REM-Schlaf aktiv unterdrückt und dessen Verminderung nicht nur eine kausale Folge der non-REM-Schlaf-Unterdrückung ist.

Eine Unterdrückung des REM-Schlafes durch Clozapin ist bei Menschen außer im Zusammenhang mit Fieber (Hinze-Selch et al., 1995) nur für Gesunde bei Langzeitbehandlung (12,5 mg) berichtet worden (Touyz et al., 1978). Eine Verlängerung der REM-Latenz auf das Doppelte wurde nur im Vergleich mit per typischer Neuroleptika behandelter Patienten gefunden, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Wetter et al., 1996). Eine Beeinflussung des REM-Schlafes durch Clozapin läßt sich für den Menschen also nicht sichern. Allerdings unterscheidet sich die Behandlung beim Patienten, die Clozapin in langsam steigender Dosierung erhalten, grundlegend von der bei Tieren, die hohe Dosierungen des Medikamentes ohne vorherige Gewöhnung erhalten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob die Effekte auf den REM-Schlaf der Ratten auch bei langsamer Dosissteigerung (z.B. von 0,5 auf 5 mg/kg) auftreten. Andererseits ist der REM-Schlaf sehr stark circadian reguliert, so daß sich hier möglicherweise das Limit ergibt, ein nachtaktives Labortier mit dem tagaktiven Menschen vergleichen zu wollen.

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Effekte von Clozapin auf den Schlaf von Menschen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist der Tab. 13 zu entnehmen. Dabei wird zwischen den Wirkungen der hohen und der niedrigen Clozapindosierung auf den Schlaf der Ratten nicht unterschieden, da sie qualitativ gleich sind und sich nur in der Quantität und ihrem zeitlichen Verlauf unterscheiden. Beide Dosierungen vermehren den non-REM-Schlaf: die hohe Dosierung (7,5 mg/kg) über die gesamte Dauer der Behandlung, die niedrige Dosierung (2,5 mg/kg) am siebenten Behandlungstag. Bei beiden Dosierungen ist dies mit einer Verbesserung der Schlafkontinuität verbunden; ablesbar aus der Tatsache, daß die Anzahl der non-REM-Episoden ab-, die Dauer der non-REM-Episoden zunimmt. Bei der hohen Dosierung traten die Effekte auf die Schlafarchitektur vor allem an den ersten Behandlungstagen auf mit Tendenz zur Toleranzentwicklung, bei der niedrigen Dosierung traten diese Effekte erst nach mehrmaliger Behandlung auf. Beide Dosierungen unterdrücken den REM-Schlaf. Zwar war die Verminderung des Anteils des REM-Schlafes nur für die hohe Dosierung am ersten Behandlungstag signifikant,

doch zeigte sich eine Verlängerung der REM-Schlaf-Latenz für beide Dosierungen: bei 7,5 mg/kg Clozapin am ersten und dritten Behandlungstag, bei 2,5 mg/kg am letzten Versuchstag.

Tab. 13: Effekte von Clozapin auf den Schlaf von Menschen und von Ratten. Die Quellen der Daten aus Humanstudien wurde jeweils hinter den entsprechenden Ergebnissen ausgewiesen.

Schlafparameter	Humanstudien	Ratten
Schlafkontinuität	↑ ^{a, b, c, d}	↑
Einschlaflatenz	↓ ^b	↔
REM-Schlaflatenz	↔ ^{a, b, c, d}	↑
non-REM-Schlafmenge	↑ ^{b, c, d}	↑
Stadium 2	↑ ^{b, c, d}	nicht bestimmbar
Stadium 4	↓ ^{a, c}	nicht bestimmbar
SWA	nicht bestimmt	↓
REM-Schlafmenge	↓ ^a	↓
Wachzeit	↓ ^{c, d}	↓

^aTouyz et al., 1977, 1978

^bWetter et al., 1996

^cHinze-Selch et al., 1997

^dLee et al., 2001

Die Ergebnisse der Humanstudien sind abhängig vom Versuchsdesign, den Untersuchungsgruppen und der verwendeten Dosierung nicht einheitlich. Unumstritten sind die Befunde bezüglich der Schlafkontinuität und des non-REM-Schlafes (Anstieg der non-REM-Schlafmenge, vor allem des Stadiums 2), die in vergleichbarer Form auch im Tierexperiment nachgewiesen wurden. Ungeklärt bleiben die unterschiedlichen Reaktionen von Mensch und Tier auf Clozapin bezüglich des REM-Schlafes.

Die vorgelegten Befunde über den Einfluß des Clozapins auf das Schlafverhalten von Ratten befinden sich in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Veröffentlichungen. Bevor die Tierstudien erläutert werden, seien einige Worte zum pre-REM-Schlaf ergänzt. Der pre-REM-Schlaf ist der Vorbote des REM-Schlafes. Die elektrophysiologischen Hintergründe der Entstehung dieses EEG-Musters sind ungeklärt, ebenso die funktionelle Bedeutung, die diesem Schlafstadium zukommt; eine Rolle bei der Verarbeitung neuer Erfahrungen wird vermutet (Schiffelholz & Aldenhoff, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde der pre-REM-Schlaf unter Clozapinbehandlung erstmals erfaßt. In früheren Veröffentlichungen ordneten die Autoren die entsprechenden EEG-Signale dem non-REM-Schlaf zu. Die vorliegende Studie zeigt, daß der Verlauf des pre-REM-Schlafes über die Ruheperiode dem REM-Schlaf gleicht und in einem Modell der Stimulation mit Clozapin dieselbe regulatorische Einflußnahme erfährt wie der REM-Schlaf. Der pre-REM-Schlaf scheint in diesem Fall also eher mit dem REM-Schlaf assoziiert zu

sein, was bedeutet, daß ein Zusammenfassen von pre-REM-Schlaf und non-REM-Schlaf Effekte auf den non-REM-Schlaf verschleiern kann. Im Falle des Clozapins kann bei dieser Verfahrensweise eine Vermehrung des Stadiums non-REM aufgrund der Reduktion des pre-REM-Schlafes unerkant bleiben.

Spierings et al. (1977) untersuchten die Effekte von akuter und subchronischer intra-peritonealer Gabe von Clozapin auf die Schlafstadienverteilung bei Ratten in der Mitte der Lichtperiode. Zu diesem Zeitpunkt der circadianen Phase ist unter Normalbedingungen der Anteil des non-REM-Schlafes relativ gering, der Anteil des REM-Schlafes am höchsten. In einem Dosisbereich zwischen 2,5 - 20 mg/kg Clozapin fanden die Autoren eine dosisabhängige Unterdrückung des REM-Schlafes, aber keine Effekte auf den non-REM-Schlaf. Bei chronischer Gabe von 2 x 20 mg/kg Clozapin (am Anfang und im letzten Viertel der Lichtphase) beobachteten sie nebst einer Verminderung des Anteils des REM-Schlafes auch eine Vermehrung des non-REM-Schlafes, die auch nach Absetzen des Clozapins anhielt.

Ongini et al. (1993) untersuchten den Einfluß niedriger Clozapindosierungen (0,3 - 3 mg/kg subcutan) auf den Anteil der Schlafstadien und auf die Architektur des REM-Schlafes von Ratten zwei Stunden nach Beginn der Ruhephase, also zu einem Zeitpunkt, zu dem der Anteil des non-REM-Schlafes relativ hoch ist während der Anteil des REM-Schlafes noch im Ansteigen begriffen ist. Die niedrigste Dosierung verlängerte die non-REM-Dauer und die totale Schlafzeit ohne den REM-Schlaf zu beeinflussen. Ab 1 mg/kg Clozapin s.c. unterdrückte Clozapin dosisabhängig den REM-Schlaf durch Verlängerung der REM-Schlaf-Latenz, Verringerung der Anzahl der REM-Schlaf-Episoden und der totalen REM-Schlaf-Dauer. Effekte auf den non-REM-Schlaf wurden bei diesen Dosierungen nicht beobachtet.

In Zusammenfassung der verfügbaren Tierstudien stellt die Unterdrückung des REM-Schlafes durch Clozapin einen robusten, dosisabhängigen Effekt dar, während die Einflußnahme auf den non-REM-Schlaf möglicherweise stark von der circadianen Phase zum Zeitpunkt der Clozapin-gabe abhängt. Derartige Beobachtungen sind bei Ratten auch für andere Substanzen bekannt, so für die Zytokine IL-1 und TNF- α .

4.2. Mechanismen der Einflußnahme von Clozapin auf das Schlafverhalten

Die Effekte von Clozapin auf den Schlaf der Ratte sind mit denen nach Gabe von TNF- α vergleichbar. Wie Clozapin vermehrt TNF- α den non-REM-Schlaf und unterdrückt bei hoher Dosierung den REM-Schlaf aufgrund einer Verminderung der Anzahl der REM-Schlaf-Episoden (Shoham et al., 1987; Kapás et al., 1992; Takahashi et al., 1996b, 1999; Fang et al., 1997; Terao et al., 1998; Kubota et al., 2001). Injektionen von TNF- α in den Locus coeruleus unterdrücken bei Ratten initial den non-REM-Schlaf, während es im Anschluß zu einer Förderung des non-REM Schlafes kommt (Nistico et al., 1992). Im Gegensatz zu Clozapin erhöht TNF- α die SWA

bei Ratten (Kubota et al., 2001), hohe Dosierungen unterdrücken die SWA bei Mäusen (Fang et al., 1997).

Die Vermehrung des non-REM-Schlafes kann durch Cyclooxygenase-2-Inhibitoren vollständig aufgehoben werden (Terao et al., 1998). Die Wirkung von TNF- α auf den non-REM-Schlaf ist also vermutlich auf einen TNF- α -induzierten Anstieg der Prostaglandin-Synthese (Dinarello et al., 1986) zurückzuführen. Die Effekte von TNF- α auf den REM-Schlaf werden durch Cyclooxygenase-2-Inhibitoren nicht verändert (Terao et al., 1998). Die Einflußnahme von TNF- α auf den non-REM- und den REM-Schlaf geht also über unabhängige Mechanismen vonstatten. Dies deckt sich mit dem Eindruck von den Clozapin-induzierten Effekten auf diese Schlafstadien.

Da Clozapin die Freisetzung von TNF- α stimuliert, könnten die unter Clozapinbehandlung beobachteten Schlafveränderungen auf die Aktivität von TNF- α zurückzuführen sein. Jedoch beeinflusst Clozapin eine Vielzahl von Neurotransmitter- und Hormonsystemen, die in der Regulation des Schlafverhalten involviert sein können, so daß TNF- α nicht als alleiniger Vermittler der Effekte des Clozapins in Frage kommt. Im Folgenden werden einige der Mechanismen vorgestellt, über die Clozapin auf die Schlafregulation Einfluß nehmen kann.

Serotonin. Eine Verbindung zwischen Schlaf und dem serotonergen System ist schon lange bekannt, doch bis heute noch nicht geklärt. Zunächst hatte man festgestellt, daß die Zerstörung der serotonergen Raphekerne bei der Katze zu einer tagelang anhaltenden Insomnie führt (Dahlström & Fuxe, 1964; Jouvet, 1968; 1972). Man vermutete, daß Serotonin ein schlafregulierender Neurotransmitter ist. Als McGinty & Harper (1976) fanden, daß die Feuerungsrate der serotonergen Neuronen als auch die Serotonin-Ausschüttung in den Raphekernen während des Wachseins am höchsten ist, im non-REM-Schlaf stark absinkt und während des REM-Schlafes zum Erliegen kommt, schien dies einer Rolle des Serotonins bei der Schlafinitiation zu widersprechen. Das Zweikomponentenmodell der Schlafregulation (Borbély, 1982) deckt eine Möglichkeit auf, beide Befunde miteinander zu vereinbaren: Die Serotoninausschüttung und die Feuerungsrate serotonerger Neuronen entsprechen in hervorragender Weise der homeostatischen Komponente S, die im Wachen ansteigt und während des Schlafes abnimmt. Das serotonerge System in den Raphekernen könnte daher Ausdruck oder Bestandteil der homeostatischen Komponente S sein, indem die Konzentration von Serotonin und/oder die Dauer oder Intensität der Entladungen serotonerger Neuronen im Verlauf des Wachseins einen Schwellenwert überschreiten und somit Schlaf auslösen (Jouvet, 1999). In diesem Modell führt eine Läsion der serotonergen Neuronen zur Insomnie, weil der Prozeß S nicht mehr oder nur noch mit starker zeitlicher Verzögerung ansteigen kann.

Solange die Rolle des serotonergen Systems bei der Schlaf-Wach-Regulation nicht eindeutig geklärt ist, sind die Auswirkungen von Manipulationen an diesem System auf das Schlaf-Wach-Verhalten schwer interpretierbar. Studien mit Rezeptorantagonisten haben ergeben, daß die

Blockade von 5HT₂-Rezeptoren non-REM-Schlaf-fördernd wirkt (Wilkinson & Dourish, 1991; Stutzmann et al., 1992;) und den REM-Schlaf unterdrückt (Dugovic et al., 1989; Wilkinson & Dourish, 1991), während 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten geringfügig den leichten Schlaf unterdrücken und den Anteil des REM-Schlafes vermehren (Adrien et al., 1992; Rothe et al., 1994).

Clozapin blockiert eine Vielzahl von Serotoninrezeptoren: 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, 5HT₆, 5HT₇. Besonders hohe Bindungsaffinität besitzen Clozapin als auch sein Metabolit Norclozapin zu 5HT₂-Rezeptoren. Die langanhaltende Sedierung bei Gabe von Clozapin könnte daher auf die antagonistische Wirkung des Clozapins und seines Hauptmetaboliten Norclozapin an 5HT₂-Rezeptoren zurückzuführen sein.

GABA und Neurosteroide. Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter. Der GABA_A-Rezeptor ist ein Cl⁻-Ionen-Kanal, der bei Bindung des Liganden geöffnet wird. Es kommt zu einem Einstrom negativer Ladungen in das Zellinnere und damit zur Depolarisation der Zellmembran: die Zelle verliert ihre Leitfähigkeit für elektrische Potentiale. Schlafmittel aus der Gruppe der Benzodiazepine wirken über agonistische Bindung am GABA_A-Rezeptor, wobei die Einschlafzeit verkürzt, die Schlaffektivität erhöht, der Tiefschlaf und der REM-Schlaf jedoch unterdrückt werden. Es wäre naheliegend, die Ursache für die sedierende Wirkung einer Substanz zunächst an diesem Rezeptor zu suchen, jedoch ist die Einflußnahme von Clozapin auf das GABAerge System nur wenig untersucht worden. Marco et al. (1976, 1978) und Mao et al. (1977) wiesen nach, daß Clozapin den Umsatz von GABA im Nucleus accumbens, in der Substantia nigra und im Nucleus caudatus steigert. Dies könnte ein Hinweis sein, daß Clozapin in diesen Regionen GABA-Rezeptoren blockiert.

Außerdem fanden Barbaccia et al. (2001), daß die Verabreichung von Clozapin bei Ratten die Hirnkonzentration von Steroidhormonen, speziell Allopregnanolon, Progesteron und THDOC (Allotetrahydrodeoxycorticosterone) im Kortex und im Striatum steigert. Allopregnanolon und THDOC wirken am GABA_A-Rezeptor als allosterische Modulatoren (Majewska, 1992; Rupprecht & Holsboer, 1999). Das bedeutet, daß sie die Bindung von GABA am Rezeptor erleichtern oder die Verweilzeit des Liganden am Rezeptor verlängern. Die Wirkungen von Allopregnanolon, Progesteron und THDOC auf den Rattenschlaf gleichen in einigen Punkten denen der Clozapingabe, sind aber nicht identisch. Allopregnanolon, Progesteron und THDOC reduzieren die Anzahl und verlängern die Dauer der non-REM-Schlaf-Episoden, erhöhen die REM-Schlaf latenz und unterdrücken die Aktivität niederfrequenter Wellen im EEG. Im Gegensatz zu Clozapin verkürzen sie die Einschlaf latenz und vermehren nicht den non-REM-Schlaf, dafür jedoch den pre-REM-Schlaf (Lancel et al., 1996, 1997; Damianisch et al., 2001; Müller-Preuß et al., 2002). Eine Rolle dieser Steroidhormone bei der Verbesserung der Schlafkontinuität durch Clozapin ist nicht auszuschließen. Bedeutend für die Wirkungen des Clozapins könnte aber auch die Tatsache sein, daß Allopregnanolon und Progesteron die Bildung von TNF- α durch Macrophagen unterdrücken (Ghezzi et al., 2000), und damit auch als gegenregulatorische

Mechanismen in Frage kommen.

Acetylcholin. Clozapin erhöht rasch und dosisabhängig die Freisetzung von Acetylcholin im Striatum, Nucleus accumbens, Hippocampus und besonders im prefrontalen Kortex von Ratten (Rupniak et al., 1986; Parada et al., 1997; Ichikawa et al., 2002; Shirazi-Southall et al., 2002) und erhöht den Umsatz von Acetylcholin im Nucleus accumbens (Bluth & Langnickel, 1985). Ursache hierfür ist vermutlich die Blockade von M₁-Acetylcholin-Rezeptoren. Die muskarinischen Rezeptoren sind vermutlich an der Regulation des REM-Schlafes beteiligt, während dessen Acetylcholin verstärkt freigesetzt wird (vgl. Garcia-Garcia & Drucker-Colin, 1999). Die Blockade des muskarinischen M₁-Rezeptors durch Clozapin steht daher möglicherweise in Zusammenhang mit der Unterdrückung des REM-Schlafes.

Cholinergen Neuronen wird eine nicht unbedeutende Rolle bei der Aktivierung von corticalen und limbischen neuronalen Netzwerken zugeschrieben (vgl. Clarenbach et al., 1998). Ein Anstieg von Acetylcholin im Kortex und Hippocampus könnte für die vermehrten Aufwachereignisse akut nach Verabreichung der hohen Clozapindosierung verantwortlich sein. Für diese schlafstörende Wirkung des Clozapins entwickelte sich jedoch schnell Toleranz, während erhöhte Konzentrationen von Acetylcholin auch nach Langzeitbehandlung mit Clozapin gefunden werden (Rupniak et al., 1985; 1986). Es wird vermutet, daß der Anstieg des Acetylcholins mit der verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit von Patienten unter Clozapintherapie in Zusammenhang steht (Parada et al., 1997; Ichikawa et al., 2002; Shirazi-Southall et al., 2002).

Histamin. Histaminerge Neurone befinden sich im posterioren Hypothalamus, einer Region, die vermutlich an der Aufrechterhaltung des Wachzustandes beteiligt ist (Nauta, 1946; Monnier et al., 1967; Kalivas, 1982; Hilakivi, 1987). Die Injektion eines spezifischen Inhibitors des Enzyms Histamin-N-methyltransferase in diese Region, wodurch der Abbau von Histamin vermindert wird, führt zu einem signifikanten Anstieg des Wachseins und einer Abnahme des non-REM-Schlafes als auch des REM-Schlafes (Lin et al., 1994). Daher ist anzunehmen, daß Histamin wach hält. Die Blockade von Histamin-H₁-Rezeptoren führt zu einer Verminderung des Wachseins und einer Vermehrung des non-REM-Schlaf bei gleichzeitiger Unterdrückung des REM-Schlafes (Lin et al., 1994). Clozapin ist ein H₁-Rezeptor-Antagonist. Die Vermehrung des non-REM-Schlafes bei gleichzeitiger Unterdrückung des REM-Schlafes könnte daher auf die Aktivität des Clozapin am H₁-Rezeptor zurückzuführen sein. Die bei hoher Dosierung zunächst beobachtete Zunahme des Wachzustandes ist jedoch mit einer Blockade von H₁-Rezeptoren nicht zu erklären.

Adrenalin. Auch Adrenalin scheint eine Rolle bei der corticalen Desynchronisation und somit der Einleitung und/oder Beibehaltung des Wachzustandes zu spielen. Die Verminderung des Wachseins nach Clozapin-Gabe und die verbesserte Schlafkontinuität könnte daher durch die Blockade von α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren verursacht sein.

Desweiteren führt Clozapin zu einer verstärkten Freisetzung von Oxytocin (Uvnas-Moberg et al., 1992), das ebenfalls das Schlafverhalten beeinflusst (Kroemer et al., 2000). Die Liste der

Systeme, die an der Schlaf-Wach-Regulation beteiligt sind und in die Clozapin eingreifen kann, ist lang. Jedoch findet sich darunter nur ein Kandidat, bei dem sich die Wirkung niedriger Dosierungen (schlaffördernd) gegensätzlich zu der Wirkung höherer Dosierungen (schlafstörend) verhält. Dies sind die Zytokine IL-1 und TNF- α .

4.3. Einfluß von Clozapin auf die Produktion von TNF- α

In Serumproben war TNF- α mit handelsüblichen ELISA-Kits nicht nachweisbar, weder mit Kits von Biosource noch von R&D Systems, der einmalig zu Kontrollzwecken eingesetzt wurde. Ein Nachweis von TNF- α im Serum von Ratten ist erst nach starken Immunstimulationen, z.B. mit LPS möglich, was die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigen (Anderson et al., 1995; Tremblay et al., 1997; Fernando et al., 1998; Song et al., 1998; Yang et al., 1998).

Für Messungen in Kulturmedien erweist sich die ELISA-Methode als geeignet (Cocchiara et al., 1995, 1999; Gukovskaya et al., 1997). Eine Kultivierung von Hirnschnitten des Kortex in Kulturmedien erbrachte jedoch keinen reliablen Befund bezüglich des Einflusses von Clozapin auf die Freisetzung von TNF- α in die Kulturlösung. Die Technik wurde daher verworfen. Unter anderem könnte der Grund für das Versagen der Methode darin zu suchen sein, daß bereits das Lösungsmittel DMSO zu einer Anregung der TNF- α -Produktion führte, die durch die Zugabe von Clozapin nicht mehr wesentlich gesteigert werden konnte: während einer zweistündigen Inkubation von Schnitten des frontalen Kortex in Kulturmedium wurde kein TNF- α gebildet, eine TNF- α -Produktion setzte erst mit Zugabe von DMSO (unabhängig von Clozapin) ein (vgl. dazu Abb. 21, Seite 56). Einen interessanten Schluß läßt der dort beschriebene Versuch auf die Herkunft des gebildeten TNF- α zu. Von Gehirnschnitten, bei denen durch Clodronat phagozytierende Zellen eliminiert worden waren, wurde zunächst kein TNF- α in die Kulturlösung abgegeben. Mit einer Stunde Verzögerung setzte dann eine TNF- α -Produktion ein, die der von Gehirnschnitten mit intakter Mikroglia und intakten Makrophagen äquivalent war. Für die akute TNF- α -Antwort sind diese Zell-Population offenbar unerlässlich, anschließend scheint die Bildung von TNF- α unabhängig von phagozytierenden Immunzellen zu sein, wobei die Zeitverzögerung dem Zeitraum zwischen Genexpression und Proteinfreisetzung bei Körperzellen entsprechen könnte. Es ist bekannt, daß Neurone TNF- α -mRNA und TNF- α zu bilden vermögen (Hunt et al., 1992; Breder et al., 1993; Liu et al., 1994; Tchelingierian et al., 1994).

Bei Patienten wurde unter Behandlung mit Clozapin ein Anstieg der Serum-TNF- α -Konzentrationen gezeigt (Pollmächer et al., 1996; Hinze-Selch et al., 2000). Eine akute systemische Behandlung mit Clozapin führte bei Ratten zu einem dosisabhängigen Anstieg von TNF- α im frontalen Kortex. Dies ist es der erste Nachweis eines Anstieges der Konzentration von TNF- α im Gehirn bzw. während der Behandlung von Tieren mit Clozapin. Der Effekt war nach achtmaliger Behandlung nicht mehr vorhanden.

Die Kinetik der Bildung von TNF- α nach Stimulation mit Clozapin ist nicht bekannt. Messungen zu anderen, vornehmlich früheren Zeitpunkten könnten weiteren Aufschluß geben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mitte der Lichtperiode als Meßzeitpunkt gewählt, da zu diesem Zeitpunkt unter Normalbedingungen der Gehalt von TNF- α und seiner mRNA im Rattenhirn besonders gering ist (Bredow et al., 1997; Floyd & Krueger, 1997) und in Anlehnung an die humanen Daten eine langanhaltende Erhöhung von TNF- α erwartet wurde. Patienten nehmen Clozapin allerdings in einem Modus langsamer Dosissteigerung ein, während ein Versuchstier auf Anrieb mit wirksamen Dosierungen konfrontiert wird. Auch daraus können sich Unterschiede in den Reaktionen auf ein Psychopharmakon ergeben. So könnte man, statistische Aspekte außer acht lassend, zu dem Eindruck gelangen, daß der TNF- α -Gehalt im frontalen Kortex von Ratten nach subchronischer Behandlung mit der niedrigen Dosis etwas höher ist als bei den hochdosiert behandelten Ratten und bei Kontrolltieren (vgl. Abb. 22, Seite 57). Danach wäre es denkbar, daß hohe Dosierungen von Clozapin bereits bei akuter Gabe einen Anstieg von humoralen Immunparametern wie TNF- α verursachen, die gegenregulatorische Mechanismen auslösen und damit nach kurzer Zeit wieder verschwinden, während niedrige Clozapindosierungen dagegen einen Anstieg von TNF- α erst nach mehreren Tagen Behandlung hervorrufen. Für endgültige Aussagen bedürfen diese Phänomene weiterer Klärung.

4.4. Clozapin-induzierte EEG-Veränderungen

Clozapin rief bei den Ratten EEG-Veränderungen hervor. Solche Effekte sind für Patienten gut dokumentiert, ist doch Clozapin mit einer Häufigkeit von 50 Prozent (Günther et al., 1993; Freudenreich et al., 1997) bis fast 80 Prozent (Welch et al., 1994; Schuld et al., 2000) das Neuroleptikum mit dem höchsten Risiko für EEG-Veränderungen (Centorrino et al., 2002), z.B. eine Verlangsamung von EEG-Wellen und asymmetrische EEG-Aktivitäten. In Extremfällen treten sogar epileptische Anfälle auf.

Das Vorkommen von Absence Epilepsien ist bei Wistarratten häufig zu beobachten. Die Hälfte der verwendeten Tiere zeigte bereits unter Kontrollbedingungen gelegentlich das typische Spike-Wave-Muster der Absence Epilepsie im Wach-EEG. Eine Bedeutung bei der Verteilung der Vigilanzstadien kommt diesem EEG-Muster normalerweise jedoch nicht zu ($< 0.05\%$). Durch Clozapin steigerte sich der Anteil des Spike-Wave-Musters im EEG bei einigen Tieren zeitweilig auf über 3% (Daten in der Arbeit nicht gezeigt). Bei zwei von sieben unter Kontrollbedingungen epilepsiefreien Tieren konnte Clozapin Absence Epilepsien auslösen. Die Generierung von epileptischen Krampfanfällen durch Clozapin im Tierversuch wurde zuvor nur für Katzen (10 - 30 mg/kg i.p.) berichtet (Susic et al., 1975).

Clozapin erzeugte bei Ratten auch EEG-Veränderungen, die in Tierschlafstudien bisher noch nicht beschrieben worden sind. Hierbei handelte es sich um hochamplitudige Wellen im Frequenzbereich von Spindeln, die meist von einem myoklonieartigen Zackenmuster im integrierten EMG begleitet wurden. Diese clozapininduzierten EEG-Signale traten unabhängig von dem EEG-Muster der Absence Epilepsien phasenartig im Wach-EEG auf. Die Ratten zeigten während dieser Zeit ein apathisches Dösverhalten im Sitzen mit geschlossenen Augen und Kopfzuckungen. Sayers & Stille wiesen bereits 1969 auf eine Clozapin-verursachte Verdrängung des normalen Schlaf-Wach-Rhythmus durch ein Dösverhalten hin. Coward et al. (1989) bezeichneten dieses Dösen als atypisch und charakterisiert durch einen Grundrhythmus von 8 - 10 Hz mit 8 - 12 Hz Spindeln. Bei Spierings et al. (1977) könnte die Angabe, daß hohe EEG-Amplituden bei gleichzeitigem Auftreten hoher EMG-Amplituden als non-REM-Schlaf gescort wurden, ein Hinweis sein, daß während dieser Studie dieselben charakteristischen EEG-Veränderungen auftraten.

Die Ursachen der EEG-Veränderungen sind sowohl bei Patienten als auch bei Tieren unbekannt.

4.5. Einfluß von Clozapin auf die lokomotorische Aktivität

Clozapin übte keinen signifikanten Einfluß auf die spontane lokomotorische Aktivität von Ratten aus. Es scheint jedoch, als zeigte die niedrigdosierte Behandlungsgruppe unabhängig vom Behandlungstag während der Dunkelphase weniger lokomotorische Aktivität als die hochdosierte Gruppe.

Bisher wurde der Einfluß einer Clozapinbehandlung auf die lokomotorische Aktivität von Ratten nur unter Einsatz der *open field*-Testmethode oder mit speziellen Testkäfigen ermittelt. Diese Methoden haben den Nachteil, daß sie für die Tiere eine neue Umgebung darstellten und daher eventuell weniger ein Bewegungsbedürfnis oder -vermögen der Tiere reflektieren, als daß sie vielmehr einen Motivationstest darstellen, nämlich die Motivation, eine unbekannte Umgebung zu erkunden (Bardgett et al., 1998). Zudem spielt auch das Angstverhalten in einem solchen Test eine Rolle (Britton & Britton, 1981; Fischer et al., 1998). Durch die Untersuchung von Ratten in ihren Heimkäfigen ist eine Ermittlung der tatsächlichen spontanen Aktivität unabhängig von Faktoren wie Motivation oder Angst gegenüber einer neuen Umgebung möglich. Allerdings hat diese verwendete Methode den Nachteil, daß sich Ratten während der Ruheperiode ohne Anreiz von vornherein kaum bewegen und in dieser Zeit eine Hemmung der lokomotorischen Aktivität unerkant bleiben könnte.

Die in der Literatur beschriebenen Effekte von Clozapin auf die lokomotorische Aktivität von Ratten in einer nicht vertrauten Umgebung sind weder ausgeprägt noch einheitlich. Bardgett et al. (1998) fanden eine dosisabhängige Verringerung der lokomotorischen Aktivität über eine Woche Behandlung mit Clozapin (6,3 - 30 mg/kg i.p.). Demgegenüber berichten Fischer et al. (1998) und

Schmitt et al. (1999) erst nach einer Langzeitbehandlung von Ratten mit hohen Clozapin-dosierungen (36 bzw. 40 mg/kg p.o.) von einer Verringerung der lokomotorischen Aktivität. Lipska & Weinberger (1994) beobachteten bei einer Langzeitbehandlung mit 4 mg/kg Clozapin keine Veränderung der Lokomotion.

Casey (1996) beurteilte das lokomotorische Verhalten von Kapuzineraffen nach Clozapingabe in vertrauten Käfigen. Auffälligerweise fand er eine Abnahme der lokomotorischen Aktivität bei den Affen exakt mit den Dosierungen, bei denen auch Gleichgewichtsstörungen, Ataxie und eine zunehmende Sedierung auftraten, weshalb zu vermuten ist, daß die verringerte lokomotorische Aktivität eine Folgeerscheinung dieser Symptome darstellte. Der sedierende Effekt des Clozapins ist auch in der Tierliteratur wiederholt dokumentiert worden (Sayers & Stille, 1969; Spierings et al., 1977; Coward et al., 1989; Ongini et al., 1993; Salamone et al., 1996). Bei Mäusen wurde von Gleichgewichtsstörungen nach 6 mg/kg Clozapin i.p. berichtet (Menon et al., 1988). Solche Symptome können zu einer Verminderung der Aktivität der Tiere sowohl im Heimkäfig als auch in einer neuen Umgebung führen. In der vorliegenden Studie spiegelten sich die Veränderungen des Schlaf-Wach-Verhaltens bei einer Behandlung mit Clozapin nicht im Aktivitätsmuster der Ratten wider. Ein Rückschluß auf das Schlafverhalten der Tiere über Aktivitätsmessungen ist daher in diesem Modell nicht möglich.

Die immunstimulierende Eigenschaft des Clozapins läßt Änderungen der lokomotorischen Aktivität erwarten. Immunstimulationen, z.B. mit LPS unterdrücken die lokomotorische Aktivität bei Ratten (Shen et al., 1999; Kouhata et al., 2001) über Mechanismen, an denen TNF- α beteiligt ist (Bluthé et al., 2000). Dementsprechend führt die zentrale Verabreichung von TNF- α zu einer Abnahme der lokomotorischen Aktivität (Bianchi et al., 1992). Der dosisabhängige Anstieg von TNF- α im Gehirn der Ratten nach akuter Behandlung mit Clozapin ist in diesem Zusammenhang möglicherweise von Bedeutung, denn es wurde gezeigt, daß eine intracerebroventrikuläre Injektion von TNF- α während des Anfangs der Lichtperiode die lokomotorische Aktivität von Ratten während der Dunkelperiode unterdrückt, hingegen während der Lichtperiode keine Unterschiede zu finden waren (Pauli et al., 1998). Dazu passend beschränkte sich die leichte Reduktion der lokomotorischen Aktivität, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, auf die Dunkelperiode.

Dem dopaminergen System, insbesondere dem mesolimbischen, wird eine große Bedeutung bei der Regulation der spontanen lokomotorischen Aktivität zugeschrieben (Pijnenburg & Van Rossum, 1973). Nach vollständiger Elimination dopaminerger Aktivität ist eine Stimulation sowohl von Dopamin D₁- als auch D₂-Rezeptoren erforderlich, um eine "normale" Lokomotion zu regenerieren (Gershanik et al., 1983; Jackson & Hashizume, 1986). Darin könnte eine Erklärung liegen, weshalb der Dopamin-Rezeptor-Antagonist Clozapin in einigen Studien eine leichte Unterdrückung der lokomotorischen Aktivität verursacht. Allerdings verhält sich Clozapin in Dopamin-

Depletionsstudien wie ein D₂-Rezeptor-Agonist: zusammen mit selektiven Dopamin D₁-Rezeptor-Agonisten fördert Clozapin die lokomotorische Aktivität (Jackson et al., 1995).

4.6. Gehirn- und Körpertemperatur nach Clozapingabe

In Übereinstimmung mit allen bisher erschienenen Publikationen (Maj et al., 1974; Menon et al., 1988; Salmi et al., 1994; Millan et al., 1995; Salmi & Ahlenius, 1996; Oerther & Ahlenius, 2000) wurde nach Clozapingabe eine dosisabhängige Hypothermie nachgewiesen. Neu an der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung einer streßfreien Methode, während in allen bisher durchgeführten Studien die rektale Temperatur von Ratten oder Mäusen mit Hilfe von Meßfühlern bestimmt wurde. Dazu mußten die Tiere in die Hand genommen oder andersartig an ihrer freien Bewegungsfähigkeit gehemmt werden, das bedeutet, in eine streßvolle Situation gebracht werden. Bei habituierten Ratten führt eine solche Vorgehensweise zu einer Temperaturerhöhung von ca. 1 K. Da Clozapin anxiolytisch wirkt (Shopsin et al., 1979; Griebel, 1995; Rex et al., 1998), könnte ein Absinken der Körpertemperatur in einem solchen Versuchsdesign auch Ausdruck einer verbesserten Streßkompensation im Vergleich zu Kontrolltieren sein. Auch wenn die Beteiligung solcher Mechanismen mit der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, so kann doch festgestellt werden, daß sie nicht vorrangig für die clozapininduzierte Hypothermie verantwortlich sind.

Einem homiothermen Organismus stehen eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung, seine Körpertemperatur konstant zu halten, wie Verhaltensanpassungen (Aufsuchen warmer oder kühler Umgebung), Veränderungen der Hautdurchblutung, Muskelzittern oder Verdunstung von Wasser. Die Regulation dieser Mechanismen erfolgt zentral im Hypothalamus mit Hilfe von Thermorezeptoren, die die Einhaltung eines bestimmten Sollwertes kontrollieren und bei Abweichungen gegensteuern.

Das Absinken der Körpertemperatur unter Clozapinbehandlung ist nicht auf eine verringerte Muskelaktivität zurückzuführen. Huberman et al. (2000) setzten eine Versuchsanordnung ein, bei der Ratten in einer kalten Umgebung durch wiederholtes oder dauerhaftes Drücken einer Taste eine Wärmelampe einschalten konnten, was zweifellos motorische Aktivität erfordert. Eine Clozapinbehandlung (5 mg/kg) resultierte in einer enormen Erhöhung der Wärmeanforderung, ohne daß der Clozapin-induzierte Wärmeverlust dadurch ausgeglichen werden konnte. In einem Temperaturgradienten, einem Test, der vollkommen unabhängig von motorischer Aktivität ist, bevorzugten Clozapin-behandelte Ratten eine wesentlich höhere Umgebungstemperatur als die Saline-behandelte Kontrollgruppe (30 °C versus 25,6 °C) und wiesen nach einer Stunde eine höhere Körperkerntemperatur auf als die Kontrolltiere (38,5 °C versus 37,8 °C). Diese Versuche zeigen, daß die Clozapin-induzierte Hypothermie unabhängig von motorischer Aktivität ist. So ruft Clozapin eine größere Temperaturabsenkung hervor, als sie während des Schlafes von Ratten beobachtet wird, währenddessen die Muskelaktivität am geringsten sein sollte. Die Tatsache, daß

die Ratten in den Versuchen von Huberman et al. eine wärmere und keine kühlere Umgebung als die Kontrolltiere aufsuchten, könnte ein Hinweis sein, daß die clozapininduzierte Hypothermie nicht auf ein Herunterstellen des Sollwertes im Hypothalamus zurückzuführen ist.

Clozapin senkt die Körpertemperatur vermutlich aufgrund einer verstärkten Wärmeabgabe, z.B. über eine Gefäßerweiterung (Huberman et al., 2000). Einige Hinweise sprechen dafür, daß dies nicht über eine Einflußnahme auf periphere, sondern auf zentrale Mechanismen geschieht (Millan et al., 1995; Menon et al., 1988; 1990).

Unter den von Clozapin beeinflussten Neurotransmitter-Systemen befinden sich einige, die in der Temperaturregulation involviert sein können. Die selektive Stimulation von Dopamin D₁-, D₂- oder D₃-Rezeptoren, α_2 -Adrenorezeptoren oder muskarinischen M₁-Acetylcholinrezeptoren verursacht Hypothermien (vgl. Salmi et al., 1994; Millan et al., 1995). Selektive 5HT₂-Agonisten erhöhen die Körpertemperatur, ein Effekt, der sich durch Clozapin antagonisieren läßt (Salmi et al., 1994). Die Clozapin-induzierte Hypothermie läßt sich durch zentral wirkende D₁-Antagonisten (Salmi et al., 1994; Salmi & Ahlenius, 1996; Oerther & Ahlenius, 2000), D₃-Antagonisten (Millan et al., 1995) und α_1 -Agonisten (Menon et al., 1988, 1990) vollständig und durch D₂-Antagonisten (Salmi et al., 1994) teilweise blockieren und/oder revidieren. Dopamin D₂/D₃-Antagonisten (Millan et al., 1995) und α_1 -Agonisten (Menon et al., 1988, 1990), die nicht die Blut-Hirnschranke zu passieren vermögen, sind nicht in der Lage, die Clozapin-induzierten Temperaturveränderungen zu modifizieren. Bedenkenswertig an der Blockade einer Clozapinwirkung (ganz oder teilweise) durch selektive Dopamin D₁-, D₂- oder D₃-Antagonisten ist die Tatsache, daß dies eine agonistische Wirkung (ganz oder teilweise) von Clozapin an diesen Rezeptoren voraussetzt. Die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika wird jedoch im allgemeinen Konsens auf die Blockade von Dopamin-Rezeptoren zurückgeführt. Einige Autoren bestätigen einen partiell agonistischen Charakter des Clozapins am Dopamin D₁- und D₂-Rezeptor (Malmberg et al., 1993; Jackson et al., 1995, 1998; Ninan & Kulkarni, 1998) und vermuten, daß dies für den atypischen Charakter des Clozapins mitverantwortlich ist. So führt eine Stimulation von D₁-Rezeptoren im prefrontalen Kortex zu einer Revision der negativen Symptome einer Schizophrenie und gleichzeitig zu einer Herunterregulation der Dopamin D₂-Rezeptoren (vgl. Salmi & Ahlenius, 1996; Oerther & Ahlenius, 2000). Andere Befunde und Autoren widersprechen der These, Clozapin sei ein D₁-Agonist (vgl. Andersen & Braestrup, 1986; Millan et al., 1995).

Wie dem auch sei, die markante Hypothermie, die in Tierstudien nach Gabe von Clozapin gefunden wird, steht im Gegensatz zu den temperaturkontrollierten Humanstudien, in denen das gelegentliche Auftreten von transientem Fieber, jedoch nicht von Hypothermien berichtet wird (Blum & Mauruschat, 1972; Blum & Girke, 1973; Gaertner et al., 1989; Druss & Mazure, 1993; Hinze-Selch et al., 1995, 1997; Nitenson et al., 1995; Pollmächer et al., 1996). Vice versa wurde in Tierstudien bisher noch nie Fieber nach Verabreichung von Clozapin beobachtet.

Heh et al. (1988) sind die einzige Arbeitsgruppe, die passend zu den Daten aus Tierstudien bei

Clozapin-behandelten Patienten eine leichte Absenkung der oral gemessenen Körpertemperatur um 0,1 K gegenüber einem medikationsfreien Zeitraum fanden. Da sie die Besserung der psychotischen Symptome mit dem Absinken der Temperatur korrelieren konnten, wäre es von Interesse, das Ergebnis ihrer systematisch durchgeführten Studie nachzuvollziehen, um die Rolle der Temperaturveränderungen am Wirkprofil des Clozapins besser einschätzen zu können.

Der Hypothermie bei Nagetieren und dem transienten Fieber bei Menschen liegen vermutlich unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Die Hypothermie bei den Ratten tritt sofort nach Injektion der Droge auf ohne daß sich nach mehrmaliger Behandlung Toleranz entwickelt, während sich das Fieber bei Patienten im Laufe der Behandlung einstellt und nur kurze Zeit anhält (gewöhnlich in der zweiten oder dritten Behandlungswoche).

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wird bei Immunstimulationen (Beutler & Cerami, 1988; Sanna et al., 1995; Nadeau & Rivest, 1999) und manchen Formen von Streß (Yamasu et al., 1992) verstärkt freigesetzt und ist beteiligt an den Temperaturveränderungen während LPS- und streßinduzierter Hyperthermien (Michie et al., 1988; Long et al., 1990) und während der Hypothermie beim septischen Schock (Derijk & Berkenbosch, 1994; Tollner et al., 2000). TNF- α ist sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte während einer Clozapinbehandlung erhöht. Die genaue Rolle dieses Zytokins bei der Thermoregulation ist jedoch nicht geklärt, denn die Daten sind widersprüchlich. Eine Blockade der Wirkung des Zytokins weist darauf hin, daß ein Anstieg von TNF- α eher für die Eindämmung von Fieber als für die Temperaturerhöhung erforderlich ist (vgl. Kluger et al., 1996), jedoch führt die Applikation von TNF- α oder TNF- α -Fragmenten bei Menschen oder Nagetieren zu einer dosisabhängigen Temperaturerhöhung (Dinarello et al., 1986; Kapás et al., 1992) über ein Heraufsetzen des Sollwertes der Körpertemperatur aufgrund der Freisetzung von Prostaglandinen des Types E im Hypothalamus (Nakamura et al., 1988). Tierstudien, die keine Temperaturerhöhung durch TNF- α nachweisen konnten, verwendeten meist humanes TNF- α , daß bei Nagetieren nicht als exogenes Pyrogen wirkt (vgl. Stefferl et al., 1996). Anscheinend besitzt TNF- α pyretische Eigenschaften und löst antipyretische Mechanismen aus.

Der Anteil von TNF- α am transientem Fieber bei clozapinbehandelten Patienten erscheint als sekundär. Zwar sind die Serumkonzentrationen von TNF- α während des Auftretens von Fieber stärker erhöht als während fieberfreier Zeiten bzw. bei fieberfreien Patienten, jedoch ist nur eine Erhöhung von IL-6 an das Auftreten von Fieber gebunden. TNF- α dagegen ist fieberunabhängig mindestens bis zur 6. Behandlungswoche erhöht (Pollmächer et al., 1996; Hinze-Selch et al., 2000).

Eine Beteiligung von TNF- α an der clozapininduzierten Hypothermie bei der Ratte erscheint als nicht wahrscheinlich. Zum einen existiert kein Beweis, daß bei Ratten durch eine Erhöhung von TNF- α eine Temperatursenkung im Vergleich zu Kontrolltieren hervorgerufen werden kann. Zum anderen stellt die clozapininduzierte Hypothermie einen relativ kurzzeitigen Effekt (maximal bis zu vier Stunden) ohne Toleranzentwicklung bei subchronischer Behandlung dar, während eine

Erhöhung von TNF- α bei Ratten noch sechs Stunden nach akuter Clozapingabe nachweisbar war, ein Effekt für den sich bei subchronischer Behandlung Toleranz entwickelte.

Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist die Erhöhung der Körper- und Gehirntemperatur gegenüber Placebo-behandelten Tieren in der zweiten Hälfte der Lichtphase nach Injektion von Clozapin. Hierzu existieren keine Vergleichsdaten, da bisher keine langanhaltenden Temperaturmessungen während Tierversuchen mit Clozapin durchgeführt wurden. Möglicherweise ist die moderate Hyperthermie im Anschluß an die akute Hypothermie ein "Überschießen" gegenregulatorischer Mechanismen. Eine hypertherme Wirkung der Abbauprodukte von Clozapin läßt sich ausschließen, da Salmi & Ahlenius 1996 zeigten, daß die beiden Hauptmetabolite Norclozapin und Clozapin-N-Oxid keinen Einfluß auf die Körpertemperatur ausüben.

Insgesamt ist das transiente Fieber bei clozapinbehandelten Patienten wohl auf immunologische Mechanismen zurückzuführen, wobei die Prädispositionen ungeklärt sind, auf Grund derer einige Patienten Fieber entwickeln und andere nicht. Ungeklärt sind auch die Ursachen für die Effekte von Clozapin auf die Körper- und Gehirntemperatur bei Ratten und für die unterschiedlichen Temperaturreaktionen von Mensch und Tier auf Clozapin.

4.7. Wirkungen von Clozapin auf Körpermasse und Leptin

Bei männlichen Laborratten wurde eine Tendenz zu einer dosisabhängigen Verminderung der Gewichtszunahme bei subchronischer Behandlung mit Clozapin festgestellt. Obwohl diese Beobachtung keinen signifikanten Effekt darstellt, bestätigt sie doch Daten aus der Tierliteratur, wonach männliche Mäuse und Ratten bei Langzeitbehandlung mit Clozapin dosisabhängig eine geringere Körpermasse, als Placebo-behandelte, altersgematchte Kontrollgruppen aufweisen (Rolsten et al., 1979; Rupniak et al., 1985; Nylander & Terenius, 1986; Baptista et al., 1993). Demgegenüber treten bei weiblichen Ratten keine Veränderungen der Körpermasse auf (Baptista et al., 1993; Schmitt et al., 1999). Clozapin steht damit im krassen Gegensatz zu anderen antipsychotischen Arzneimitteln, z.B. Olanzapin, Sulpirid und Haloperidol, die bei weiblichen Ratten zu einer signifikanten Gewichtszunahme führen, während bei männlichen Tieren keine Veränderung der Gewichtsentwicklung auftritt (Baptista et al., 1987, 1988; Leander & Gleason, 2001; Goudie et al., 2002).

Die Tierdaten verhalten sich konträr zu den Erfahrungen bei Patienten, bei denen eine Behandlung mit dem typischen Neuroleptikum Haloperidol mit einem eher geringen Risiko für Gewichtsveränderungen verbunden ist, während Clozapin und andere atypische Neuroleptika wie Olanzapin eine starke Gewichtszunahme verursachen (Beasley et al., 1996; Kraus et al., 1999). Auf Geschlechtsunterschiede ist bei Patienten bisher wenig geachtet worden. Briffa & Meehan (1998) berichten für Clozapin von einem höheren Risiko einer erheblichen Gewichtszunahme für Männer.

Psychopharmaka-bedingte Gewichtszunahmen sind bei Menschen mit einem Anstieg der Serumkonzentration von Leptin verbunden (vgl. Pollmächer et al., 2000), u.a. wurde diese Korrelation für die atypischen Neuroleptika Clozapin und Olanzapin beschrieben (Kraus et al., 1999; Hinze-Selch et al., 2000). Lacruz et al. (2000) bestätigten den Zusammenhang für das atypische Neuroleptikum Sulpirid bei Ratten.

Der Einfluß von Clozapin auf die Serumkonzentration von Leptin bei Tieren wurde erstmalig in der vorliegenden Arbeit untersucht. Wie bei den Serumkonzentration von Clozapin und Norclozapin (s.u.) fand sich ein Einfluß des Alters der verwendeten Tiere. Unter Kontrollbedingungen wiesen ältere Tiere höhere Leptinkonzentration auf. Dieser Befund ist insofern in Übereinstimmung mit Daten aus der Humanliteratur, daß die Serumkonzentrationen von Leptin mit dem Körpergewicht und der Menge des Fettgewebes korrelieren (Considine et al., 1996; Hebebrand et al., 1997). Da ältere Tiere schwerer sind und mehr Fettgewebe besitzen, sollten sie höhere Leptinwerte haben als jüngere bzw. leichtere Tiere. Bei den älteren Ratten war kein Einfluß der Behandlung mit Clozapin auf die Leptinkonzentration festzustellen, während Clozapin bei jungen Tieren zu einem dosisabhängigen Anstieg der Serumkonzentration von Leptin führte.

Leptin ist ein wichtiger Regulator sowohl der Energiebilanz als auch des Körpergewichtes. Es wird vom peripheren Fettgewebe in die Blutbahn freigesetzt als ein Signal an das Gehirn, die Nahrungsaufnahme zu beschränken und den Energieverbrauch zu steigern (Campfield et al., 1995; Pellemounter et al., 1995). Während einer Phase verringerter Nahrungsaufnahme sinkt die zirkulierende Leptinmenge und bleibt auch dann erniedrigt, wenn wieder eine normale Nahrungsmenge aufgenommen wird. Gleiches gilt umgekehrt für erhöhte Leptinwerte nach einer Phase gesteigerter Nahrungsaufnahme. Die Leptinkonzentrationen kehren erst dann wieder zu Normalwerten zurück, wenn die zu wenig oder zu viel aufgenommene Energiemenge ausgeglichen wurde (Chin-Chance et al., 2000). Über diesen Mechanismus ist Leptin womöglich mitverantwortlich für den Jo-Jo-Effekt einer verstärkten Gewichtszunahme im Anschluß an eine Diät mit dem Ziel der Gewichtsreduktion (Havel, 2000).

Erhöhte Konzentrationen von Leptin sollten zu einer Beschränkung des Nahrungskonsums und einer verminderten Gewichtszunahme führen. Bei männlichen Laborratten war dies bei Behandlung mit Clozapin der Fall. Bei Patienten jedoch geht der Anstieg des Leptins während einer Clozapinbehandlung mit einer Gewichtszunahme einher. Mögliche Wege, über die Clozapin das Nahrungsverhalten beeinflussen könnte, werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.8. Nahrungsaufnahme unter Clozapinbehandlung

In der Literatur wurde für weibliche Ratten bei oraler Gabe von Clozapin über das Trinkwasser eine deutlich geringere Wasseraufnahme im Vergleich zu einer gleichaltrigen Kontrollgruppe festgestellt (Schmitt et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Änderungen des Trink-

verhaltens gefunden, weshalb dieser Effekt vermutlich nicht auf eine direkte Wirkung des Clozapins zurückzuführen war, sondern auf ein Meideverhalten gegenüber dem Clozapin, nicht dem Wasser.

Eine Behandlung mit Clozapin in höherer Dosierung führte in der vorliegenden Arbeit bei männlichen Ratten zu einer generellen Abnahme der aufgenommenen Nahrungsmenge. Dieser Befund befindet sich in Übereinstimmung mit Literaturangaben, laut derer eine Clozapinbehandlung männlicher Ratten mit einer Verminderung der Futtermittelaufnahme verbunden ist, die langfristig in einem geringeren Körpergewicht im Vergleich zu Kontrolltieren resultiert (Baptista et al., 1993; Salamone et al., 1996). In einem Akutversuch fraßen Ratten, die im Anschluß an einen Futterentzug (20 Stunden) mit Clozapin behandelt wurden, innerhalb einer halben Stunde gleich viel wie die unbehandelte Kontrollgruppe (Rex et al., 1998), woraus sich ableiten läßt, daß Clozapin keinen akuten Einfluß auf die Nahrungsaufnahme ausübt.

Anders verhält es sich bei Patienten. Zwar existieren keine Untersuchungen an Clozapinbehandelten Patienten über die aufgenommene Nahrungs- und Energiemenge, jedoch weisen Befragungen eindeutig darauf hin, daß Clozapin ein Hungergefühl auslöst, das zu regelrechten Eßattacken führen kann (Briffa & Meehan, 1998; Brömel et al., 1998). Die enorme Gewichtszunahme von Patienten unter Clozapintherapie wird daher auf eine Überernährung zurückgeführt.

Trotz einiger gemeinsamer Befunde bei Mensch und Ratte, z.B. Anstieg von TNF- α und Leptin, reagiert die Körpermasse beider Spezies auf eine Clozapinbehandlung unterschiedlich. Als Gemeinsamkeit kann jedoch festgehalten werden, daß in beiden Fällen die Veränderungen des Körpergewichtes auf Änderungen in der Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden können und nicht auf Stoffwechselveränderungen.

Insbesondere die kausalen Zusammenhänge zwischen erhöhten Leptinkonzentrationen und einer Zunahme des Körpergewichtes von Patienten während einer Clozapinbehandlung sind ungeklärt. Da Leptin sehr rasch nach Beginn der Clozapintherapie ansteigt und zwar noch vor Beginn einer merklichen Gewichtszunahme (Brömel et al., 1998; Kraus et al., 1999; Hinze-Selch et al., 2000), kann die Zunahme des Serum-Leptins zumindest anfänglich nicht auf eine Vermehrung des Fettgewebes zurückgeführt werden. Eine Ursache hierfür ist möglicherweise in der gesteigerten Nahrungsaufnahme zu finden. Essen führt zu einer Freisetzung von Insulin in den Blutkreislauf. Insulin stimuliert die Bildung und Freisetzung von Leptin aus dem Fettgewebe (Zheng et al., 1996; Barr et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wird bei männlichen Ratten ein Anstieg der Serumkonzentration von Leptin nach Clozapingabe gezeigt, während es weder zu einem Anstieg der Nahrungsaufnahme noch zu einer Gewichtszunahme kommt. Andere Mechanismen der Regulation von Leptin könnten hier für den Anstieg des Leptins verantwortlich sein. So fördern Zytokine wie TNF- α und IL-1 β ebenfalls die Bildung von Leptin im Fettgewebe (Grunfeld et al., 1996; Sarraf et al., 1997). Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte führt eine Behandlung mit Clozapin

zu einer Erhöhung der TNF- α -Konzentrationen. TNF- α und IL-1 β unterdrücken die Nahrungsaufnahme und senken das Körpergewicht (Ling et al., 1997; Swiergiel et al., 1997; Tamura et al., 1997; Kouhata et al., 2001). Beide Zytokine sind beteiligt an infektionsbedingten Abnahmen der Futteraufnahme und des Körpergewichtes bei Ratten (Ilyin et al., 1998; Swiergiel & Dunn, 1999; Bluthé et al., 2000; Tollner et al., 2000) und sind Mediatoren der Anorexia bei Krebserkrankungen (Meguid et al., 2000). Für diese Wirkungen von TNF- α und IL-1 β ist der Umweg über das Leptin nicht erforderlich, denn auch eine direkte Wirkung an zentralen Mechanismen wurde nachgewiesen (Plata-Salamán et al., 1988).

Als Empfänger peripherer Signale sind besonders zwei Zentren im Hypothalamus von Bedeutung: Glucose-sensitive Neurone im lateralen hypothalamischen Areal (LHA) und im ventromedialen Nucleus (VMN) (Plata-Salamán, 1999); ersteres das zentralnervöse Zentrum des Parasympathikus, letzterer das des Sympathikus. Beide Zentren wirken wechselseitig bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiebilanz, wobei dopaminerge und serotonerge Neurone eine Rolle spielen. Nach einem vereinfachten Modell nach Meguid et al. (2000) trägt die Aktivität von Dopamin am D₂-Rezeptor zur Initialisierung der Nahrungsaufnahme bei, während Serotonin über den 5-HT_{2C}-Rezeptor die Nahrungsaufnahme unterdrückt bzw. beendet. In dieses System kann Clozapin durch Bindung an die Rezeptoren auch direkt eingreifen. Da von einigen Autoren eine partiell agonistische Wirkung von Clozapin an Dopaminrezeptoren im Hypothalamus beschrieben wurde (Malmberg et al., 1993; Salmi et al., 1994; Jackson et al., 1995, 1998; Millan et al., 1995; Salmi & Ahlenius, 1996; Ninan & Kulkarni, 1998; Oerther & Ahlenius, 2000), könnte durch die Stimulation von Dopamin-D₂-Rezeptoren Hunger und damit eine Nahrungsaufnahme ausgelöst werden, während die Blockade der Serotonin-5-HT_{2C}-Rezeptoren dafür sorgt, daß die Patienten nicht aufhören können zu essen. Diese Hypothese hat gegenüber anderen Theorien den Vorteil, daß sie erklären würde, weshalb unter den Neuroleptika Clozapin das größte Risiko für Gewichtszunahmen birgt (Taylor & McAskill, 2000), da für andere Neuroleptika als Clozapin bisher ausschließlich antagonistische Wirkungen an Dopaminrezeptoren beschrieben wurden. Andererseits könnte auch das Verhältnis der Blockade von Dopamin-D₂-Rezeptoren im ventromedialen Nucleus (VMN) im Vergleich zum lateralen hypothalamischen Areal (LHA) für die Neuroleptika-induzierten Gewichtszunahmen entscheidend sein (Parada et al., 1991). Eine Erklärung für die unterschiedliche Gewichtsentwicklung bei Menschen und Laborratten unter Clozapinbehandlung liefern beide Hypothesen nicht.

Die durch den selektiven D₃-/D₂-Rezeptorantagonisten Sulpirid verursachte Fettleibigkeit bei weiblichen Ratten wurde u.a. auf die Blockade von D₂-Rezeptoren im tubero-infundibularen Dopaminsystem zurückgeführt. Dies führt zur Hyperprolaktinämie, wodurch die Steroidhormonsynthese in den Ovarien beeinträchtigt wird. Die daraus resultierende zu niedrige Konzentration an Östrogen veranlaßt die Tiere, mehr zu fressen (Parada et al., 1989).

Eine Beteiligung des Östrogens an der Regulation der Nahrungsaufnahme gilt als gesichert, da

Östrogen-Rezeptoren im VMN nachgewiesen wurden (McEwen, 1981), sich das Freßverhalten weiblicher Ratten über den Sexualzyklus (Laviano et al., 1996) und nach Kastration ändert und diese Änderungen durch Substitution von Östrogen rückgängig zu machen sind (Jankowiak & Stern, 1974; Varma et al., 1999). Obwohl Clozapin eine kurzzeitige Hyperprolaktinämie verursacht (Meltzer et al., 1979; Gudelsky et al., 1987) und die Steroidhormonsynthese bei weiblichen Ratten beeinträchtigt (Baptista et al., 1993), nehmen weibliche Ratten nicht zu. Dieser Mechanismus für Psychopharmaka-induzierte Gewichtszunahmen läßt sich also im Falle des Clozapins nicht bestätigen.

Kraus et al. (1999) postulierten für die Erhöhung des Körpergewichtes bei Patienten eine Abnahme der zentralen Sensitivität für gewichtsregulierende Signale, z.B. für Leptin. Auch darin könnte sowohl bei Menschen als auch bei Ratten ein Grund für den Anstieg der Serum-Leptin-Konzentrationen zu suchen sein, da dadurch die regulierenden Signale negativer Rückkopplungsmechanismen ausbleiben können, z.B. jene über das sympathische System (Rayner et al., 1998).

Für Leptin-Insensitivität existiert ein Rattenmodell, die *zucker diabetic fatty* (ZDF) Ratte mit einem adipösen Phänotyp. Der neurophysiologische Unterschied der Leptin-insensitiven, fettleibigen Tiere zu ihren schlanken Wurfgeschwistern besteht in der Abwesenheit des konstitutiven Dopamin-D₂-Rezeptors bei gleichzeitiger Überexprimierung des Dopamin-D₁-Rezeptors im VMN (Meguid et al., 2000), der normalerweise im Hypothalamus kaum vorkommt (Weiner et al., 1991). Der D₂-Rezeptor erscheint obligat für eine normale Regulation der Futteraufnahme, während der D₁-Rezeptor vermutlich mit einer vermehrten Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Meguid et al., 2000).

Bei normalen männlichen Ratten ließ sich im VMN nur der D₂-Rezeptor nachweisen, während bei weiblichen Ratten während des Proestrus zusätzlich der Dopamin-D₁-Rezeptor exprimiert wurde (Meguid et al., 2000). Für die Clozapingabe an Ratten könnte dies bedeuten, daß weibliche Ratten im Proestrus während einer Expressierung des D₁-Rezeptors mehr fressen als die übrigen Phasen des Sexualzyklusses und sich aufgrund dessen im Gegensatz zu den männlichen Ratten ihr Körpergewicht langfristig im Vergleich zu unbehandelten Tieren nicht verändert. Diese These ist bisher experimentell nicht geprüft worden.

Weitere Neurotransmittersysteme sind in der Regulation der Futteraufnahme involviert, z.B. Acetylcholin über den M₃-Rezeptor (Yamada et al., 2001) und Noradrenalin über ein Wechselspiel der Rezeptoren α_1 und α_2 , wobei eine Aktivierung der α_2 -Rezeptoren die Nahrungsaufnahme stimuliert, während α_1 sie unterdrückt (Wellman, 2000). Diese Mechanismen sollen hier jedoch nicht diskutiert werden, da der M₃-Rezeptor für Clozapin nicht relevant ist und im Falle von Noradrenalin Clozapin beide Rezeptoren blockiert.

Insgesamt läßt sich sagen, daß einige Hinweise existieren, wie Clozapin in die Regulation der Nahrungsaufnahme eingreifen könnte. Es ist jedoch viel Forschungsarbeit nötig, um die komplexen Zusammenhänge tatsächlich aufzuklären.

4.9. Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin

Bemerkenswert war zunächst das Ergebnis, daß nach einer Gabe von 7,5 mg/kg Clozapin die Konzentrationen von Clozapin und Norclozapin im Serum vom Körpergewicht der verwendeten Tiere, bzw. von deren Alter abhängig war. Schwere Tiere wiesen höhere Serumkonzentrationen auf. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten bei Menschen, daß ältere Patienten bei gleicher Behandlung höhere Serumkonzentrationen von Clozapin aufweisen (Haring et al., 1990). Der Grund hierfür könnten sein, daß ältere Individuen Clozapin über andere oder verlangsamte Stoffwechselwege abbauen als jüngere. Der Altersunterschied der verwendeten Rattengruppen ist jedoch nicht sehr groß (190-250 g vs. 380-580 g entspricht ca. 2 Monate vs. ca. 4 Monate).

Andererseits errechnete sich die injizierte Clozapinmenge auf der Grundlage der Körpermasse, so daß schwere Tiere absolut mehr Clozapin erhielten als leichte. Eine Injektion in den Bauchraum stellt sicher, daß das Clozapin über den stark durchbluteten Darm vollständig oder nahezu vollständig in den Blutkreislauf aufgenommen wird, wobei der Serumpeak bereits nach 10 min erreicht wird (Baldessarini et al., 1993). Da das höhere Gewicht älterer Tiere zu einem großen Anteil durch eine Vermehrung von Muskel- und Fettgewebe zustande kommt, Clozapin sich jedoch kaum in diesen Geweben anreichert (Gardiner et al., 1978), kann die Clozapinkonzentration im Serum der älteren Tiere höhere Werte erreichen. Allerdings lassen sich hiermit allein die erheblich höheren Serumkonzentration der älteren Tieren nicht erklären, zumal sich Clozapin auch in Organen wie Lunge, Leber, Milz und Gehirn anreichert (Gauch & Michaelis, 1971; Gardiner et al., 1978; Baldessarini et al., 1993). Denkbar ist eine verminderte Aktivität von Cytochrom-P450-Enzymen, speziell CYP1A2, dem sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen der Hauptanteil des Umsatzes von Clozapin zu Norclozapin zugeschrieben wird (Pirmohamed et al., 1995; Aitchison et al., 2000).

Erwartungsgemäß waren die Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin bei altersgematchten Tieren abhängig von der Dosierung. So resultierte in Übereinstimmung mit der Literatur eine Behandlung mit höheren Clozapindosierungen in höheren Serumkonzentrationen von Clozapin und Norclozapin (Baldessarini et al., 1993). Auch ein Einfluß der Behandlungswiederholungen war feststellbar. Nach achtmaliger Applikation von 7,5 mg/kg Clozapin war die Serumkonzentration von Clozapin, aber nicht von Norclozapin sechs Stunden nach Injektion signifikant geringer als nach einmaliger Applikation. Diese Beobachtung ist möglicherweise für die Abschwächung von Clozapinwirkungen über den Zeitraum einer subchronischen Behandlung von Bedeutung. Anscheinend erfolgt der Abbau von Clozapin bei Ratten bei wiederholter Verabreichung schneller als in einem Clozapin-naiven Tier. Im Gegensatz dazu wurde bei Patienten festgestellt, daß die Elimination von Clozapin bei wiederholter Behandlung langsamer vonstatten geht (Choc et al., 1990; Cutler, 2001). Die Veröffentlichung von Pharmakokinetiken im Vergleich von akuter und wiederholter Verabreichung von Clozapin bei Ratten oder anderen Labortieren blieb bisher aus.

4.10. Abschlußdiskussion

Clozapin ruft in einigen Aspekten des Schlafverhaltens und für diverse humorale Parameter, sprich TNF- α und Leptin, äquivalente Wirkungen bei Menschen und Ratten hervor, während in anderen Bereichen, nämlich bezüglich der Körpertemperatur und der Nahrungsaufnahme, die Reaktionen von Mensch und Tier nicht identisch sind (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Vergleich der Wirkungen von Clozapin beim Menschen und bei der Ratte.

Für die Wirkungen bei der Ratte wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt. Die Wirkungen beim Menschen wurden den angegebenen Literaturstellen entnommen. \uparrow = Zunahme; \downarrow = Abnahme; \leftrightarrow = keine Wirkung; – = nicht bestimmt; + = vorhanden.

Parameter	Clozapin-Wirkung auf		Quelle der Humandaten
	Ratte	Mensch	
TNF- α	\uparrow	\uparrow	Pollmächer et al., 1996; Hinze-Selch et al., 2000
Temperatur	\downarrow	\uparrow	Blum & Mauruschat, 1972; Gaertner et al., 1989; Hinze-Selch et al., 1995, 1997; Nitenson et al., 1995; Pollmächer et al., 1996 u.v.a.
Schlafverhalten			
Non-REM-Schlaf	\uparrow	\uparrow	Wetter et al., 1996; Hinze-Selch et al., 1997; Lee et al., 2001
REM-Schlaf	\downarrow	\leftrightarrow	Wetter et al., 1996; Hinze-Selch et al., 1997; Lee et al., 2001
Schlafkontinuität	\uparrow	\uparrow	Touyz et al., 1977; Wetter et al., 1996; Hinze-Selch et al., 1997; Lee et al., 2001
Tiefschlaf	–	\downarrow	Touyz et al., 1977; Hinze-Selch et al., 1997
SWA	\downarrow	–	
EEG-Veränderungen	+	+	Günther et al., 1993; Schuld et al., 2000 u.v.a.
Nährungsverhalten			
Futteraufnahme	\downarrow	\uparrow	Briffa & Meehan, 1998; Brömel et al., 1998
Wasseraufnahme	\leftrightarrow	–	
Körpermasse	\downarrow	\uparrow	Cohen et al., 1990; Umbricht et al., 1994; Kraus et al., 1999; Hinze-Selch et al., 2000 u.v.a.
Leptin	\uparrow	\uparrow	Kraus et al., 1999; Hinze-Selch et al., 2000

Ratten scheinen daher für ausgewählte Wirkungen von Clozapin, z.B. auf das Schlafverhalten, ein geeignetes Modelltier darzustellen, allerdings sind aus Tierversuchen gewonnene Ergebnisse in Hinsicht auf die Übertragbarkeit auf den Menschen aufgrund der offensichtlichen Vielzahl von unterschiedlichen neurophysiologischen Regulationsmechanismen bei beiden Spezies stets mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten.

Einige Wirkungen, die mit Clozapin bei der Ratte erzielt werden konnten, entsprachen jenen Veränderungen, die nach Applikation von TNF- α beobachtet werden können. Dies unterstützt die Hypothese, daß einige der Effekte von Clozapin über das Zytokin TNF- α vermittelt werden. Die Tab. 15 zeigt eine Gegenüberstellung von Effekten von Clozapin und TNF- α bei der Ratte.

Tab. 15: Vergleich der Effekte von Clozapin und TNF- α auf die Ratte. Für die Clozapinwirkungen wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt. Die Wirkungen von TNF- α wurden den angegebenen Literaturstellen entnommen. \uparrow = Zunahme; \downarrow = Abnahme; \leftrightarrow = keine Wirkung

Parameter	Wirkungen von		Quelle der Daten über TNF- α
	Clozapin	TNF- α	
Temperatur	\downarrow	\uparrow	Kluger, 1991; Stefferl et al., 1996 u.v.a.
Schlafverhalten			
Non-REM-Schlaf	\uparrow	\uparrow	Nistico et al., 1992; Terao et al., 1998; Kubota et al., 2001
REM-Schlaf	\downarrow	\downarrow	Terao et al., 1998; Kubota et al., 2001
SWA	\downarrow	\uparrow	Kubota et al., 2001
Nährungsverhalten			
Futteraufnahme	\downarrow	\downarrow	Kapás et al., 1992; Tamura et al., 1997; Swiergiel et al., 1997; Terao et al., 1998
Wasseraufnahme	\leftrightarrow	\downarrow	Tamura et al., 1997
Körpermasse	\downarrow	\downarrow	Ling et al., 1997; Tamura et al., 1997; Kouhata et al., 2001
Leptin	\uparrow	\uparrow	Grunfeld et al., 1996; Sarraf et al., 1997

Gegen die Hypothese, daß TNF- α als Mediator einiger der Wirkungen des Clozapins fungiert, spricht die Tatsache, daß nur ein kurzzeitiger Einfluß von Clozapin auf die Konzentrationen von TNF- α im Rattenhirn nachgewiesen werden konnte, wohingegen viele Effekte des Clozapins über einen langen Zeitraum anhielten, so z.B. die Veränderungen des Schlaf- und des Nahrungsverhaltens. Allerdings ist TNF- α in der Lage, langanhaltende oder spät einsetzende Effekte zu erzielen, wie jene bei Anorexia (Meguid et al., 2000) und auf die lokomotorische Aktivität (Pauli et al., 1998). Weiterhin ist TNF- α ein hochpotentes Biomolekül, das bereits in Konzentrationsbereichen, die möglicherweise mit der Empfindlichkeit heutiger Meßmethoden nicht erfaßt werden können, physiologische Wirkungen entfalten kann. Die Rolle von TNF- α bei den Effekten von Clozapin läßt sich nur über weitergehende Versuche ermitteln.

4.11. Ausblick

Die vorgelegten Studien zeigen in einer Folge vorausgegangener Arbeiten, daß dem Immunsystem bei der Erforschung und Behandlung psychiatrischer Erkrankungen wesentlich mehr Bedeutung beigemessen werden sollte. Obwohl die Zusammenhänge nicht a priori auf der Hand lagen, finden sich teils bereits sehr frühe Hinweise auf eine Verknüpfung von geistigem Befinden und Immunsystem und auf die Beeinflussung des Immunsystems durch Neuroleptika, die lange Zeit wenig Beachtung erfuhren, aber durch neuere Erkenntnisse untermauert werden. Speziell im Fall des Clozapins verweisen jüngste Forschungsergebnisse darauf, daß einige der bedeutendsten Nebenwirkungen dieses Neuroleptikums - Blutbildveränderungen, Sedierung und Gewichtszunahme - auf Immunmodulationen zurückzuführen sind. Die Erfahrungen mit Clozapin lehren, auch in Hinblick auf die Geschichte der Agranulozytosen, daß selbst sekundär erscheinenden Phänomenen in der Wissenschaft die entsprechende Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte.

Konkret bedeutet dies z.B., daß bei Therapie mit Psychopharmaka Immunparameter verstärkt bestimmt, bzw. falls dies bereits geschehen, auch im Falle von Negativbefunden veröffentlicht werden sollten, um dem wissenschaftlichen Meinungsaustausch einen größeren Fundus an Daten verfügbar zu machen. Überhaupt ist die Tatsache, daß die Substanzklasse der Neuroleptika in 'typisch' und 'atypisch' unterteilt werden, was voraussetzt, daß eine Gruppe Eigenschaften besitzt, die die andere nicht hat, ein gutes Argument, um in der Forschung auch negativen Befunden verstärkt Anerkennung zuteil werden zu lassen.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Vermutungen anderer Autoren, daß TNF- α und Leptin einen wichtigen Beitrag zum atypischen Charakter von Clozapin leisten könnten. Um die Rolle dieser Proteine in diesem Kontext endgültig zu klären, bedarf es einer Reihe weitergehender Untersuchungen, bei denen die Ratte als Modellorganismus dienen kann. Grundlage dafür ist zunächst die Aufnahme von Bildungs- bzw. Freisetzungskinetiken von TNF- α bzw. Leptin nach akuter und chronischer Behandlung von Ratten mit Clozapin und anderen Neuroleptika.

Der Anteil von TNF- α an den Änderungen des Schlaf-Wach-Verhaltens und der Nahrungsaufnahme ließe sich über eine Wiederholung der durchgeführten Versuche während einer funktionellen Blockade von TNF- α , z.B. über die Injektion von TNF- α -Rezeptoren oder Anti-TNF- α -Antikörpern, bei anschließender Behandlung mit Clozapin ermitteln.

Ergänzend sollten geschlechtsspezifische und tageszeitabhängige Unterschiede untersucht werden. Geschlechtsbezogene Unterschiede im Nahrungsverhalten und der Gewichtsentwicklung von Ratten unter Clozapinbehandlung sind in der Literatur bereits beschrieben. Das Freßverhalten der Nager unter diesen Bedingungen ist jedoch bisher noch nicht näher charakterisiert. Durch die Aufnahme von Freßmustern (Anzahl und Größe eingenommener Mahlzeiten) bei paralleler Erfassung von Leptin und TNF- α könnte z.B. die These geprüft werden, ob weibliche Ratten während einer Clozapinbehandlung deshalb nicht zu- oder abnehmen, weil sie alternierend über den Sexualzyklus mal mehr und mal weniger als unbehandelte Tiere fressen.

Über die Abhängigkeit der Clozapin-Wirkungen auf das Verhalten von Ratten von der Tageszeit ist bisher noch nichts bekannt. Ähnlich wie bei vielen Schlafmitteln wären nach Gabe zur Ruhe- oder Aktivitätsperiode unterschiedliche Effekte von Clozapin z.B. auf das Schlaf-Wach-Verhalten vorstellbar.

Neben dem Behandlungszeitpunkt kann auch mit dem Verabreichungsmodus experimentiert werden, indem beispielsweise eine geringe Anfangsdosierung über den Behandlungszeitraum erhöht wird. Ein solcher Versuch würde weitere Erkenntnisse über die Toleranzentwicklung bei vielen Wirkungen von Clozapin geben, die in der vorliegenden Arbeit jeweils nur für die hohe Dosierung feststellbar waren. Auffälligerweise entwickelten sich für die niedrige Dosierung viele Effekte erst nach mehrmaliger Behandlung, weshalb Versuche mit geringer Dosierung oder variablem Behandlungsmodus über einen längeren Zeitraum als in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden sollten (z.B. zwei Wochen). Vermutlich würde als deren Ergebnis die häufig von Human- und Tierforschern ausgesprochene Empfehlung wiederholt werden, daß eine Behandlung mit Clozapin mit geringer Startdosierung und unter vorsichtiger Dosiserhöhung erfolgen sollte.

Untersuchungen zum Anteil von Leptin an den Wirkungen von Clozapin sind weniger leicht realisierbar als jene für TNF- α , da für Leptin bisher noch keine Möglichkeiten der funktionellen Blockade existieren. Mit einem relativ einfach zu verwirklichenden Experiment ließe sich der Einfluß des Nahrungsverhaltens auf den Anstieg der Leptinwerte nach Clozapingabe untersuchen. Hierzu könnte Ratten (oder auch Menschen) vor einer Clozapingabe für einige Stunden der Zugang zu Nahrung verweigert werden. Der Vergleich der Serum-Leptin-Konzentrationen von Gruppen mit und ohne anhaltenden Nahrungsentzug nach Clozapinbehandlung sollte Hinweise auf die beteiligten Mechanismen liefern.

Insgesamt bietet die Erforschung der Reaktionen des Immunsystems und Zytokin-ähnlicher Proteine wie Leptin nicht nur unter Therapie mit Psychopharmaka ein noch weites Betätigungsfeld.

5. Zusammenfassung

Clozapin ist das älteste atypische Neuroleptikum, das sich in seinem therapeutischen Eigenschaften als auch in seinen Nebenwirkungen von den typischen Neuroleptika unterscheidet. Einige der wichtigsten Nebenwirkungen von Clozapin, wie Agranulozytosen, Fieber, starke Sedierung und Gewichtszunahme, sind höchstwahrscheinlich auf Modulationen des Immunsystems zurückzuführen, insbesondere auf Veränderungen im TNF- α -System. Bei detaillierter Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen ließen sich Maßnahmen zur Vorhersage, Prophylaxe, Früherkennung und Therapie der zu erwartenden Nebenwirkungen entwickeln. Vermutlich würden sich sogar kausale Zusammenhänge zwischen der Entstehung der Symptome einer Schizophrenie, der Behandlung durch Neuroleptika und dem Immunsystem ergeben. Viele der dafür nötigen Versuche sind jedoch nur an einem Modellorganismus durchführbar.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Clozapin auf Schlafverhalten, Nahrungsaufnahme, Lokomotion und Temperatur von Ratten sowie auf deren TNF- α - und Leptin-Konzentrationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß eine Reihe der bei Menschen unter Clozapinbehandlung vorkommenden Nebenwirkungen auch bei Ratten nach Applikation von Clozapin auftreten.

Nach einer initialen Störung des Schlafes bei gleichzeitiger Unterdrückung der Aktivität langsamer Wellen im EEG des non-REM-Schlafes durch hohe Clozapin-Dosierungen, vergleichbar mit den Schlafstörungen, die bei Patienten unter Clozapin-induziertem Fieber auftreten, förderte Clozapin dosisunabhängig den non-REM-Schlaf bei Verbesserung der Schlafkontinuität. Dies entspricht den Ergebnissen in der Humanliteratur. Desweiteren unterdrückte Clozapin den REM-Schlaf der Ratten, ein Befund, der auch in einigen Humanstudien tendentiell zu beobachten war. Wie beim Menschen verursachte Clozapin bei den Ratten EEG-Veränderungen im Wachzustand.

Desweiteren konnte nach akuter Verabreichung von Clozapin ein dosisabhängiger Anstieg von TNF- α im frontalen Kortex der Ratten gefunden werden. Bei Patienten erhöht Clozapin die TNF- α -Konzentrationen im Serum. Die durch Clozapin hervorgerufenen Schlafveränderungen ähneln sowohl beim Menschen als auch bei Ratten jenen nach einer Erhöhung von TNF- α , weshalb bei beiden Spezies TNF- α als Mediator dieser Veränderungen in Frage kommt.

Zudem wurde bei den Ratten, in Übereinstimmung mit den Befunden bei Patienten, nach akuter Verabreichung von Clozapin ein Anstieg der Serum-Leptin-Konzentrationen gefunden, obwohl es im Gegensatz zu den Befunden in der Humanliteratur bei Ratten nicht zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes kam.

Konträr zu den Patientenstudien, in denen von transientem Fieber berichtet wird, erniedrigte Clozapin dosisabhängig die Körper- und Gehirntemperatur bei Ratten.

Die weitere Erforschung des Anteils von TNF- α und Leptin an den Effekten von Clozapin ist dringend zu empfehlen, da hieraus nicht nur Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieses Neuroleptikums, sondern auch Impulse für die Neuentwicklung von Neuroleptika zu erwarten sind.

6. Literaturnachweis

- Adrien J, Tissier MH, Lanfumey L, Haj-Dahmane S, Jolas T, Franc B, Hamon M (1992) Central action of 5-HT₃ receptor ligands in the regulation of sleep-wakefulness and raphe neuronal activity in the rat. *Neuropharmacology* 31(6):519-29
- Aitchison KJ, Jann MW, Zhao JH, Sakai T, Zaher H, Wolff K, Collier DA, Kerwin RW, Gonzalez FJ 2000 Clozapine pharmacokinetics and pharmacodynamics studied with CYP1A2-null mice. *Journal of Psychopharmacology* 14(4):353-9
- Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL, Schaaf JA (1993) Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *New England Journal of Medicine* 329(3):162-7
- Andersen PH, Braestrup C (1986) Evidence for different states of the dopamine D₁ receptor: clozapine and fluperlapine may preferentially label an adenylate cyclase-coupled state of the D₁ receptor. *J Neurochem* 47:1822
- Anderson JA, Knott AW, Wilson MA, Garrison RN, Sims DE, Edwards MJ (1995) The effect of soluble tumor necrosis factor receptor-II on endotoxin-mediated hemodynamic instability. *Journal of Surgical Research* 58(1): 53-7
- Angst J, Bente D, Berner P, Heimann H, Helmchen H, Hippus H (1971) Das klinische Wirkungsbild von Clozapin (Untersuchung mit dem AMP-System). *Pharmacopsychiatry* 13:201-211
- Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118:273-4
- Baldessarini RJ, Centorrino F, Flood JG, Volpicelli SA, Huston-Lyons D, Cohen BM (1993) Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology* 9(2):117-24
- Baldessarini RJ, Frankenburg FR (1991): Clozapine, a novel antipsychotic agent. *N Engl J Med* 324:746-754
- Baptista T, Mata A, Teneud L, de Quijada M, Han HW, Hernandez L (1993) Effects of long-term administration of clozapine on body weight and food intake in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 45(1):51-4
- Baptista T, Parada M, Hernandez L (1987) Long term administration of some antipsychotic drugs increases body weight and feeding in rats. Are D₂ dopamine receptors involved?. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 27 (3):399-405
- Baptista T, Parada MA, Murzi E (1988) Puberty modifies sulpiride effects on body weight in rats. *Neuroscience Letters* 92(2):161-4
- Barbaccia ML, Affricano D, Purdy RH, Maciocco E, Spiga F, Biggio G (2001) Clozapine, but not haloperidol, increases brain concentrations of neuroactive steroids in the rat. *Neuropsychopharmacology* 25(4):489-97
- Bardgett ME, Jackson JL, Taylor BM, Csernansky JG (1998): The effects of kainic acid lesions on locomotor responses to haloperidol and clozapine. *Psychopharmacology* 135:270-8
- Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW (1997) Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138(10):4463-72
- Bauer J, Hohagen F, Gimmel E, Bruns F, Lis S, Krieger S, Ambach W, Guthmann A, Grunze H, Fritsch-Montero R, Weissbach A, Ganter U, Frommberger U, Riemann D, Berger M (1995) Induction of cytokine synthesis and fever suppresses REM sleep and improves mood in patients with major depression. *Biol Psychiatry* 38: 611-21.
- Beasley CM Jr, Sanger T, Satterlee W, Tollefson G, Tran P, Hamilton S (1996) Olanzapine versus placebo: results of a double-blind, fixed-dose olanzapine trial. *Psychopharmacology* 124(1-2):159-67
- Beutler B, Cerami A (1988) The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry* 27(20):7575-82

- Bianchi M, Sacerdote P, Ricchiardi-Castagnoli P, Mantegazza P, Panerai AE (1992) Central effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on nociceptive thresholds and spontaneous locomotor activity. *Neuroscience Letters* 148(1-2):76-80
- Bluthé RM, Laye S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P (2000) Role of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* 12(12):4447-56
- Blum A, Girke W (1973) Marked increase in REM sleep produced by a new antipsychotic compound. *Clin Electroencephalogr* 4:80-84
- Blum A, Mauruschat W (1972) Temperaturanstiege und Bluteiweißveränderungen unter der Therapie mit Neuroleptika - unter besonderer Berücksichtigung des neuartigen Dibenzodiazepin-Derivates Clozapin. *Pharmakopsychiatrie* 5:155-169
- Bluth R, Langnickel R (1985) Effects of haloperidol and low dose clozapine on the acetylcholine turnover rate in rat forebrain structures. *Biomedica Biochimica Acta* 44(10):1531-9
- Borbély AA, Tobler I (1989) Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev* 69: 605-70
- Borbély AA (1982) A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1: 195-204
- Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB (1993) Distribution and characterisation of tumor necrosis factor- α -like immuno-reactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol* 337:543-547
- Bredow S, Guha-Thakurta N, Taishi P, Obál F Jr., Krueger JM (1997) Diurnal variations of tumor necrosis factor- α mRNA and α -tubulin mRNA in rat brain. *Neuroimmunomodulation* 4: 84-90
- Briffa D, Meehan T (1998) Weight changes during clozapine treatment. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 32(5):718-21
- Britton DR, Britton KT (1981) A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 15(4):577-82
- Brömel T, Blum WF, Ziegler A, Schulz E, Bender M, Fleischhaker C, Remschmidt H, Krieg JC, Hebebrand J (1998) Serum leptin levels increase rapidly after initiation of clozapine therapy. *Molecul Psychiatry* 3(1):76-80
- Bürki HR, Ruch W, Asper H, Baggiolini M, Stille G (1974) Effect of single and repeated administration of clozapine on the metabolism of dopamine and noradrenaline in the brain of the rat. *European Journal of Pharmacology* 27(2):180-90
- Burrell R (1994) Human responses to bacterial endotoxin. *Circ Shock* 43: 137-53
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269(5223):546-9
- Casey DE (1996) Behavioral effects of sertindole, risperidone, clozapine and haloperidol in Cebus monkeys. *Psychopharmacology* 124(1-2):134-40
- Centorrino F, Price BH, Tuttle M, Bahk WM, Hennen J, Albert MJ, Baldessarini RJ (2002) EEG abnormalities during treatment with typical and atypical antipsychotics. *American Journal of Psychiatry* 159(1):109-15
- Chin-Chance C, Polonsky KS, Schoeller DA (2000) Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 85(8): 2685-91
- Choc MG, Hsuan F, Honigfeld G, Robinson WT, Ereshefsky L, Crismon ML, Saklad SR, Hirschowitz J, Wagner R (1990) Single- vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients. *Pharmaceutical Research* 7(4):347-51

- Claghorn J, Honigfeld G, Abuzzahab FS Sr, Wang R, Steinbook R, Tuason V, Klerman G (1987) The risk and benefits of clozapine versus chlorpromazine. *J Clin Psychopharmacol* 7:377-384
- Clarenbach P, Hajak G, Klotz U, Koella WP, Lund R, Rudolf GAE, Rühle KH, Hrsg (1998) Schering Lexikon Schlafmedizin. MMV, Medizin-Verlag, München
- Cocchiara R, Albegiani G, Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N, Di Blasi F, Geraci D (1995) Effect of substance P on uterine mast cell cytokine release during the reproductive cycle. *Journal of Neuroimmunology* 60(1-2):107-15
- Cocchiara R, Albegiani G, Lampiasi N, Bongiovanni A, Azzolina A, Geraci D (1999) Histamine and tumor necrosis factor-alpha production from purified rat brain mast cells mediated by substance P. *NeuroReport* 10 (3):575-8
- Cohen S, Chiles J, MacNaughton A (1990) Weight gain associated with clozapine. *American Journal of Psychiatry* 147(4):503-4
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 334(5):292-5
- Coward DM, Imperato A, Urwyler S, White TG (1989) Biochemical and behavioural properties of clozapine. *Psychopharmacology* 99 Suppl:S6-12
- Coward DM (1992) General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry* 160(suppl 17):5-11
- Cunningham ET Jr, De Souza EB (1993) Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today* 14(4):171-6
- Cuomo V, Cagiano R, Mocchetti I, Coen E, Cattabeni F, Racagni G (1983): Behavioral and biochemical effects in the adult rat after prolonged postnatal administration of clozapine. *Psychopharmacology* 81:239-43
- Cutler NR (2001) Pharmacokinetic studies of antipsychotics in healthy volunteers versus patients. *Journal of Clinical Psychiatry* 62 Suppl 5:10-3; discussion 23-4
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62(Suppl):232
- Damianisch K, Rupprecht R, Lancel M (2001) The influence of subchronic administration of the neurosteroid allopregnanolone on sleep in the rat. *Neuropsychopharmacology* 25(4):576-84
- Derijk RH, Berkenbosch F (1994) Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. *American Journal of Physiology* 266(1 Pt 2):R9-14
- Dickstein JB, Moldofsky H, Lue FA, Hay JB (1999) Intracerebroventricular injection of TNF- α promotes sleep and is recovered in cervical lymph. *Am J Physiol* 276: R1018-R1022
- Dinarelli CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MAJ, O'Connor JV (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 163: 1433-50
- Dose M (1997) Spektrum Neuroleptika und andere Psychopharmaka. Aesopus Verlag, Stuttgart
- Druss BG, Mazure CM, (1993) Transient fever and hematologic abnormalities during clozapine use. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 13(2):155-6
- Dugovic C, Wauquier A, Leysen JE, Marrannes R, Janssen PA (1989) Functional role of 5-HT₂ receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology* 97(4):436-42
- Fang J, Wang Y, Krueger JM (1997) Mice lacking the TNF 55 kDa receptor fail to sleep more after TNF- α treatment. *J Neurosci* 17: 5949-55
- Fang J, Wang Y, Krueger JM (1998) Effects of interleukin-1b on sleep are mediated by the type I receptor. *Am J*

- Physiol 43: R655-R660
- Farrar WL, Hill JM, Harel-Bellan A, Vinocour M (1987a) The immune logical brain. *Immunological Reviews* 100:361-78
- Farrar WL, Kilian P, Hill JM, Ruff MR, Pert CB (1987b) Visualization of cytokine and virus receptors common to the immune and central nervous system. *Lymphokine Research* 6(1):29-34
- Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K (1998) N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 28(3):689-94
- Fischer V, Schmitt U, Weigmann H, Von Keller B, Reuss S, Hiemke C, Dahmen N (1998) Chronical haloperidol and clozapine treatment in rats: differential RNA display analysis, behavioral studies and serum level determination. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 22(7):1129-39
- Floyd RA, Krueger JM (1997) Diurnal variation of TNF- α in the rat brain. *Neuroreport* 8: 915-8
- Freudenreich O, Weiner RD, McEvoy JP (1997) Clozapine-induced electroencephalogram changes as a function of clozapine serum levels. *Biological Psychiatry* 42(2):132-7
- Gaertner HJ, Fischer E, Hoss J (1989) Side effects of clozapine. *Outcomes Management* 99 Suppl:S97-100
- Ganguli R, Reynolds CF 3rd., Kupfer DJ (1987) Electroencephalographic sleep in young, never-medicated schizophrenics. A comparison with delusional and nondelusional depressives and with healthy controls. *Archives of General Psychiatry* 44(1):36-44
- Garcia-Garcia F, Drucker-Colin R (1999) Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Progress in Neurobiology* 58:297-314
- Gardiner TH, Lewis JM, Shore PA (1978) Distribution of clozapine in the rat: localization in lung. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 206(1):151-7
- Gardner I, Zahid N, MacCrimmon D, Uetrecht JP (1998) A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes. *Molecular Pharmacology* 53(6):991-998
- Gauch R, Michaelis W (1971) The metabolism of 8-chloro-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-5H-dibenzo(b,e) (1,4) diazepine (clozapine) in mice, dogs and human subjects. *Farmaco*. 26(11):667-81
- Gemma C, Imeri L, De Simoni MG, Mancina M (1997) Interleukin-1 induces changes in sleep, brain temperature, and serotonergic metabolism. *Am J Physiol* 272: R601-R606
- Gershanik O, Heikkila RE, Duvoisin RC (1983) Behavioral correlations of dopamine receptor activation. *Neurology* 33(11):1489-92
- Ghezzi P, Santo ED, Sacco S, Foddi C, Barbaccia ML, Mennini T (2000) Neurosteroid levels are increased in vivo after LPS treatment and negatively regulate LPS-induced TNF production. *European Cytokine Network* 11(3): 464-9
- Goudie AJ, Smith JA, Halford JCG (2002) Characterization of olanzapine-induced weight gain in rats. *Journal of Psychopharmacology* 16(4):291-6
- Griebel G (1995) 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacology & Therapeutics* 65(3):319-95
- Gudelsky GA, Koenig JI, Simonovic M, Koyama T, Ohmori T, Meltzer HY (1987) Differential effects of haloperidol, clozapine, and fluperlapine on tuberoinfundibular dopamine neurons and prolactin secretion in the rat. *Journal of Neural Transmission* 68(3-4):227-40
- Gudelsky GA, Koenig JI, Simonovic M, Koyama T, Ohmori T, Meltzer HY (1987) Differential effects of haloperidol, clozapine, and fluperlapine on tuberoinfundibular dopamine neurons and prolactin secretion in the

- rat. *Journal of Neural Transmission - General Section* 68(3-4):227-40
- Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ (1997) Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation* 100(7):1853-62
- Günther W, Baghai T, Naber D, Spatz R, Hippus H (1993) EEG alterations and seizures during treatment with clozapine. A retrospective study of 283 patients. *Pharmacopsychiatry* 26(3):69-74
- Hansen MK, Krueger JM (1997) Subdiaphragmatic vagotomy blocks the sleep- and fever-promoting effects of interleukin-1-beta. *Am J Physiol* 42: R1246-R1253
- Haring C, Fleischhacker WW, Schett P, Humpel C, Barnas C, Saria A (1990) Influence of patient-related variables on clozapine plasma levels. *American Journal of Psychiatry* 147(11):1471-5
- Havel PJ (2000) Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proceedings of the Nutrition Society* 59(3):359-71
- Hebebrand J, Blum WF, Barth N, Coners H, Englaro P, Juul A, Ziegler A, Warnke A, Rascher W, Remschmidt H (1997) Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Molecular Psychiatry* 2(4):330-4
- Heh CW, Herrera J, DeMet E, Potkin S, Costa J, Sramek J, Hazlett E, Buchsbaum MS (1988) Neuroleptic-induced hypothermia associated with amelioration of psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 1(2):149-56
- Higgins GA, Olschowka JA (1991) Induction of interleukin-1b mRNA in adult rat brain. *Molec Brain Res* 9:143-8
- Hilakivi I (1987) Biogenic amines in the regulation of wakefulness and sleep. *Medical Biology* 65(2-3):97-104
- Hinze-Selch D, Deuschle M, Weber B, Heuser I, Pollmächer T (2000) Effects of coadministration of clozapine and fluvoxamine versus clozapine monotherapy on blood cell counts, plasma levels of cytokines and body weight. *Psychopharmacology* 149:163-169
- Hinze-Selch D, Mullington J, Orth A, Lauer CJ, Pollmächer T (1997) Effects of clozapine on sleep: A longitudinal study. *Biological Psychiatry* 42(4):260-6
- Hinze-Selch D, Mullington J, Pollmacher T (1995) Sleep during clozapine-induced fever in a schizophrenic patient. *Biological Psychiatry* 38(10):690-3
- Hinze-Selch D, Mullington J, Pollmacher T (1996) Clozapine, cytokines, fever and sleep. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 146(13-14):311-3
- Hippus H (1999) Pharmazeutische Industrie und klinische Forschung. Historische Anmerkungen zur Entwicklungsgeschichte von Clozapin. in: Naber D, Müller-Spahn F, Hrsg. *Leponex - Pharmakologie und Klinik eines atypischen Neuroleptikums*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 132-138
- Hohagen F, Timmer J, Weyerbrock A, Fritsch-Montero R, Ganter U, Krieger S, Berger M, Bauer J (1993) Cytokine production during sleep and wakefulness and its relationship to cortisol in healthy humans. *Neuropsychobiology* 28: 9-16
- Huberman A, Turek VF, Carlisle HJ (2000) Clozapine does not induce a motor impairment in operant responding for heat reinforcement. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 67(2):307-12
- Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Chen TY, Morrison DC (1992) Tumor necrosis factor-alpha gene expression in the tissue of normal mice. *Cytokine* 4:340-346
- Ichikawa J, Dai J, O'Laughlin IA, Fowler WL, Meltzer HY(2002) Atypical, but not typical, antipsychotic drugs increase cortical acetylcholine release without an effect in the nucleus accumbens or striatum. *Neuropsychopharmacology* 26(3):325-39
- Ilyin SE, Gayle D, Flynn MC, Plata-Salaman CR (1998) Interleukin-1beta system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-alpha, TGF-beta1 and neuropeptide Y mRNAs in specific

- brain regions during bacterial LPS-induced anorexia. *Brain Research Bulletin* 45(5):507-15
- Imeri L, Opp MR, Krueger JM (1993) An IL-1 receptor and an IL-1 receptor antagonist attenuate muramyl dipeptide- and IL-1-induced sleep and fever. *Am J Physiol* 265: R907-R913
- Imperato a, Angelucci L (1988) Effects of the atypical neuroleptics clozapine and fluperlapine on the in vivo dopamine release in the dorsal striatum and in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 96:79
- Jackson DM, Hashizume M (1986) Bromocriptine induces marked locomotor stimulation in dopamine-depleted mice when D-1 dopamine receptors are stimulated with SKF38393. *Psychopharmacology* 90(1):147-9
- Jackson DM, Mohell N, Bengtsson A, Malmberg A (1995) Why does clozapine stimulate the motor activity of reserpine-pretreated rats when combined with a dopamine D1 receptor agonist?. *European Journal of Pharmacology* 282(1-3):137-44
- Jackson DM, Wikstrom H, Liao Y (1998) Is clozapine an (partial) agonist at both dopamine D1 and D2 receptors? *Psychopharmacology* 138(2):213-6
- Jankowiak R, Stern JJ (1974) Food intake and body weight modifications following medial hypothalamic hormone implants in female rats. *Physiology & Behavior* 12(5):875-9
- Jouvet M (1968) Insomnia and decrease of cerebral 5-hydroxytryptamine after destruction of the raphe system in the cat. *Advances in Pharmacology* 6(Pt B):265-79
- Jouvet M (1972) The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und Experimentellen Pharmakologie* 64:166-307
- Jouvet M (1999) Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl):24S-27S
- Jus K, Bouchard M, Jus AK, Villeneuve A, Lachance R (1973) Sleep EEG studies in untreated, long-term schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry* 29(3):386-90
- Kalivas PW (1982) Histamine-induced arousal in the conscious and pentobarbital-pretreated rat. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 222(1):37-42
- Kane JM (1992) Clinical efficacy of clozapine in treatment-refractory schizophrenia: an overview. *Br J Psychiatry* 160(Suppl):41-45
- Kane JM, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H et al. (1988) Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 45:789-96
- Kapás L, Hong L, Cady AB, Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM (1992) Somnogenic, pyrogenic, and anorectic activities of tumor necrosis factor- α and TNF- α fragments. *Am J Physiol* 263: R708-R715
- Karacan I, Wolff SM, Williams RL, Hirsch CJ, Webb WB (1968) The effects of fever on sleep and dream patterns. *Psychosomatics* 9: 331-9
- Karoum F, Egan MF (1992) Dopamine release and metabolism in the rat frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum: a comparison of acute clozapine and haloperidol. *British Journal of Pharmacology* 105(3):703-7
- Kim KB (1986) Effects of antipsychotic drugs on cellular immunity in mice. *Yonsei Medical Journal* 27:59-66
- Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, Donner DB (1991) Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 181(3):1532-8
- Kouhata S, Kagaya A, Nakae S, Nakata Y, Yamawaki S (2001) Effect of acute lipopolysaccharide administration on (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2 aminopropane-induced wet dog shake behavior in rats: comparison with body weight change and locomotor activity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 25(2):395-407
- Kraus T, Haack M, Schuld A, Hinze-Selch D, Kühn M, Uhr M, Pollmächer T (1999) Body weight and leptin plasma levels during treatment with antipsychotic drugs. *Am J Psychiatry* 156:312-314

- Kroemer SA, Loeber J, Lancel, Neumann ID (2000) Effect of oxytocin receptor agonist and antagonist on sleep in male rats. *Journal of Sleep Research* 9(Suppl. 1):105
- Krueger JM, Majde JA (1994) Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation. *Crit Rev Immunol* 14: 355-79
- Krueger JM, Obál F Jr (1997) Sleep regulatory substances. In: Schwartz WJ, editor. *Sleep science: Integrating basic research and clinical practice. Monographs in Clinical Neuroscience*. Basel: Karger, pp 175-94
- Kubota T, Fang J, Guan Z, Brown RA, Krueger JM (2001) Vagotomy attenuates tumor necrosis factor- α -induced sleep and EEG δ -activity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1213-R1220
- Kupfer DJ, Wyatt RJ, Scott J, Snyder F (1970) Sleep disturbance in acute schizophrenic patients. *American Journal of Psychiatry* 126(9):1213-23
- Kusumi I, Matsubara S, Takahashi Y, Isikane T, Koyama T (1995) Charakterization of [3 H]clozapine binding sites in rat brain. *J Neural Transm [Gen Sect]* 101:51-64
- Lacruz A, Baptista T, de Mendoza-Guillén, Hernández L (2000) Antipsychotic drug-induces obesity in rats: correlaton between leptin, insulin and body weight during sulphiride treatment. *Molecular Psychiatry* 5:70-6
- Lancel M, Crönlein J, Müller-Preuss P, Holsboer F (1995) Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats. *Am J Physiol* 37: R1310-R1318
- Lancel M, Faulhaber J, Holsboer F, Rupprecht R (1996) Progesterone induces changes in sleep comparable to those of agonistic GABAA receptor modulators. *American Journal of Physiology* 271(4 Pt 1):E763-72
- Lancel M, Faulhaber J, Schiffelholz T, Romeo E, Di Michele F, Holsboer F, Rupprecht R (1997) Allopregnanolone affects sleep in a benzodiazepine-like fashion. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 282(3): 1213-8
- Lancel M, Mathias S, Faulhaber J, Schiffelholz T (1996) Effect of interleukin-1b on EEG power density during sleep depends on circadian phase. *Am J Physiol* 270: R830-R837
- Lauer CJ, Schreiber W, Pollmacher T, Holsboer F, Krieg JC (1997) Sleep in schizophrenia: a polysomnographic study on drug-naive patients. *Neuropsychopharmacology* 16(1):51-60
- Laviano A, Meguid MM, Gleason JR, Yang ZJ, Renvyle T (1996) Comparison of long-term feeding pattern between male and female Fischer 344 rats: influence of estrous cycle. *American Journal of Physiology* 270(2 Pt 2):R413-9
- Leander J, Gleason S (2001) Preclinical studies of weight gain during olanzapine treatment. *World J Biol Psychiatry* 2(Suppl.1):P010-P013
- Leclerc C, Chedid L (1982) Macrophage activation by synthetic muramyl peptides. *Lymphokines* 7: 1-21
- Lee JH, Woo JI, Meltzer HY (2001) Effects of clozapine on sleep measures and sleep-associated changes in growth hormone and cortisol in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research* 103:157-166
- Legendre R, Piéron H (1913) Recherches sur le besoin de sommeil consécutif à une veille prolongée. *Z allgem Physiol* 14: 235-62
- Liebermann AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6348-6352
- Ling PR, Schwartz JH, Bistrrian BR (1997) Mechanisms of host wasting induced by administration of cytokines in rats. *American Journal of Physiology*. 272(3 Pt 1):E333-9
- Lin JS, Sakai K, Jouvét M (1994) Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat. *European Journal of Neuroscience* 6(4):618-25
- Lipska BK, Weinberger DR (1994) Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology* 10(3):199-205

- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* 25(7):1481-8
- Long NC, Otterness I, Kunkel SL, Vander AJ, Kluger MJ (1990) Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *American Journal of Physiology* 259(4 Pt 2):R724-8
- Long NC, Vander AJ, Kunkel SL, Kluger MJ (1990) Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. *American Journal of Physiology* 258(3 Pt 2):R591-5
- Maj J, Sowinska H, Baran L, Palider W (1974) The central action of clozapine. *Pol J Pharmacol Pharm* 26:425
- Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology* 38(4):379-95
- Mao CC, Marco E, Revuelta A, Bertilsson L, Costa E (1977) The turnover rate of gamma-aminobutyric acid in the nuclei of telencephalon: implications in the pharmacology of antipsychotics and of a minor tranquilizer. *Biological Psychiatry* 12(3):359-71
- Marco E, Mao CC, Cheney DL, Revuelta A, Costa E (1976) The effects of antipsychotics on the turnover rate of GABA and acetylcholine in rat brain nuclei. *Nature* 264(25):363-5
- Marco E, Mao CC, Revuelta A, Peralta E, Costa E (1978) Turnover rates of gamma-aminobutyric acid in substantia nigra, N. caudatus, globus pallidus and N. accumbens of rats injected with cataleptogenic and non-cataleptogenic antipsychotics. *Neuropharmacology* 17(8):589-96
- Mathias S, Schiffelholz T, Linthorst AC, Pollmächer T, Lancel M (2000) Diurnal variations in lipopolysaccharide-induced sleep, sickness behavior and changes in corticosterone levels in the rat. *Neuroendocrinol* 71: 375-85
- McEwen BS (1981) Neural gonadal steroid actions. *Science* 211(4488):1303-11
- McGinty DJ, Harper RM (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Research* 101(3):569-75
- Meerlo P, Turek FW (2001) Effects of social stimuli on sleep in mice: non-rapid-movement (NREM) sleep is promoted by aggressive interaction but not by sexual interaction. *Brain Research* 907:84-92
- Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F (2000) Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 16(10):843-57
- Meltzer HY (1995) Clozapine: Is another view valid?. *Am J Psychiat* 152(6):821-5
- Meltzer HY, Daniels S, Fang VS (1975) Clozapine increases rat serum prolactin levels. *Life Sciences* 17(3):339-42
- Meltzer HY, Goode DJ, Schyve PM, Young M, Fang VS (1979) Effect of clozapine on human serum prolactin levels. *American Journal of Psychiatry* 136(12):1550-5
- Menon MK, Gordon LI, Fitten J (1988) Interaction between clozapine and a lipophilic alpha 1-adrenergic agonist. *Life Sciences* 43(22):1791-804
- Menon MK, Lloyd RL, Fitten LJ (1990) Antagonism of the hypothermic effect of clozapine in mice by centrally-active alpha 2-adrenergic antagonists and alpha 1-adrenergic agonists. *Outcomes Management* 101(1):67-72
- Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM (1988) Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 104(2):280-6
- Millan MJ, Audinot V, Melon C, Newman-Tancredi A (1995) Evidence that dopamine D3 receptors participate in clozapine-induced hypothermia. *European Journal of Pharmacology* 280(2):225-9
- Moldofsky H, Lue FA, Eisen J, Keystone E, Gorczynski RM (1986) The relationship of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. *Psychosom Med* 48: 309-18
- Monnier M, Fallert M, Battacharya IC (1967) The waking action of histamine. *Experientia* 23(1):21-2
- Monti JM, Pellejero T, Jantos H (1986) Effects of H1- and H2-histamine receptor agonists and antagonists on sleep

- and wakefulness in the rat. *Journal of Neural Transmission - General Section* 66(1):1-11
- Müller-Preuss P, Rupprecht R, Lancel M (2002) The effects of the neuroactive steroid 3 alpha,5 alpha-THDOC on sleep in the rat. *NeuroReport* 13(4):487-90
- Mullington J, Korth C, Hermann DM, Orth A, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T (2000) Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol* 278: R947-R955
- Naber D, Müller-Spahn F (1997) Clozapin - Pharmakologie und Klinik eines atypischen Neuroleptikums. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 89-104
- Nadeau S, Rivest S (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* 93(4):1449-64
- Nakamura H, Seto Y, Motoyoshi S, Kadokawa T, Sunahara N (1988) Recombinant human tumor necrosis factor causes long-lasting and prostaglandin-mediated fever, with little tolerance, in rabbits. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 245(1):336-41
- Nauta WJH (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *Journal of Neurophysiology* 9: 285-316
- Neckelmann D, Ursin R (1993) Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Psychopharmacol* 93:226-9
- Ninan I, Kulkarni SK (1998) Partial agonistic action of clozapine at dopamine D2 receptors in dopamine depleted animals. *Psychopharmacology* 135(3):311-7
- Nistico G, De Sarro G, Rotiroti D (1992) Behavioral and electrocortical spectrum power changes of interleukins and tumor necrosis factor after their microinfusion into different areas of the brain. In: Smirne S, Franceschi M, Ferini-Strambi L, Zucconi M, editors. *Sleep, hormones, and immunological system*. Milano: Masson, pp 11-22
- Nitenson NC, Kando JC, Frankenburg FR, Zanarini MC, (1995) Fever associated with clozapine administration. *American Journal of Psychiatry* 152(7):1102
- Nylander I, Terenius L (1986) Chronic haloperidol and clozapine differentially affect dynorphin peptides and substance P in basal ganglia of the rat. *Brain Research* 380(1):34-41
- Oerther S, Ahlenius S (2000) Atypical antipsychotics and dopamine D(1) receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 292(2):731-6
- Ögren SO (1996): The behavioral pharmacology of typical and atypical antipsychotic drugs. In: Csernansky JG (ed): *Handbook of experimental pharmacology: Antipsychotics*, 102nd edn. Springer, Heidelberg 225-66
- Ongini E, Bonizzoni E, Ferri N, Milani S, Trampus M (1993) Differential effects of dopamin D-1 and D-2 receptor antagonist antipsychotics on sleep-wake patterns in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 266(2):726-731
- Opp M, Obál F Jr, Krueger JM (1989) Corticotropin-releasing factor attenuates interleukin 1-induced sleep and fever in rabbits. *Am J Physiol* 257: R528-R535
- Opp MR, Krueger JM (1991) Interleukin 1-receptor antagonist blocks interleukin 1-induced sleep and fever. *Am J Physiol* 260: R453-R457
- Opp MR, Krueger JM (1994a) Anti-interleukin-1b reduces sleep and sleep rebound after sleep deprivation in rats. *Am J Physiol* 266:R688-R695
- Opp MR, Krueger JM (1994b) Interleukin-1 is involved in responses to sleep deprivation in the rabbit. *Brain Res* 639:57-65

- Opp MR, Toth LA (1998) Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1b and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. *Life Sci* 62: 923-36
- Pajonk FG, Naber D, Hippus H (1997) Alternativen zum Clozapin? Klinische Erfahrungen zum Risperidon. in: Naber D, Müller-Spahn F, Hrsg. Clozapin - Pharmakologie und Klinik eines atypischen Neuroleptikums. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 89-104
- Parada MA, Hernandez L, Paez X, Baptista T, Puig de Parada M, de Quijada M (1989) Mechanism of the body weight increase induced by systemic sulphiride. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 33(1):45-50
- Parada MA, Hernandez L, Puig de Parada M, Rada P, Murzi E (1997) Selective action of acute systemic clozapine on acetylcholine release in the rat prefrontal cortex by reference to the nucleus accumbens and striatum. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 281(1):582-8
- Parada MA, Puig de Parada M, Hernandez L, Murzi E (1991) Ventromedial hypothalamus vs. lateral hypothalamic D2 satiety receptors in the body weight increase induced by systemic sulphiride. *Physiology & Behavior* 50(6):1161-5
- Pauli S, Linthorst AC, Reul JM (1998) Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *European Journal of Neuroscience* 10(3):868-78
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269(5223):540-3
- Pijnenburg AJ, van Rossum JM (1973) Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into the nucleus accumbens. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 25(12):1003-5
- Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, Park BK (1995) Metabolism and bioactivation of clozapine of human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 272:984-90
- Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y (1988) Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Research* 448(1):106-14
- Plata-Salaman CR (1999) Brain mechanisms in cytokine-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 24:25-41
- Pollmächer T, Haack M, Schuld A, Kraus T, Hinze-Selch D (2000) Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. *Journal of Psychiatric Research* 34:369-382
- Pollmächer T, Hinze-Selch D, Fenzel T, Kraus T, Schuld A, Mullington J (1997) Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors during treatment with haloperidol. *American Journal of Psychiatry* 154:1763-5
- Pollmächer T, Hinze-Selch D, Mullington J, Holsboer F (1995) Clozapine-induced increase in plasma levels of soluble interleukin-2 receptors. *Archives of General Psychiatry* 52(10):877-8
- Pollmächer T, Hinze-Selch D, Mullington J (1996) Effects of clozapine on plasma cytokine and soluble cytokine receptor levels. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 16(5):403-9
- Pollmächer T, Schreiber W, Gudewill S, Vedder H, Fassbender K, Wiedemann K, Trachsel L, Galanos C, Holsboer F (1993) Influence of endotoxin on nocturnal sleep in humans. *Am J Physiol* 264: R1077-R1083.
- Pollmächer T, Schuld A, Kraus T, Haack M, Hinze-Selch D (2001) Zur klinischen Relevanz der Wirkung von Clozapin auf die Freisetzung von Zytokinen und löslichen Zytokinrezeptoren. *Fortschr Neurol Psychiat* 69(2): 65-74
- Rapaport MH, Doran AR, Nelson DL, McAllister C, Magliozzi JR, Paul SM (1991) Haloperidol and soluble interleukine-2 receptors. *Biological Psychiatry* 30:1063-4
- Rayner DV, Simon E, Duncan JS, Trayhurn P (1998) Hyperleptinaemia in mice induced by administration of the tyrosine hydroxylase inhibitor α -methyl-*p*-tyrosine. *FEBS Letters* 429:395-8
- Retz W, Rösler M (1999) Behandlung älterer Patienten mit Clozapin. in: Naber D, Müller-Spahn F, Hrsg. Leponex

- Pharmakologie und Klinik eines atypischen Neuroleptikums. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1-15
- Rex A, Voigt JP, Voits M, Fink H (1998) Pharmacological evaluation of a modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 59(3):677-83
- Rolsten C, Claghorn J, Samorajski T (1979) Long-term treatment with clozapine on aging mice. *Life Sciences* 25 (10):865-72
- Rothe B, Guldner J, Hohlfeldt E, Lauer CJ, Pollmacher T, Holsboer F, Steiger A (1994) Effects of 5HT₃ receptor antagonism by tropisetron on the sleep EEG and on nocturnal hormone secretion. *Neuropsychopharmacology* 11(2):101-6
- Rupniak NM, Briggs RS, Petersen MM, Mann S, Reavill C, Jenner P, Marsden CD (1986) Differential alterations in striatal acetylcholine function in rats during 12 months' continuous administration of haloperidol, sulpiride, or clozapine. *Clinical Neuropharmacology* 9(3):282-92
- Rupniak NM, Hall MD, Mann S, Fleminger S, Kilpatrick G, Jenner P, Marsden CD (1985) Chronic treatment with clozapine, unlike haloperidol, does not induce changes in striatal D-2 receptor function in the rat. *Biochemical Pharmacology* 34(15):2755-63
- Rupprecht R, Holsboer F (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends in Neurosciences* 22(9):410-6
- Salamone JD, Cousins MS, Maio C, Champion M, Turski T, Kovach J (1996): Different behavioral effects of haloperidol, clozapine and thioridazine in a concurrent lever pressing and feeding procedure. *Psychopharmacology* 125:105-12
- Salmi P, Ahlenius S (1996) Further evidence for clozapine as a dopamine D1 receptor agonist. *European Journal of Pharmacology* 307(1):27-31
- Salmi P, Karlsson T, Ahlenius S (1994) Antagonism by SCH 23390 of clozapine-induced hypothermia in the rat. *European Journal of Pharmacology* 253(1-2):67-73
- Sanna PP, Weiss F, Samson ME, Bloom FE, Pich EM (1995) Rapid induction of tumor necrosis factor alpha in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(1): 272-5
- Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR (1997) Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *Journal of Experimental Medicine* 185(1):171-5
- Sayers AC, Stille G (1969) Neuropharmakologische Befunde unter chronischer Verabreichung von Haloperidol, Loxapin und Clozapin. in: Sayers AC, Kleinlogel H (1974) Neuropharmacological findings after chronic administration of haloperidol, loxapine and clozapine. *Arzneimittel-Forschung* 24(7):981-3
- Schiffelholz T, Aldenhoff JB (2002) Novel object presentation affects sleep-wake behavior in rats. *Neuroscience Letters* 328(1):41-4
- Schmitt U, Dahmen N, Fischer V, Weigmann H, Rao ML, Reuss S, Hiemke C (1999) Chronic oral haloperidol and clozapine in rats: A behavioral evaluation. *Neuropsychobiology* 39(2):86-91
- Schuld A, Kuhn M, Haack M, Kraus T, Hinze-Selch D, Lechner C, Pollmacher T (2000) A comparison of the effects of clozapine and olanzapine on the EEG in patients with schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 33(3):109-11
- Seeman P (1992) Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7(4):261-84
- Shen Y, Connor TJ, Nolan Y, Kelly JP, Leonard BE (1999) Differential effect of chronic antidepressant treatments

- on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. *Life Science* 65(17):1773-86
- Shirazi-Southall S, Rodriguez DE, Nomikos GG (2002) Effects of typical and atypical antipsychotics and receptor selective compounds on acetylcholine efflux in the hippocampus of the rat. *Neuropsychopharmacology* 26(5): 583-94
- Shoham S, Davenne D, Cady AB, Dinarello CA, Krueger JM (1987) Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am J Physiol* 253: R142-R149.
- Shopsin B, Klein H, Aaronsom M, Collora M (1979) Clozapine, chlorpromazine, and placebo in newly hospitalized, acutely schizophrenic patients: a controlled, double-blind comparison. *Archives of General Psychiatry* 36(6):657-64
- Silvestri RC, Bromfield EB, Khoshbin S (1998) Clozapine-induced seizures and EEG abnormalities in ambulatory psychiatric patients. *Annals of Pharmacotherapy* 32(11):1147-1151
- Smith AP, Thomas M, Brockman P, Kent J, Nicholson KG (1993) Effect of influenza B virus infection on human performance. *Br Med J* 306: 760-1
- Smith AP, Tyrrell DAJ, Al-Nakib W, Coyle KB, Donovan CB, Higgins PG, Willman JS (1987) Effects of experimentally induced respiratory virus infections and illness on psychomotor performance. *Neuropsychobiology* 18: 144-8
- Smith AP, Tyrrell DAJ, Al-Nakib W, Coyle KB, Donovan CB, Higgins PG, Willman JS (1988) The effects of experimentally induced respiratory virus infections on performance. *Psychol Med* 18: 65-71
- Smith AP, Tyrrell DAJ, Barrow GI, Higgins PG, Willman JS, Bull S, Coyle KB, Trickett S (1992) Mood and experimentally-induced respiratory virus infections and illnesses. *Psychology and Health* 6: 205-12
- Song XY, Gu M, Jin WW, Klinman DM, Wahl SM (1998) Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *Journal of Clinical Investigation* 101(12):2615-21
- Späth-Schwalbe E, Hansen K, Schmidt F, Schrezenmeier H, Marshall L, Burger K, Fehm HL, Born J (1998) Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(5):1573-9
- Spierings ELH, Dzoljic MR, Godschalk M. (1977) Effects of clozapine on the sleep patterns in the rat. *Pharmacology* 15:551-556
- Stefflerl A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Luheshi GN (1996) The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. *Brit J Pharmacol* 118(8):1919-24
- Sterman MB, Knauss T, Lehmann D, Clemente CD (1965) Circadian sleep and waking patterns in the laboratory cat. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology* 19(5):509-517
- Stevens J, Wilson K, Foote W (1974) GABA blockade, dopamine and schizophrenia: experimental studies in the cat. *Psychopharmacology* 39(2):105-19
- Stutzmann JM, Eon B, Lucas M, Blanchard JC, Laduron PM (1992) RP 62203, a 5-hydroxytryptamine2 antagonist, enhances deep NREM sleep in rats. *Sleep* 15(2):119-24
- Susic V, Kovacevic R, Momirov D, Masirevic G (1977) Effects of clozapine (Leponex) on sleep patterns in the cat. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 85:455-459
- Susic V, Kovacevic R, Momirov D (1975) Changes in sleep waking cycle produced by clozapine. Levin P, Koella WP (ED.) (1974) *Sleep. Instinct, Neurophysiology, Endocrinology, Episodes, Dreams, Epilepsy and intracranial Pathology*. Proceedings of the second european congress. Rome, Italy, April 8-11, 1974. XI+525
- Illus P, Karger S (1975): Basel, Switzerland; New York, N.Y., U.S.A. ISBN 3-8055-2069-7. 311-315
- Swiergiel AH, Dunn AJ (1999): The role of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in the feeding response to endotoxin and

- influenza virus infection in mice. *Brain, Behaviour & Immunity* 13(3):252-65
- Swiergiel AH, Smagin GN, Johnson LJ, Dunn AJ (1997): The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). *Brain Research* 776(1-2):96-104
- Taishi P, Bredow S, Guha-Thakurta N, Obál F, Krueger JM (1997) Diurnal variations of interleukin-1b mRNA and b-actin mRNA in rat brain. *J Neuroimmunol* 75:69-74
- Takahashi S, Fang J, Kapás L, Wang Y, Krueger JM (1997) Inhibition of brain interleukin-1 attenuates sleep rebound after sleep deprivation in rabbits. *Am J Physiol* 273:R677-R682
- Takahashi S, Kapás L, Fang J, Krueger JM (1999) Somnogenic relationships between tumor necrosis factor and interleukin-1. *Am J Physiol* 276:R1132-R1140
- Takahashi S, Kapás L, Fang J, Seyer JM, Wang Y, Krueger JM (1996a) An interleukin-1 receptor fragment inhibits spontaneous sleep and muramyl dipeptide-induced sleep in rabbits. *Am J Physiol* 271: R101-R108
- Takahashi S, Kapás L, Fang JD, Krueger JM (1995a) An anti-tumor necrosis factor antibody suppresses sleep in rats and rabbits. *Brain Res* 690:241-4
- Takahashi S, Kapás L, Krueger JM (1996b) A tumor necrosis factor (TNF) receptor fragment attenuates TNF- α - and muramyl dipeptide-induced sleep and fever in rabbits. *J Sleep Res* 5:106-14
- Takahashi S, Kapás L, Seyer JM, Wang Y, Krueger JM (1996c) Inhibition of tumor necrosis factor attenuates physiological sleep in rabbits. *Neuroreport* 7:642-6
- Takahashi S, Tooley DD, Kapás L, Fang JD, Seyer JM, Krueger JM (1995b) Inhibition of tumor necrosis factor in the brain suppresses rabbit sleep. *Eur J Physiol* 431:155-60
- Takao T, Tracey DE, Mitchell WM, De Souza EB (1990) Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. *Endocrinology* 127(6):3070-8
- Tamura R, Tanebe K, Kawanishi C, Torii K, Ono T (1997) Effects of lentinan on abnormal ingestive behaviors induced by tumor necrosis factor. *Physiology & Behavior* 61(3):399-410
- Tandon R, Shipley JE, Taylor S, Greden JF, Eiser A, DeQuardo J, Goodson J (1992) Electroencephalographic sleep abnormalities in schizophrenia. Relationship to positive/negative symptoms and prior neuroleptic treatment. *Archives of General Psychiatry* 49(3):185-94
- Taylor DM, McAskil R (2000) Atypical antipsychotics and weight gain - a systematic review. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 101(6):416-32
- Terao A, Matsumura H, Yoneda H, Saito M (1998) Enhancement of slow-wave sleep by tumor necrosis factor- α is mediated by cyclooxygenase-2 in rats. *Neuroreport* 9(17):3791-6
- Tchelingirian JL, Vignais L, Jacque C (1994) TNF α gene expression is induced in neurones after a hippocampal lesion. *NeuroReport* 5(5):585-8
- Tollner B, Roth J, Storr B, Martin D, Voigt K, Zeisberger E (2000) The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 440(6):925-32
- Toth LA, Krueger JM (1988) Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun* 56: 1785-91
- Touyz SW, Beumont PJV, Saayman GS, Zabow T (1977) A psychophysiological investigation of the short-term effects of clozapine upon sleep parameters of normal young adults. *Biological Psychiatry* 12(6):801-822
- Touyz SW, Saayman GS, Zabow T (1978) A psychophysiological investigation of the long-term effects of clozapine upon sleep parameters of normal young adults. *Psychopharmacology* 56(6):801-822
- Trachsel L, Schreiber W, Holsboer F, Pollmächer T (1994) Endotoxin enhances EEG alpha and beta power in

- human sleep. *Sleep* 17: 132-9
- Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS (1997) Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *Journal of Clinical Investigation* 99(5):944-52
- Uhr M, Steckler T, Yassouridis A, Holsboer F (2000) Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to Mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* 22(4):380-7
- Umbricht DS, Pollack S, Kane JM (1994) Clozapine and weight gain. *Journal of Clinical Psychiatry*. 55 Suppl B:157-60
- Uvnas-Moberg K, Alster P, Svensson TH, (1992) Amperozide and clozapine but not haloperidol or raclopride increase the secretion of oxytocin in rats. *Psychopharmacology* 109(4):473-6
- Varma M, Chai JK, Meguid MM, Laviano A, Gleason JR, Yang ZJ, Blaha V (1999) Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. *Physiology & Behavior* 68(1-2):99-107
- Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G, Reis J, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM (1982) Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neuroscience Letters* 33(1):97-101
- Wagner J (1887) Über die Einwirkung fieberhafter Erkrankungen auf Psychosen. *Jahrbücher für Psychiatrie* 7:94-131
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(5):1859-63
- Welch J, Manschreck T, Redmond D (1994) Clozapine-induced seizures and EEG changes. *Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences* 6(3):250-6
- Wellman PJ (2000) Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition* 16(10):837-42
- Wetter T.C, Lauer C.J., Gillich G., Pollmächer T. (1996) The electroencephalographic sleep pattern in schizophrenic patients treated with clozapine or classical antipsychotic drugs. *Journal of psychiatric Research* 30(6):411-419
- Wiesel FA, Sedvall G (1975) Effect of antipsychotic drugs on homovanillic acid levels in striatum and olfactory tubercle of the rat. *European Journal of Pharmacology* 30(2):364-7
- Wilkinson LOL, Dourish CT (1991) Serotonin and animal behaviour. In Peroutka SJ ed. *Serotonin receptor subtypes: Basic and clinical aspects*. New York, Wiley-Liss 147-210
- Williams DP, Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Uetrecht JP, Park BK (2000) Induction of metabolism-dependent and -independent neutrophil apoptosis by clozapine. *Molecular Pharmacology* 58(1):207-16
- Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J (2001) Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410(6825):207-12
- Yamasu K, Shimada Y, Sakaizumi M, Soma G, Mizuno D (1992) Activation of the systemic production of tumor necrosis factor after exposure to acute stress. *Eur Cytokine Netw* 3: 391-8
- Yang J, Denham W, Carter G, Tracey KJ, Norman J (1998) Macrophage pacification reduces rodent pancreatitis-induced hepatocellular injury through down-regulation of hepatic tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Hepatology* 28(5):1282-8
- Zheng D, Jones JP, Usala SJ, Dohm GL (1996) Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissues in response to insulin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 218(2):434-7

7. Danksagung

Folgenden Personen gilt mein herzlicher Dank:

Dr. Marike Lancel, langjährige Leiterin der AG Schlafpharmakologie, für die fachkundige Betreuung und unkomplizierte Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe,

Dr. Thomas Pollmächer, Leiter der AG Schlaf, für die Überlassung des Themas und viele anregende Gespräche,

Prof. Dr. Hans-Joachim Leppelsack, Prof. für Spezielle Zoologie der TU München, für die freundliche Übernahme der Betreuung,

Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer, Leiter des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, für das Ermöglichen der Arbeit und die Übernahme der Betreuung,

den Arbeitsgruppenmitgliedern der AG Lancel für das angenehme Arbeitsklima und besonders Dr. Anke Langebartels, Dipl.-Ing. Arnold Höhne, Dr. Stefan Mathias und Julia Löber für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Versuche,

Gabi Kohl für ihre bereitwillige Hilfestellung bei der Durchführung der ELISA's und für die Bestimmung der Leptinwerte,

Dr. Manfred Uhr, Leiter der AG Klinische Chemie, für die Anfertigung von Analysen und seine beständige Gesprächsbereitschaft,

Prof. Dr. Helmut Schwarzberg, Prof. für Neurophysiologie an der TU Magdeburg, für Korrekturen an einer frühen Version der Arbeit,

meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und die jederzeit gewährte Unterstützung!