

**Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das
endogene Cannabinoidsystem: Entwicklung
einer LC-MS/MS-Analytik zur Messung von
Endocannabinoiden im Serum**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Daniela Schreiber

aus Gütersloh

Bonn, 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Dekan: Prof. Dr. A. B. Cremers, Institut für Informatik der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. F. M. Leweke, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie der Universität zu Köln

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Jaehde, Pharmazeutisches Institut Klinische Pharmazie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erscheinungsjahr: 2007

Tag der Disputation: 30. Januar 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für meine Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Cannabinoide	1
1.1.1	Cannabinoid-Rezeptoren	3
1.1.2	Endogene Liganden	6
1.1.3	Synthese und Abbau endogener Cannabinoide	8
1.1.4	Signalübertragung im endogenen Cannabinoidsystem	10
1.1.5	Physiologische Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems	14
1.2	Cannabis und Cannabiskonsum	15
1.2.1	Akute Effekte exogener Cannabinoide	16
1.2.2	Effekte nach chronischem Cannabiskonsum	17
1.2.3	Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das Immunsystem	20
1.2.4	Einfluss des Cannabiskonsums auf das endogene Cannabinoidsystem	21
1.2.5	Einfluss von Nikotin auf das endogene Cannabinoidsystem	23
1.3	Analytik endogener Cannabinoide	25
1.4	Ziel der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Chemikalien	28
2.1.2	Reagenzien	29
2.1.3	Lösungen und Puffer	29
2.1.4	Enzyme und Inhibitoren	31
2.1.5	Geräte	32
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	34
2.2	Experimentelles Design	34
2.2.1	Studienpopulation	34
2.2.2	Blutabnahme	37
2.2.3	Blutprobenaufbereitung	37
2.3	Bestimmung der endogenen Cannabinoide im Serum	38
2.3.1	Synthese der [² H ₄]-markierten und nicht-markierten Standardreferenzsubstanzen	38
2.3.2	Methodenentwicklung	38
2.3.3	Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen	40

2.3.4	Probenaufbereitung	41
2.3.5	Chromatographie	42
2.3.6	Massenspektrometrische Detektion	45
2.3.7	Datenauswertung	52
2.3.8	Kalibration	52
2.3.9	Einsatz der Methode zur Vermessung der Probandenproben aus der Studie	52
2.4	Validierung analytischer Methoden	53
2.4.1	Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen	54
2.4.2	Kalibrierung.....	54
2.4.3	Präzision und Richtigkeit.....	54
2.4.4	Bestimmungs- und Nachweisgrenze.....	56
2.4.5	Selektivität.....	57
2.4.6	Wiederfindung (<i>recovery</i>) des Analyten	57
2.4.7	Stabilität	57
2.4.8	Qualitätssicherung während der Serumprobenmessung.....	58
2.4.9	Nachmessungen.....	59
2.5	Molekularbiologische Methoden	60
2.5.1	Isolierung der mRNA	60
2.5.2	Reverse Transkription	60
2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) der cDNA des CB1- bzw. CB2-Rezeptors und von β -Actin	61
2.5.4	Agarose- Gelelektrophorese der PCR-Produkte	63
2.6	Statistische Auswertung der Endocannabinoid- und mRNA-Rezeptorbestimmung	65
2.6.1	Deskriptive Statistik	65
2.6.2	Beurteilende Statistik.....	66
3	Ergebnisse.....	69
3.1	Methodenvalidierung	69
3.1.1	Bestimmungsbereich und Linearität	69
3.1.2	Präzision und Richtigkeit.....	72
3.1.3	Bestimmungs- und Nachweisgrenze.....	74
3.1.4	Selektivität.....	75
3.1.5	Wiederfindung der Analyten im Serum	77
3.1.6	Stabilität	78

3.1.7	Gesamtergebnis der Methodvalidierung	80
3.2	Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum	81
3.2.1	Messergebnisse der Konzentrationsbestimmung von AEA, PEA und OEA mittels LC-MS/MS	82
3.2.2	Statistische Datenauswertung und graphische Darstellung der Cannabinoidbestimmungen	83
3.3	Bestimmung der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression	86
3.3.1	Messergebnisse der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression	87
3.3.2	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression	88
4	Diskussion.....	90
4.1	LC-MS/MS-Methodvalidierung zur Quantifizierung endogener Cannabinoide im Serum	90
4.2	Endogene Cannabinoidkonzentrationen im Serum von Cannabiskonsumenten.....	94
4.3	Cannabinoidrezeptor-mRNA-Expression auf peripheren mononuklearen Blutzellen von Cannabiskonsumenten	97
4.4	Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das endogene Cannabinoidsystem	100
4.5	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
6	Abkürzungen	107
7	Literaturverzeichnis.....	110
8	Danksagung	121

1 Einleitung

1.1 Cannabinoide

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Menschheit. Die Nutzung ihrer Bestandteile durch den Menschen zu religiösen und medizinischen Zwecken, aber auch wegen ihrer euphorisierenden und entspannenden Wirkung, reicht Tausende von Jahren zurück. Bereits 8000 vor Christus befanden sich aus Hanf gefertigte Taue im Gebrauch, um 2700 vor Christus wurde die medizinische Verwendung von Cannabisbestandteilen in China dokumentiert, und um 2000 vor Christus wurde die Verwendung von Cannabis zu religiösen Zwecken beschrieben. Neben der Nutzung von Hanf als wichtiges Fasermaterial waren um 1000 nach Christus in der arabischen Welt auch die medizinalen und psychotropen Wirkungen von Cannabisbestandteilen bekannt (Childers und Breivogel 1998).

Der Hanf gehört zur Familie der Cannabinaceae, den Hanfgewächsen. Ursprünglich aus Zentralasien stammend, ist die Pflanze heute in fast allen warmen und gemässigten Zonen der Erde verbreitet. Die einjährige, diözische (zweihäusige) Pflanze kann eine Höhe von bis zu fünf Metern erreichen. Die männliche und weibliche Pflanze unterscheiden sich vor der Blüte praktisch nicht, die Entwicklung unterscheidet sich aber erheblich. Die männlichen Blütentriebe hängen in losen Trauben entlang eines relativ blattlosen Stängels, dagegen finden sich die kompakten Trauben einzelner weiblicher Blüten entlang des Stängels an den Blattachsen jedes Blattes (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1: Die Abbildung zeigt eine weibliche und eine männliche Hanfpflanze sowie eine Hanfblüte (von links nach rechts)

Cannabis sativa L. enthält mehr als 420 verschiedene Inhaltsstoffe. Die wichtigsten sind die Cannabinoide, von denen mittlerweile 70 chemisch identifiziert wurden (Elsohly und Slade 2005). Pflanzliche Cannabinoide sind sehr lipophile C_{21} -Terpene und können nach ihrer Struktur in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die klinisch relevanteste Gruppe stellen die Cannabinoide vom Δ^9 -THC-Typ dar, dem das wichtigste psychoaktive Cannabinoid Tetrahydrocannabinol (THC) mit seinem aktivsten Isomer, dem Δ^9 -THC, angehört. Dessen vollständige Strukturaufklärung und Synthese gelang erst 1963/64 (Gaoni und Mechoulam 1964) (Strukturformel siehe Abbildung 2). Der höchste Anteil Δ^9 -THC findet sich im Harz von *Cannabis sativa* L., aber auch in größeren Mengen in anderen Teilen der Pflanze mit abnehmender Konzentration von den Blüten und Blättern über den Stiel bis in die Wurzeln. Die Samen enthalten gar kein Δ^9 -THC (Ameri 1999). Weitere Gruppen sind die Δ^8 -Tetrahydrocannabinol-Gruppe, zu der das Δ^8 -THC mit seinen sauren Vorläufern gehört, das etwa 80% der biologischen Aktivität von Δ^9 -THC aufweist. Desweiteren gibt es den Cannabidiol-Typ, mit dem quantitativen Hauptbestandteil der Wildpflanze - Cannabidiol (CBD) - und chemisch verwandten Cannabinoiden, sowie die Gruppe des Cannabinol- und Cannabindioltyp. Diese Strukturen werden als Abbauprodukte angesehen, da sie durch Luftoxidation der Ursprungsverbindungen entstehen. Ferner gibt es weitere Gruppen, die hier aber nicht weiter ausgeführt werden sollen.

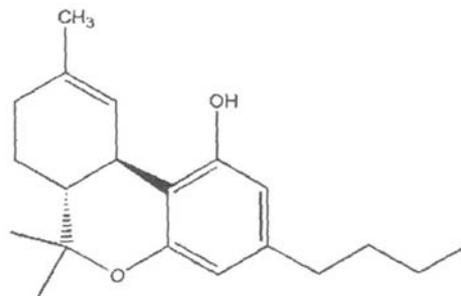


Abbildung 2: Strukturformel von Δ^9 -THC

1.1.1 Cannabinoid-Rezeptoren

Erst Ende der 1980er Jahre wurde entdeckt, dass Cannabinoide ihre Wirkung über eigene Rezeptoren entfalten. Durch Radioligand-Bindungsstudien mit Hilfe eines synthetischen Cannabinoids, CP 55,940, gelang es der Gruppe von Devane, die Existenz einer spezifischen Bindungsstelle für Cannabinoide im Gehirn der Ratte nachzuweisen, den CB1-Rezeptor (Devane et al. 1988). Die anschließende Aufklärung der Struktur (Matsuda et al. 1990) bildete die Grundlage für die Entwicklung eines neurobiologischen Verständnisses von Cannabinoidwirkungen im Gehirn. Munro konnte später einen weiteren Cannabinoid-Rezeptor identifizieren, den CB2-Rezeptor, der vorwiegend in der Peripherie zu finden ist, vor allem auf Immunzellen wie B-Lymphozyten oder Monocyten (Munro et al. 1993).

Die beiden bisher gesichert identifizierten Cannabinoid-Rezeptoren, CB1 und CB2, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren (GPCRs) (Abbildung 3). Diese Rezeptoren bestehen aus einem einzigen, stark gefalteten Peptidfaden, die sich siebenfach in Form von α -Helices durch die Phospholipid-

Matrix der Zellmembran windet. Der CB1-Rezeptor ist etwas größer als der CB2-Rezeptor, er besitzt 72 zusätzliche Aminosäurereste am N-terminalen Ende, 15 in der dritten extrazellulären Schleife und 13 zusätzliche Reste in der C-terminalen Region (Childers und Breivogel 1998). Er weist eine 44%ige Sequenzhomologie (68% in den helikalen Regionen) mit dem CB2-Rezeptor auf (Felder und Glass 1998).

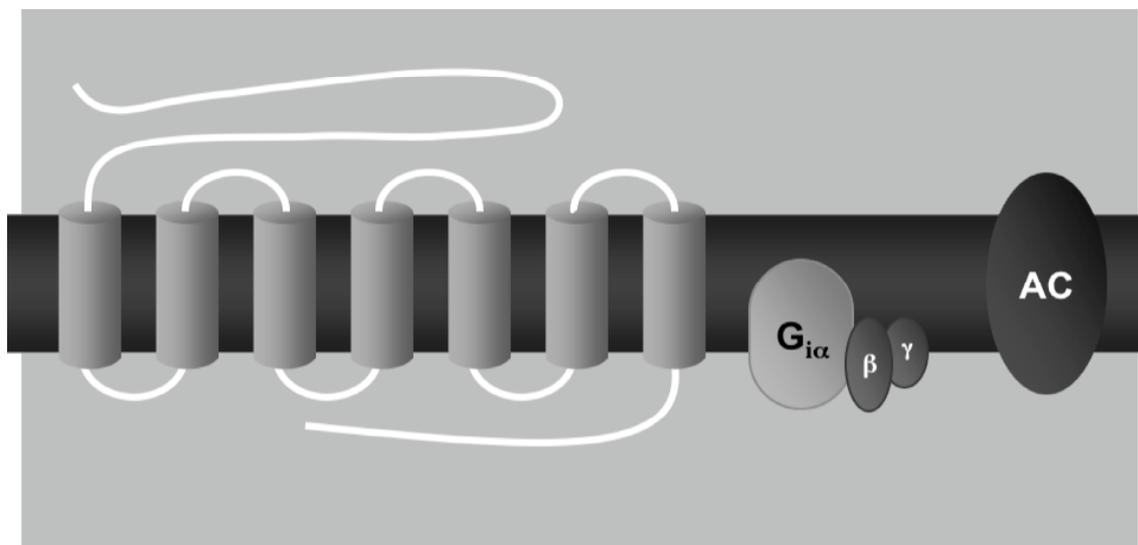


Abbildung 3: Schemazeichung eines G-Protein-gekoppelten Cannabinoid-Rezeptors, der über die Adenylatcyclase (AC) seine intrinsische Wirkung mit cAMP als Second-Messenger vermittelt.

Die relativen Dichten der Cannabinoidrezeptoren im Gehirn verschiedener Säugetierspezies wie Ratten, Affen und Menschen sind sehr ähnlich. Der CB1-Rezeptor ist primär im zentralen Nervensystem (ZNS) lokalisiert, findet sich jedoch ebenfalls in der Peripherie, dort allerdings nur in geringerer Dichte. Die höchsten CB1-Dichten finden sich im Kleinhirn und in den Basalganglien (Substantia nigra, entopedunucleärer Nucleus und Globus pallidus) sowie in der Molekularschicht des Cerebellums. Desweiteren zeigen sich sehr hohe Konzentrationen von CB1-Rezeptoren im Hippocampus und im Cortex, in geringerer Dichte aber auch in der Amygdala, dem Thalamus und im Nucleus accumbens (Herkenham et al. 1990; Thomas et al. 1992; Tsou et al. 1998).

Man ging zunächst davon aus, dass der CB2-Rezeptor ausschließlich peripher, vor allem im Immunsystem, lokalisiert ist (Childers und Breivogel 1998; Munro et al. 1993). Allerdings konnten neuere Studien CB2-Rezeptoren auch neben CB1-Rezeptoren auf Stammzellen von Oligodendrozyten, die die Myelinscheiden im ZNS formen, im Cerebellum, Cortex und Hirnstamm nachweisen (Ashton et al. 2005; Molina-Holgado et al. 2002; Nunez et al. 2004; Van Sickle et al. 2005). Am stärksten ist der Rezeptor in den Randzonen der Milz, auf den Mandeln und auf Immunzellen, vor allem auf B-Lymphozyten, Monozyten und T-Zellen exprimiert (Galiegue et al. 1995; Munro et al. 1993; Schatz et al. 1997). Die mRNA-Expression der CB2-Rezeptoren in der Milz und den Mandeln entspricht von der Menge ungefähr der CB1-mRNA-Expression im Gehirn. Die Verteilung der CB2-Rezeptoren in den Blutzellsubpopulationen zeigt starke Unterschiede, in den B-Lymphozyten befinden sich deutlich höhere Mengen als in den Monozyten und T-Zellen. Die Lokalisation der CB2-Rezeptoren in den Immunzellen ist höchstwahrscheinlich verantwortlich für die immunsuppressiven Eigenschaften von Marihuana (siehe Kapitel 1.2.3).

Es gibt des weiteren Hinweise auf Nicht-CB1- sowie Nicht-CB2-Rezeptoren, an die die Cannabinoide binden, auf die an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen werden soll, zumal heute noch nicht genau bekannt ist, ob es sich tatsächlich um neue Rezeptoren handelt. Denn es bleibt die Möglichkeit bestehen, dass einige dieser „neuen“ Cannabinoidrezeptoren vielleicht doch nur neue, bisher unbekannte allosterische Stellen auf etablierten Rezeptoren, Ionenkanälen oder auf Enzymen sind, die in die Signalvermittlung für etablierte Rezeptoren involviert sind.

Ursprünglich zählte man nur die Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. zu den Cannabinoiden. Nach Identifizierung der Rezeptoren und Herstellung synthetischer Liganden erweiterte man jedoch diese Definition. Unter exogenen Cannabinoiden versteht man sowohl die pflanzlichen Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. als auch synthetische Liganden.

1.1.2 Endogene Liganden

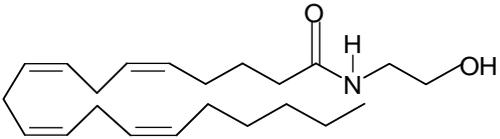
Mit der Entdeckung des CB1-Rezeptors begann die Suche nach endogenen Liganden. Anfang der 1990er Jahre wurde der erste körpereigene Ligand am CB1-Rezeptor im Gehirn des Schweines entdeckt, das Arachidonsäure-Derivat Anandamid (AEA) (Devane et al. 1992) (Strukturformel siehe Tabelle 1). Der Name stammt aus dem Sanskrit und bedeutet sinngemäß „Überbringer von innerer Ruhe und Glückseligkeit“ (Felder und Glass 1998).

Anandamid gehört zur Gruppe der Eicosamide. Es ist ein Fettsäureethanolamid, genauer ein Arachidonylethanolamid. Anandamid besitzt moderate Affinität zum CB1-Rezeptor (Pertwee 2000b).

In der Folge wurden weitere Eicosamide als endogene Liganden der Cannabinoidrezeptoren identifiziert. Das 2-Arachidonylglycerol (2-AG) ist dabei das einzige esterartige Endocannabinoid (Mechoulam et al. 1995). Obwohl 2-AG geringere CB1-Aktivität als Anandamid aufweist, gibt es Hinweise darauf, dass es im Gehirn in höheren Konzentrationen vorliegt (Childers und Breivogel 1998). 2-AG ist zum einen Ausgangsprodukt verschiedener zentraler wie auch peripherer Synthesewege, zum anderen aber auch direkt an verschiedenen Signalwegen beteiligt (Piomelli 2003). Diese unterschiedlichen Funktionen im Stoffwechsel erklären höchstwahrscheinlich die hohen Konzentrationen im Gehirn, erschweren aber auch eine eindeutige Zuordnung zu speziellen Signalwegen, wie z.B. denen des endogenen Cannabinoidsystems. Aus diesem Grund war 2-AG nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, soll jedoch der Vollständigkeit halber erwähnt sein. Analog zu den „Endorphinen“ (den endogenen Liganden der Opioid-Rezeptoren) bezeichnet man diese Liganden als „Endocannabinoide“. Andere langkettige Fettsäureethanolamide, wie Oleoylethanolamid (OEA) und Palmitolyethanolamid (PEA), zeigen nur sehr geringe bis keine CB1-Rezeptor-Aktivität, dafür jedoch CB2-Rezeptor-Aktivität neben zudem nicht-cannabimimetischen Aktivitäten an anderen Rezeptorsystemen (Schmid et al. 1996) (Strukturformeln siehe Tabelle 1). Strenggenommen werden sie von manchen Autoren wegen der geringeren Cannabinoidrezeptoraktivität daher nicht unter den Begriff „Endocannabinoide“ gefasst, chemisch gesehen gehören Sie jedoch zur gleichen Gruppe und unterliegen den gleichen Synthese- und Abbausystemen wie Anandamid (Schmid und Berdyshev 2002). Alle diese Eicosamide bilden somit eine neue Klasse von sogenannten Lipid-Neurotransmittern (Axelrod und Felder 1998),

deren physiologische Rolle bis heute in weiten Teilen immer noch ungeklärt ist. Neben dem bisher schon recht gut untersuchten CB1-Rezeptorliganden Anandamid tritt nun auch die Untersuchung der nicht oder nur wenig Cannabinoidrezeptor aktivierenden gesättigten und ungesättigten Fettsäureethanolamide immer mehr in den Vordergrund. Zum Beispiel konnten für PEA in vivo analgetische und anti-inflammatorische Effekte gezeigt werden, die vermutlich auf einer Interaktion mit der vom CB2-Antagonisten SR 144528 bevorzugten Bindungsstelle am CB2-Rezeptors beruhen (Calignano et al. 1998; Facci et al. 1995; Jaggar et al. 1998; Mazzari et al. 1996). Diese Bindungsstelle ist bisher noch weitestgehend unbekannt, unterscheidet sich aber vermutlich von der bekannten des CB2-Rezeptors. PEA ist in hohen Konzentrationen in der Haut und anderen Geweben zu finden. OEA zeigt trotz großer chemischer Ähnlichkeit zu PEA nur schwache analgetische Effekte (Calignano et al. 2001). Seit kurzem werden diese beiden Substanzen zudem als Liganden für eine nukleäre Rezeptorklasse (PPAR-alpha) diskutiert (Fu et al. 2003; Lo Verme et al. 2005).

Tabelle 1: Strukturformeln der endogenen, cannabinoidegen Liganden Anandamid (AEA), Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA)

Name	Summenformel	Molmasse [g/mol]	Strukturformel
AEA	$C_{22}O_2NH_{37}$	347,3	
OEA	$C_{20}O_2NH_{37}$	323,3	
PEA	$C_{18}O_2H_{37}$	299,3	

1.1.3 Synthese und Abbau endogener Cannabinoide

Im Unterschied zu den „klassischen“ Aminosäure-, Amid- oder Peptid-basierten Neurotransmittersystemen, die sich in der Regel der Synthese des jeweiligen Transmitters im Zytosol der Neurone bedienen und über synaptische Vesikel bei Bedarf in den präsynaptischen Spalt freigesetzt werden, werden die Fettsäureethanolamide bei Bedarf „*on demand*“ aus membranständigen Vorstufen synthetisiert und in den synaptischen Spalt ausgeschüttet (Di Marzo et al. 1994; Di Tomaso et al. 1997). Ein Modell der Synthese und des Abbaus von Anandamid, das auch für die anderen Fettsäureethanolamide PEA und OEA mit den entsprechend anderen Ausgangssubstanzen wie N-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin (NOPE) bzw. N-Palmitoyl-Phosphatidylethanolamin (NPPE) gilt (Cadas et al. 1997; Cadas et al. 1996; Schmid und Berdyshev 2002; Sugiura et al. 1996), zeigt die folgende Abbildung 4. Anandamid wird, katalysiert durch die Phospholipase D (PLD), aus der membranständigen Vorstufe N-Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin (NAPE) Calcium-abhängig zu Anandamid hydrolysiert, das dabei in den Extrazellarraum (synaptischen Spalt) gelangt. Um jederzeit für die *on-demand*-Synthese genügend Substrat zur Verfügung zu haben, wird sehr wahrscheinlich aus Phospholipiden wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin unter Einwirkung einer N-Acyl-Transferase (NAT) NAPE bereitgestellt. Nach Freisetzung in den synaptischen Spalt wird Anandamid nach gegenwärtigem wissenschaftlichem Stand durch aktiven Transport wieder in die Zelle aufgenommen. Drei wesentliche Faktoren sprechen für einen aktiven Transport: Erstens die Sättigungskinetik, die sehr der Kinetik der Transporter von Serotonin, Dopamin und Noradrenalin ähnelt. Zweitens die Substratspezifität verschiedener Neurone und Zellen für Anandamid und zum Dritten die selektive Inhibition des Anandamidtransports durch verschiedene Anandamid-Derivate wie zum Beispiel N-(4-hydroxyphenyl)-arachidonamid (AM404). Die Erkenntnis, dass die Anandamid-Aufnahme keiner zellulären Energie bedarf, erklärt die kontroverse Hypothese der passiven Diffusion von Anandamid, gesteuert durch die intrazelluläre Fettsäureamidhydrolyase (FAAH). Da die Anandamidaufnahme jedoch auch in Abwesenheit von FAAH gehemmt werden konnte, was gegen diese Hypothese spricht, bedarf es weiterer Untersuchungen der Transporter-Charakterisierung auf molekularer Ebene. In der Zelle wird Anandamid dann durch

FAAH in Ethanolamin und Arachidonsäure gespalten. Die folgende Abbildung 4 zeigt schematisch die Synthese und Inaktivierung von Anandamid.

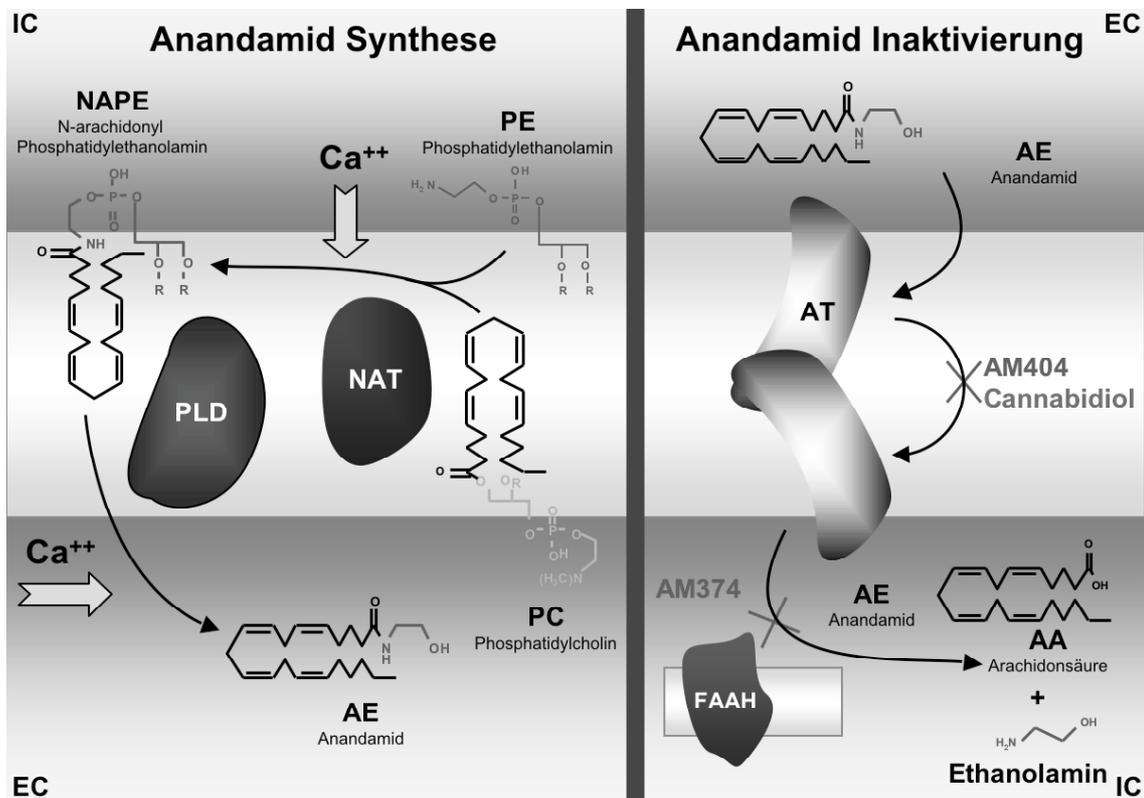


Abbildung 4: Synthese und Inaktivierung von Anandamid (AE). Die Synthese und Freisetzung von Anandamid erfolgt in den Extrazellulärraum (EC) aus einer membranständigen Vorstufe, dem N-Arachidonoyl-Phosphatidylethanolamin (NAPE), durch Aktivierung der Phospholipase D (PLD). Gleichzeitig wird über eine N-Acyltransferase (NAT) aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) NAPE bereitgestellt. Beide Prozesse sind Calcium- (Ca^{2+}) abhängig. Die Inaktivierung von AE aus dem EC erfolgt nach aktuellem Stand der Wissenschaft über einen aktiven Transporter (AT) in den Intrazellulärraum (IC). Der intrazelluläre Abbau von AE zu Ethanolamin und Arachidonsäure erfolgt über die Fettsäureamidohydrolase (FAAH) (Nach Piomelli et al. 2000).

1.1.4 Signalübertragung im endogenen Cannabinoidsystem

Auch der Signalweg der endogenen CB-Rezeptor-Liganden ist bisher nicht eindeutig identifiziert. Da man aktuell von einer präsynaptischen Lokalisation der CB1-Rezeptoren ausgeht (zusammengefasst in Freund et al. 2003), wurde eine mögliche Wirkung endogener Liganden, wie Anandamid, als retrograder *messenger* vorgeschlagen (Wilson und Nicoll 2001). Abbildung 5 zeigt das nach heutigem Stand favorisierte Modell der Signaltransduktion.

Nach diesem Modell wird Anandamid in der postsynaptischen Zelle synthetisiert und in den synaptischen Spalt entlassen, wo es dann retrograd an den präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptoren seine Wirkung entfaltet. Ein wichtiges Argument für diese retrograde Hypothese findet sich in der hauptsächlich postsynaptischen Verteilung des abbauenden Enzyms FAAH (Elphick und Egertova 2001). Es stellt sich allerdings hierbei das Problem der sehr hydrophoben chemischen Natur des Liganden. Klassische Neurotransmitter diffundieren durch den wassergefüllten Raum, der die Neurone umgibt, wohingegen hydrophobe Substanzen wie die Fettsäureethanolamide eher mit der Lipidmembran verbunden bleiben. Dennoch gibt es neben der hauptsächlich postsynaptischen Lokalisation von FAAH weitere Belege für eine retrograde Signalwirkung. Zum einen findet man Endocannabinoide in der Interstitialflüssigkeit des Gehirns und zum anderen wurde schon in verschiedenen physiologischen Experimenten gezeigt, dass endogene Cannabinoide die postsynaptische Zelle verlassen, um den präsynaptischen CB1-Rezeptor zu aktivieren (Piomelli 2003).

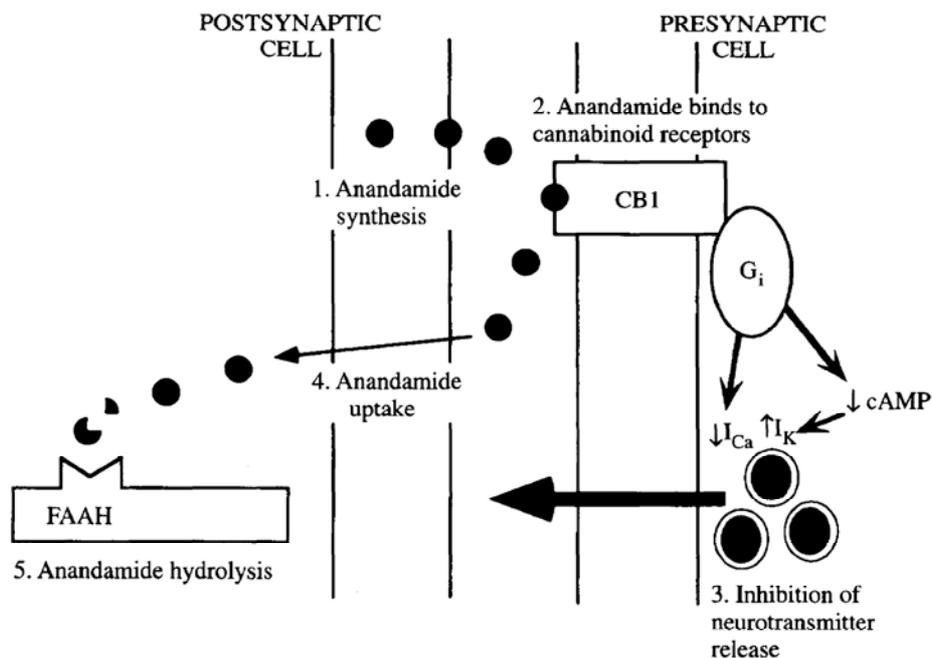


Abbildung 5: Nach heutigem Stand der Wissenschaft favorisiertes Modell für den Ablauf der Signaltransduktion im endocannabinoidergen System (Elphick and Egertova 2001).

Noch vor der Entdeckung der CB-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide reversibel, dosisabhängig und stereoselektiv die Adenylatzyklase hemmen (Howlett 1984). Desweiteren zeigte sich eine Kollokalisierung des CB1-Rezeptors mit anderen metabotropen Rezeptoren, wie z.B. Opioid-, D2-, GABA_B- und Adenosin A1-Rezeptoren, welche sich offenbar gemeinsame Signalübertragungsmechanismen (Adenylatzyklase) teilen, aber unterschiedliche G-Proteine besitzen (Ameri 1999; Childers und Breivogel 1998). Zu der in Abbildung 5 dargestellten Verminderung der Transmitterfreisetzung kommt es nun über zwei

unabhängige Mechanismen. Zum einen bewirkt die inhibitorische Kopplung an die Adenylatzyklase eine Reduktion der cAMP-Produktion, was zu einer verringerten Phosphorylierung von K^+ -Kanälen des A-Typs und einer damit verbundenen Aktivierung der Kanäle führt. Als Folge verkürzt sich die Dauer präsynaptischer Aktionspotentiale und damit auch die Transmitterfreisetzung. Neben dieser Aktivierung von K^+ -Kanälen erfolgt auch über einen direkten G-Protein-vermittelten Mechanismus die Aktivierung von einwärtsgerichteten K^+_{ir} -Kanälen (*inwardly rectifying*). Ein weiterer Effekt der Rezeptoraktivierung ist die direkte, G-Protein-vermittelte Inhibition N- und P/Q-spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Da ein Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse eine notwendige Voraussetzung für die Freisetzung von Transmittern darstellt, bewirkt auch dieser Mechanismus eine Verminderung der Transmitterausschüttung (Ameri 1999; Childers und Breivogel 1998). Ein weiterer Signalmechanismus nach Stimulation des CB1-Rezeptors ist die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK). Diese Kinase spielt normalerweise eine wichtige Rolle bei der morphologischen Differenzierung von Neuronen (Ameri 1999; Childers und Breivogel 1998) (Abbildung 6).

Der vorwiegend peripher lokalisierte CB2-Rezeptor hingegen bewirkt keine Beeinflussung von Ionenkanälen und reduziert somit auch nicht die Freisetzung von Neurotransmittern (Ameri 1999). Wie der CB1-Rezeptor ist jedoch auch der CB2-Rezeptor G-Protein-gekoppelt und bewirkt ebenfalls eine Reduktion von cAMP über die Inhibition der Adenylatzyklase (Bouaboula et al. 1996; Rinaldi-Carmona et al. 1994). Auch eine direkte G-Protein-induzierte Aktivierung der MAPK konnte gezeigt werden (zusammengefasst in Klein et al. 2003). Dieser Effekt liegt vermutlich auch der immunmodulatorischen, CB2-rezeptorvermittelten Wirkung zugrunde (Ameri 1999).

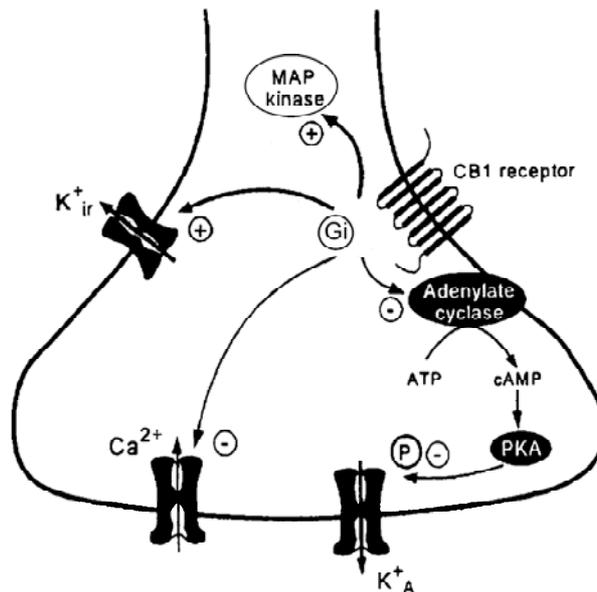


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt den Ablauf zellulärer Mechanismen nach Aktivierung des CB1-Rezeptors und dessen Effekte auf die verschiedenen Signalwege in der präsynaptischen Zelle (Ameri 1999).

Tabelle 2: Vergleich der beiden Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2

	CB1	CB2
Molekulargewicht	53 kDa	40 kDa
Lokalisation	ZNS, teilweise peripher	Fast ausschließlich peripher, v.a. auf Immunzellen, auch auf Oligodendrogliazellen im ZNS
Signaltransduktion	Adenylatzyklase ↓ MAP-Kinase ↑ K ⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	Adenylatzyklase ↓ MAP-Kinase ↑

1.1.5 Physiologische Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems haben sich in den vergangenen Jahren verschiedene Aspekte sowohl im Bereich der neuronalen Steuerung wie auch in der Modulation von Immunprozessen ergeben. Die neuromodulatorischen Aktivitäten der endogenen Cannabinoide im sensorischen und autonomen Nervensystem resultieren, überwiegend CB1-vermittelt, in der Regulation der Schmerzwahrnehmung (Iversen und Chapman 2002) sowie kardiovaskulärer (Randall et al. 2002) und gastrointestinaler (Carlo und Izzo 2003) Funktionen. Eine wichtige physiologische Funktion der Endocannabinoide könnte zudem die Regulierung von Blutdruck und Tonus der Blutgefäße sein. Mögliche Mechanismen umfassen die CB-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung aus Zellen des sympathischen Nervensystems sowie eine direkte Gefäßdilatation durch Aktivierung von CB-Rezeptoren der Endothelien. Endocannabinoide werden von vaskulären, zirkulierenden Makrophagen und Thrombozyten produziert (Wagner et al. 1998). Im Bereich der kognitiven und emotionalen Prozesse spielt das endogene Cannabinoidsystem offenbar eine Rolle bei Gedächtnis- und Lernprozessen. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der CB1-Rezeptor die Auslöschung aversiver Gedächtnisinhalte kontrolliert (Marsicano et al. 2002). Nicht beteiligt zu sein scheint er hingegen an der Kontrolle des appetitiven Gedächtnisses (Holter et al. 2005). Es wird angenommen, dass Endocannabinoide die Auslöschung der aversiven Erinnerungen durch eine selektive Hemmung lokaler, inhibitorisch wirkender neuronaler Netzwerke in der Amygdala vermitteln (Marsicano et al. 2002). Des Weiteren deuten die atypische Lokalisation endogener Bestandteile des Cannabinoidsystems während der fötalen und frühen postnatalen Entwicklungsphasen (Fernandez-Ruiz et al. 1999) sowie der Nachweis endogener Cannabinoide bereits im fötalen und frühen postnatalen Gehirn (Berrendero et al. 1999) auf eine Beteiligung des endogenen CB-Systems an der Gehirnentwicklung und Reifung weiterer Neurotransmittersysteme hin.

Überwiegend CB2 gesteuerte Prozesse sind beteiligt an der zellulären und insbesondere der humoralen Immunantwort mit möglicher Beteiligung an (Neuro-) Inflammation und chronischem Schmerz (zusammengefasst in Klein 2005).

Aufgrund der bekannten Effekte exogener Cannabinoide, verursacht durch den Gebrauch von Cannabis, dürfte das cannabinoide System auch an der

Freisetzung von stress- oder appetitregulierenden Hormonen und Peptiden beteiligt sein. Auch wenn der Mechanismus bis heute noch unklar ist, weiß man, dass Cannabinoide die Nahrungsaufnahme stimulieren, vermutlich über die Aktivierung von CB1-Rezeptoren (Berry und Mechoulam 2002).

Diese Vielzahl der genannten Prozesse soll die Vielfältigkeit und Relevanz des endocannabinoidergen Systems unterstreichen. Man geht heute davon aus, dass es sich beim Cannabinoidsystem wahrscheinlich um ein wesentliches neuromodulatorisches System handelt, dessen genauere Untersuchung und Aufklärung durch die Weiterentwicklung modernster analytischer Verfahren bestimmt wird.

1.2 Cannabis und Cannabiskonsum

Die beiden Cannabisprodukte Marihuana und Haschisch sind heute die am häufigsten konsumierten illegalen Rauschdrogen weltweit (Watson et al. 2000). Studien gehen davon aus, dass bereits jeder fünfte Europäer und annähernd jeder US- Amerikaner und Australier bereits einmal in seinem Leben zumindest eines dieser Hanfprodukte konsumiert hat (Hall und Solowij 1998a). Unter Marihuana versteht man die getrockneten Blüten und Blätter der Hanfpflanze, Haschisch besteht aus dem getrockneten Harz der Pflanze. Auch wenn der klinisch-relevanteste Inhaltsstoff Δ^9 -THC für die meisten bekannten psychotropen Effekte von Cannabis hauptverantwortlich ist, können die klinischen Effekte, die durch reines Δ^9 -THC und pflanzliche Cannabispräparationen (Marihuana oder Haschisch) hervorgerufen werden, nicht gleichgesetzt werden. Denn auch pflanzliche Cannabinoide, die keine CB-Rezeptoraktivität zeigen, führen bei gleichzeitiger Verabreichung mit CB-rezeptoraktiven Cannabinoiden zur Modulation der Effekte gegenüber den Reinsubstanzen. Dies wird als sogenannter „Entourage-Effekt“ bezeichnet und muss bei der Interpretation von Studien mit verschiedenen Cannabinoiden neben den unterschiedlichen Applikationsformen stets berücksichtigt werden (Mechoulam und Ben-Shabat 1999).

1.2.1 Akute Effekte exogener Cannabinoide

Zu den akuten Effekten von Cannabis mit seinem psychoaktiven Inhaltsstoff Δ^9 -THC zählen neben Euphorie und Entspannung auch Wahrnehmungsveränderungen, Störungen des Zeitgefühls und die Intensivierung normaler sensorischer Erfahrungen, wie zum Beispiel Essen oder Musik hören. Außerdem steigt die Herzrate schon nach wenigen Minuten um bis zu 50 Prozent an und es kann zu Panikattacken und Angstzuständen kommen (Hall und Solowij 1998b). Die akute Toxizität von Δ^9 -THC ist jedoch gering. Todesfälle sind nicht beschrieben. Weitere Effekte sind die Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit, der Reaktionszeit und der motorischen Fähigkeiten sowie Störungen des Kurzzeitgedächtnisses. Eher periphere Effekte sind Hypotonie, Hypothermie, Hyposalivation, Reduktion des intrakularen Drucks, Immunsuppression und intestinale Hypomotilität (zusammengefasst in Howlett et al. 2004).

Zu den wohl bekanntesten und am besten dokumentierten Wirkungen zählen die psychoaktiven, sedierenden, appetitstimulierenden, antinozizeptiven und motorischen Effekte, vermittelt über den CB1-Rezeptor, wie auch in dem folgenden Exkurs deutlich wird.

Exkurs : Therapeutische Verwendung von Cannabinoiden

Die therapeutische Nutzung von Cannabis sativa L. hat eine sehr lange Geschichte. Es gibt Überlieferungen der medizinischen Verwendung schon aus der frühen vorchristlichen Zeit in China, Indien, Ägypten und Assyrien. Man schätzte schon sehr früh die analgetischen, sedierenden, antiemetischen, muskelrelaxierenden, antikonvulsiven und appetitstimulierenden Wirkungen (Childers und Breivogel 1998; Porter und Felder 2001; Watson et al. 2000). In den USA ist Δ^9 -THC seit 1986 als Dronabinol als Fertigarzneimittel zugelassen. Es wird unter dem Handelsnamen Marinol[®] geführt, wobei es sich um kapsuliertes Drobaninol in Sesamöl gelöst handelt. Dronabinol ist das Stereoisomer (-)-trans- Δ^9 -THC. Zunächst war Dronabinol zur Behandlung der Nebenwirkungen von Chemotherapien zugelassen, seit 1991 ist es auch für die Behandlung von AIDS-Patienten zugelassen (Pertwee 2000). Seit dem 1. Februar 1998 darf Dronabinol auch in Deutschland verordnet werden, es wird dann als Rezepturazneimittel angefertigt, ebenfalls in Kapselform. In Großbritannien, Irland und Kanada sowie in einigen anderen europäischen Ländern ist Nabilon, ein synthetischer Abkömmling von Δ^9 -THC, unter dem Handelsnamen Cesamet[®] zugelassen. 1 mg Nabilon entspricht in der pharmakologischen Wirkstärke etwa 10 mg Dronabinol.

In Untersuchungen der Appetit- und Gewichtsbeeinflussung bei Patienten mit AIDS und Anorexia durch Dronabinol konnte eine appetitsteigernde, übelkeitverringende, stimmungsaufhellende sowie gewichtsstabilisierende Wirkung gezeigt werden (Beal et al. 1995). Der erste Nachweis einer antiemetischen Wirkung von THC konnte bereits 1975 bei der Behandlung von Krebspatienten nach einer Chemotherapie erbracht werden (Sallan et al. 1975).

Gerade die sehr hohe Dichte an CB1-Rezeptoren in den Basalganglien (Herkenham et al. 1991; Julian et al. 2003; Tsou et al. 1998) lässt zudem eine Beteiligung des Endocannabinoidsystems an der Kontrolle und Ausführung von Bewegungen vermuten. Und in der Tat konnten schon im Tierexperiment sowie in neuesten Studien am Menschen mögliche Anwendungen bei der Parkinsonschen Erkrankung und auch bei Multipler Sklerose (MS) gezeigt werden (zusammengefasst in Corey 2005; Rodriguez de Fonseca et al. 1998; Watson et al. 2000). MS ist eine entzündliche Erkrankung der Myelinscheiden im Gehirn, die in der Folge mit erheblichen Bewegungseinschränkungen, Spasmen und Tremor einhergeht. In neuesten klinischen Studien zeigten sich deutliche Verbesserungen der motorischen Beeinträchtigung (Fox et al. 2004; Zajicek et al. 2005). Des Weiteren konnte in einer Placebo-kontrollierten Langzeitstudie mit sechswöchigem Behandlungszeitraum auch ein positiver Effekt von Δ^9 -THC beim Tourette-Syndrom gezeigt werden (Muller-Vahl et al. 2003). Das Tourette-Syndrom ist eine neuropsychiatrische Erkrankung, deren Ursache noch immer ungeklärt ist, und die mit motorischen wie auch vokalen Tics einhergeht. Neueste Ergebnisse liegen für eine möglichen Behandlung von Atherosklerose, einer chronischen, entzündlichen Erkrankung, vor. Im Mausmodell konnte durch orale Gabe niedriger, nicht psychoaktiv wirkender Δ^9 -THC-Mengen signifikant das artherosklerotische Fortschreiten aufgehalten werden (Steffens et al. 2005).

1.2.2 Effekte nach chronischem Cannabiskonsum

Neben den akuten Effekten kann es auch zu längerfristigen, andauernden Effekten nach chronischem Langzeitkonsum kommen. Die häufigste Art des Cannabiskonsums ist bis heute der „Joint“, also das Rauchen der Pflanzenbestandteile vermischt mit Tabak. Ein wichtiger Punkt ist sicher, dass sich hier die negativen Wirkungen des Nikotins und der Teerstoffe mit denen der Cannabinoide vermischen, einige Wirkungen lassen sich aber dennoch separat darstellen. Chronisches Rauchen von Cannabis führt zu einer Beeinträchtigung des respiratorischen Systems. Es zeigte sich eine verminderte Lungenfunktion sowie ein erhöhtes Krebsrisiko im Respirationstrakt in

verstärktem Ausmaß gegenüber normalen Tabakrauchern (Hall und Solowij 1998a). Weitere erhebliche Auswirkungen hat der Konsum von Cannabis im pubertären und Jugendalter. In zwei Humanstudien konnte eine langanhaltende kognitive Beeinträchtigung bei Erwachsenen gezeigt werden, die im Alter von 16 bis 17 Jahren mit dem Cannabiskonsum begonnen hatten (Ehrenreich et al. 1999; Pope et al. 2003). Hingegen zeigten Personen, die erst nach der Pubertät Cannabis konsumierten, keine langfristige Beeinträchtigung. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass auch der chronische Langzeitcannabiskonsum bei Erwachsenen Beeinträchtigungen höherer kognitiver Funktionen verursacht. Mehrere Untersuchungen mit Langzeitkonsumenten zeigten Beeinträchtigungen der Lernfähigkeit und der Organisation und Integration komplexer Informationen in Aufgabenbereichen, die unterschiedliche Mechanismen der Aufmerksamkeit, des Erinnerns und der exekutiven Funktionen umfassen (Block 1996; Lundqvist 2005; Pope et al. 1995). Weitere Studien zeigten, dass die Fähigkeit zur Fokussierung der Aufmerksamkeit und zur Herausfilterung irrelevanter Informationen aus komplexen Sachverhalten mit der Anzahl der Konsumjahre zunehmend gestört war. Dieses Defizit konnte auch bei einer Gruppe von Ex-Cannabiskonsumenten mit einer mittleren Abstinenzdauer von zwei Jahren nachgewiesen werden (Solowij 1998).

Neben den beschriebenen kognitiven Effekten gibt es auch psychische Wirkungen des Cannabiskonsums. So zeigt sich ein Zusammenhang von Cannabiskonsum und einem erhöhten Risiko, an einer Psychose aus dem schizophrenen Formenkreis zu erkranken, der durch eine Interaktion von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen zu erklären ist. Je früher im Leben der Cannabiskonsum beginnt, desto höher ist das Risiko, an einer Psychose zu erkranken (Arseneault et al. 2004; Caspi et al. 2005).

Ein weiterer Aspekt des chronischen Cannabiskonsums ist die Möglichkeit der Entwicklung einer Abhängigkeit, deren Existenz immer sehr umstritten war (Ameri 1999). Dennoch scheinen Experimente mit Blockade des CB1-Rezeptors durch den Antagonisten SR141716 die Existenz einer Toleranzentwicklung und Abhängigkeit beim Menschen sowie beim Tier zu bestätigen (Cook et al. 1998; Kouri et al. 1999; Maldonado und Rodriguez de Fonseca 2002). Die Entzugssymptome sind allerdings schwächer als zum Beispiel beim Opioidentzug (Kalant 2004) und treten auch nicht bei allen Cannabiskonsumenten auf (Perkonigg et al. 1999). Der Grund dafür liegt

höchstwahrscheinlich in der starken Lipophilie der Cannabinoide. Sie gehen nach Resorption sehr schnell ins Fettgewebe über und werden daher nur sehr langsam aus dem Körper ausgeschieden. Die Gabe von Rimonabant (SR1141716) nach THC-Verabreichung an CB1-Knock-out Mäuse führte nicht zu Entzugssymptomen, was darauf hindeutet, dass körperliche Entzugssymptome über den CB1-Rezeptor vermittelt werden (Ledent et al. 1999). Dennoch muss bei Studien mit Rimonabant immer die stärkere Potenz und abweichende Pharmakokinetik gegenüber den pflanzlichen Cannabinoiden bedacht werden, sowie seine inversen agonistischen Eigenschaften, die die Interpretation solcher Daten erschweren (Pertwee 1997; Rubino et al. 2000; Rubino et al. 2000c). Beschriebene Entzugssymptome chronischer Cannabiskonsumenten sind vornehmlich Reizbarkeit, Ängstlichkeit, Depression, Aufmerksamkeitsdefizite und Schlafstörungen sowie Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Bauch- und Muskelschmerzen, Übelkeit und körperliches Unwohlsein (Budney et al. 2004; Haney et al. 2004; Kalant 2004; Solowij et al. 2002). Des Weiteren wurden motorische Störungen beobachtet wie zum Beispiel Ataxie, Tremor oder verminderte Beweglichkeit (Maldonado und Rodriguez de Fonseca 2002; Pillay et al. 2004).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Cannabisentzug, ähnlich dem Entzug von anderen Drogen wie Alkohol, Opiaten und Kokain, das Stresssystem des Gehirns aktiviert und sich durch eine erhöhte Ausschüttung von CRH (Corticotropin-*releasing*-Hormon) äußert (Rodriguez de Fonseca et al. 1997).

Neben den zentralen Effekten, die über den CB1-Rezeptor vermittelt werden, gibt es auch periphere Effekte. Vor allem aus tierexperimentellen Studien kommen Hinweise auf die immunsuppressive Wirkung von Cannabinoiden (siehe Kapitel 1.2.3). Eine Störung der Reproduktionsorgane wurde bisher nur im Tierversuch, nicht aber am Menschen gezeigt. Sie äußert sich in einer verminderten Testosteron- sowie Spermaproduktion, des Weiteren ist die Beweglichkeit der Spermien vermindert und der Ovulationszyklus weiblicher Tiere gestört (zusammengefasst in Hall und Solowij 1998).

1.2.3 Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das Immunsystem

Schon vor der Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren und der endogenen Liganden wurden die Effekte von Marihuana bzw. Δ^9 -THC auf die Immunzellfunktionen untersucht. In-vivo und In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Δ^9 -THC immunsuppressiv wirkt sowie die zellvermittelte Immunität, die humorale Immunität und die zelluläre Abwehr gegen eine Vielzahl infektiöser Agenzien beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass das Rauchen von Marihuana die antimikrobielle Aktivität, die Zytokinproduktion sowie die Zytokinempfindlichkeit pulmonaler, alveolärer Makrophagen unterdrückt. Die chronischer Verabreichung im Tiermodell führte zum Absinken der Resistenz gegenüber Infektionen. (Baldwin et al. 1997; Hall und Solowij 1998; Shay et al. 2003). Während bei Primaten eine Suppression der Lymphozyten und alveolären Makrophagen beobachtet wurde, zeigte die Behandlung von Mäusen und Ratten wie auch die Behandlung von humanen Immunzellkulturen mit Δ^9 -THC suppressive Effekte auf T- sowie B-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen (zusammengefasst in Klein et al. 2003). Durch die Identifizierung der CB-Rezeptoren konnte eine 10 bis 100fach höhere Konzentration von CB2-Rezeptoren gegenüber CB1-Rezeptoren auf Immunzellen aufgedeckt werden. Die Gruppe von Kaminski untersuchte die durch THC beeinflussten Signalwege und fand heraus, dass die THC-vermittelte Unterdrückung der humoralen Immunabwehr zum Teil auf einer Hemmung der Adenylatzyklase durch einen pertussinsensitiven G-Proteingekoppelten Mechanismus beruht (Kaminski et al. 1994). Dies lässt sich mit der postulierten Involvierung der Cannabinoidrezeptoren in die cannabinoidvermittelte Hemmung der humoralen Immunität vereinbaren. In der Milz und auf den Mandeln wurden sehr hohe CB2-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen, die in der Menge ungefähr der CB1-mRNA-Konzentration im Gehirn entsprechen (Galiegue et al. 1995; Munro et al. 1993). Allerdings ist das mRNA-Niveau für den CB2-Rezeptor in anderen Geweben des Immunsystems relativ niedrig, wenn es auch das des CB1-Rezeptors übertrifft (Bouaboula et al. 1993; Munro et al. 1993). Das Verteilungsmuster der CB2-mRNA zeigt in den menschlichen Blutzellpopulationen eine große Variation mit einer Rangordnung von B-Lymphozyten > natürliche Killerzellen (NK) > Monozyten > polymorphkernige Neutrophile > T8-Lymphozyten > T4-Lymphozyten (Munro et al. 1993). Chronische Behandlung von Ratten mit dem CB2-Agonisten CP 55940 führte zu einer verminderten Fähigkeit, Cannabinoide zu

binden, und weist auf einen immunmodulatorischen Effekt nach chronischer Cannabisexposition hin (Massi et al. 1997). Da sowohl CB1- wie auch CB2-Rezeptoren in Immunzellen und -geweben zu finden sind, können funktionelle Verknüpfungen mit der Regulierung von Immunreaktionen allerdings nicht allein einem Rezeptortyp zugeschrieben werden. Es könnten komplexe Wechselwirkungen von Signalübertragungsaktivitäten auftreten.

Die Frage, ob eine direkte Verbindung zwischen Marihuanakonsum und verminderter Resistenz gegen Infektionen beim Menschen besteht, ist noch ungeklärt, denn Studien der Effekte des Marihuana-Rauchens auf das Immunsystem haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

1.2.4 Einfluss des Cannabiskonsums auf das endogene Cannabinoidsystem

1.2.4.1 Einfluss auf die Cannabinoidrezeptoren

Der Einfluss von chronischem Cannabiskonsum auf die endogenen Cannabinoidrezeptoren wurde mehrfach untersucht. Verschiedene Gruppen konnten tierexperimentell eine Abnahme der CB-Rezeptor-Bindung in verschiedenen, vor allem in extrapyramidalen Gehirnbereichen nach chronischer Δ^9 -THC-Verabreichung zeigen (Oviedo et al. 1993; Rodriguez de Fonseca et al. 1994; Romero et al. 1995; Romero et al. 1997). Des Weiteren zeigte sich eine *down*-Regulation und Desensitivierung von CB-Rezeptoren im Gehirn, die höchstwahrscheinlich auch verantwortlich ist für die Toleranzentwicklung gegenüber den Cannabinoiden (Breivogel et al. 1999; Oviedo et al. 1993). Die *down*-Regulation der Cannabinoidrezeptoren fällt jedoch nicht für alle Hirnregionen gleich aus. Die Gruppe von Sim zeigte zudem eine Desensitivierung von cannabinoidaktivierten Signaltransduktionsmechanismen regionspezifisch in den Basalganglien sowie im Hippokampus (Sim et al. 1996). Chronische Δ^9 -THC-Exposition führte zu einer erheblichen Reduktion der CB-Rezeptordichte im Cerebellum (52 %), im Hippokampus (40 %), im Globus pallidus (47 %) sowie im Cortex und Striatum (je 30 %). In den *down*-regulierten Bereichen führte die chronische Δ^9 -THC-Gabe im Cerebellum, Striatum und Cortex zu erhöhten

cAMP-Spiegeln sowie erhöhter Proteinkinase-Aktivität, was als biochemische Basis für die Toleranzentwicklung diskutiert wird (Rubino et al. 2000b). Neben diesen tierexperimentellen Daten konnte interessanterweise im Humanexperiment ein Anstieg der CB1-Rezeptordichte im Caudatus Putamen nach chronischem Cannabiskonsum gefunden werden (Dean et al. 2001).

Aber nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Peripherie hat chronischer Cannabiskonsum Einfluss auf das CB-Rezeptorsystem. Einige Studien haben auch hier die Auswirkungen von exogenen Cannabinoiden untersucht. Die Gruppe von Mass zeigte eine *down*-Regulation der CB-Rezeptoren auf Milzzellen der Ratte nach chronischer Cannabinoidexposition, ein Hinweis auf die immunmodulierenden Eigenschaften der Cannabinoide (Massi et al. 1997). Es gibt jedoch nur eine einzige Untersuchung zur Modulation der CB-Rezeptoren in Immunzellen von Marihuana-Rauchern. Die Gruppe von Nong zeigte, dass Marihuana-Raucher deutlich erhöhte CB-mRNA-Rezeptorexpressionskonzentrationen aufweisen, sowohl von CB1-mRNA wie auch CB2-mRNA, wobei das Verhältnis von CB1/CB2 1:3 entspricht. In Anbetracht der erwarteten Rezeptor-Desensitivierung und der Abnahme von CB1 und CB2 bei chronischem Cannabiskonsum könnte die erhöhte mRNA-Expression der vermehrten Regenerierung bzw. Auffüllung dienen (Nong et al. 2002). Dennoch muss bei der Interpretation dieser Studie bedacht werden, dass sowohl akuter Cannabiskonsum wie auch Nikotinkonsum der Teilnehmer nicht ausgeschlossen oder kontrolliert wurde. Somit könnten die Ergebnisse durch akute Δ^9 -THC- bzw. Nikotineffekte verfälscht sein und dürfen daher nicht ausschließlich als chronische Langzeiteffekte von Δ^9 -THC auf das endogene Cannabinoidsystem interpretiert werden (siehe auch Kapitel 1.2.5).

1.2.4.2 Einfluss auf die endogenen Cannabinoide

Obwohl die Veränderungen der CB-Rezeptoren nach akutem wie auch chronischem Cannabiskonsum recht gut untersucht sind, gibt es insgesamt nur eine Untersuchung über mögliche adaptive Veränderungen der endogenen Cannabinoid-Liganden. Di Marzo und seine Gruppe zeigten, dass eine subchronische Behandlung mit Δ^9 -THC bei Ratten einen Abfall der Anandamid-Konzentrationen im Striatum, dagegen aber einen Anstieg der Anandamid-Konzentrationen im limbischen Vorderhirn zur Folge

hat (Di Marzo et al. 2000). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die langfristige Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren durch Δ^9 -THC auch Veränderungen der endogenen Cannabinoidkonzentrationen zur Folge hat.

1.2.5 Einfluss von Nikotin auf das endogene Cannabinoidsystem

Die Verabreichung von THC und Nikotin bei Ratten erzeugt mehrere ähnliche pharmakologische Effekte wie Hypothermie, Antinozizeption, verminderte Fortbewegung, belohnende Eigenschaften und Abhängigkeit (Valjent et al. 2002). Nikotineffekte werden vermittelt über den nicotinergeren Acetylcholinrezeptor (Luetje et al. 1990; Martin und Aceto 1981), die genannten Δ^9 -THC-Effekte über den zentralen CB1-Rezeptor. Beide Rezeptorsysteme sind wichtige modulatorische Signalwege und Interaktionen werden immer wieder diskutiert. Co-Administration von Nikotin und THC zeigte zum einen eine Abschwächung der THC-Toleranz, verstärkte jedoch zum anderen die physische Abhängigkeit (Valjent et al. 2002). Co-Administration von Nikotin und Δ^9 -THC potenzierte die Erhöhung von c-Fos immunreaktiven Zellen in verschiedenen Hirnregionen, vor allem in Bereichen mit hoher dopaminerger Aktivität. C-Fos-Expression ist ein Marker für neuronale Aktivität, und die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Interaktionen von Nikotin und Δ^9 -THC möglicherweise durch die Stimulation des mesolimbischen und mesocorticalen dopaminergen Systems zustande kommen (Valjent et al. 2002).

Neueste Studien zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem endogenen Cannabinoidsystem und Nikotinabusus. Chronische Gabe von Nikotin hat einen Anstieg von AEA im limbischen Vorderhirn sowie einen Anstieg von AEA und 2-AG im Hirnstamm zur Folge. Im Hippokampus, Striatum und zerebralen Cortex hingegen finden sich erniedrigte Konzentrationen von AEA und 2-AG. Die mRNA-Level bzw. Bindungskapazitäten von CB1-Rezeptoren werden durch chronische Nikotininexposition nicht beeinflusst (Gonzalez et al. 2002). Weitere Studien mit CB1-Rezeptor-Knock-out-Mäusen konnten Interaktionen zwischen Nikotin und dem endogenen Cannabinoidsystem aufdecken. Die Gabe von Nikotin an Wildtyp-Mäusen zeigte einen signifikanten Belohnungseffekt, der in den CB1-Rezeptor-Knock-out-Mäusen ausblieb. Der CB1-Rezeptorantagonist Rimonabant vermindert die Selbstverabreichung von Nikotin und das Nikotin-Verlangen im experimentellen

Tierversuch. Rimonabant scheint das Nikotinverlangen durch Hemmung der Hyperaktivität der endocannabinoid- sowie mesolimbisch-dopaminerg-gesteuerten Signalwege zu reduzieren und wird als potentielle Alternative zu derzeitigen Substitutionsbehandlungen bei der Nikotinabhängigkeit gesehen (Cohen et al. 2005).

Auch für Nikotin konnten rezeptorvermittelte, immunsuppressive Effekte gezeigt werden (Matsunaga et al. 2001) Inwieweit diese jedoch mit dem endogenen Cannabinoidsystem zusammenhängen, ist bisher unbekannt.

1.3 Analytik endogener Cannabinoide

Bei den endogenen Cannabinoiden handelt es sich um Fettsäurederivate. Genauer gesagt gehören die in dieser Arbeit näher untersuchten Substanzen AEA, PEA und OEA zu den Fettsäureethanolamiden, Derivate einer Fettsäure und Ethanolamin. Es handelt sich bei diesen Stoffen um extrem lipophile Strukturen. Zur Analytik dieser Substanzen aus biologischen Proben haben sich daher Lipidextraktionen mit internen, markierten Standards bewährt, deren Vorteil neben der Aufkonzentrierung die Aufreinigung durch Elimination von hydrophilen Störsubstanzen der Matrix ist. Nachteilig ist jedoch der Analytenverlust bei der Probenaufarbeitung, der bei den sehr niedrigen Konzentrationen der endogenen Fettsäureethanolamide eine große Rolle spielt. Um Verunreinigungen durch Weichmacher aus Einweg-Plastik-Materialien zu vermeiden, ist es wichtig, zur Probenhandhabung nur Glasmaterialien zu verwenden (Giuffrida und Piomelli 1998b). Die in dieser Arbeit angewandte Methode der Lipidextraktion ist angelehnt an die von Giuffrida und Piomelli (1998b) entwickelte Extraktion der Substanzen aus Plasma.

Für die Analytik der endogenen Cannabinoide wurden in den letzten Jahren verschiedene analytische Methoden entwickelt. Dazu zählen sowohl gaschromatographische, wie auch flüssigchromatographische Verfahren, wobei sich die meisten Verfahren aber auf die Bestimmung der beiden endogenen CB1-Agonisten AEA und 2-AG beschränken. Das größte bis heute bestehende Problem sind die extrem niedrigen Konzentrationen dieser endogenen Liganden in biologischen Flüssigkeiten. Die meisten bisher entwickelten Methoden sind daher nur zur Analyse von Geweben geeignet, in denen die Konzentrationen höher sind als im Serum oder auch im Liquor cerebrospinalis (CSF), nicht aber für die gerade erwähnten biologischen Flüssigkeiten. Bei Letzteren bewegen sich die Konzentrationen im einstelligen Pikomol-Bereich (pmol/ml) und noch darunter (zusammengefaßt in Yang et al. 1999). Die GC/MS-Methode von Giuffrida et al. erreicht zum Beispiel nur Detektionslimits von 2 pmol/ml für AEA, 1,25 pmol/ml für OEA und 0,6 pmol/ml für PEA (Giuffrida und Piomelli 1998a). Auch neuere gaschromatographische Methoden konnten keine tieferen Nachweisgrenzen erzielen (Maccarrone et al. 2001; Obata et al. 2003). Hauptproblem bei der Anwendung der Gaschromatographie ist die Hitzelabilität der Fettsäureethanolamide und die daher hohen Verluste durch die notwendige

Derivatisierung (Giuffrida und Piomelli 1998b). Mit flüssigchromatographisch-massenspektrometrischen Methoden konnte man niedrigere Quantifizierungsgrenzen erreichen (Giuffrida et al. 2000; Koga et al. 1997). Für Serumbestimmungen lagen diese Grenzen jedoch immer noch zu nah oder sogar über den zu erwartenden Konzentrationen. Die Gruppe von Kingsley entwickelte eine LC-MS/MS-Methode mit einer entscheidenden Verbesserung: Anstelle der bisher in den meisten Arbeiten verwendeten protonierten Molekülonen für die massenspektrometrische Detektion griffen sie auf eine seit langem für Lipide bekannte Eigenschaft zurück und konnten damit die Detektions- und Quantifizierungsgrenzen erheblich verbessern. Sie nutzten die Tatsache, dass Lipide Silberionen an ihre Doppelbindungen koordinieren können (Morris 1966; Winstein 1938) und bestimmten mittels Tandem-Massenspektrometrie die Silber-Addukte von AEA und 2-AG in verschiedenen Geweben. Dadurch erreichten sie Nachweisgrenzen im Femtomolbereich (fmol/ml) (Kingsley und Marnett 2003).

1.4 Ziel der Arbeit

Das wissenschaftliche Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das endogene Cannabinoidsystem. Dabei stand die Entwicklung und Validierung einer selektiven und sensitiven LC-MS/MS-Methode für die Bestimmung der endogenen Cannabinoide AEA, OEA und PEA in humanem Serum im Mittelpunkt. Aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen dieser zu bestimmenden endogenen Substanzen in Körperflüssigkeiten gegenüber Geweben wurde bei der Methodenentwicklung besonderes Augenmerk auf die Sensitivität gelegt. Die Quantifizierungsgrenzen bisher existierender Methoden reichen nicht aus, um valide Messergebnisse in humanem Serum zu produzieren. Die potentielle Eignung der entwickelten Methode wurde durch die Validierung sichergestellt. In Anschluss daran wurden mit Hilfe der neu entwickelten Meßmethode Serumproben eines Probandenkollektiv vermessen.

Ziel dieser anschließenden Untersuchung war es festzustellen, ob Cannabiskonsum einen Einfluss auf die endogenen Cannabinoidkonzentrationen von AEA, PEA und OEA hat. Bisher liegt nur eine einzige Untersuchung vor, die den Einfluss von Cannabiskonsum auf das endogene Ligandensystem untersucht (Di Marzo et al. 2000) (siehe Kapitel 1.2.4.2).

Um nicht nur den möglichen Einfluss von Cannabiskonsum auf die endogenen Liganden, sondern auch auf das Rezeptorsystem zu untersuchen, wurde bei dem Kollektiv außerdem die mRNA-Expression der beiden CB-Rezeptoren CB1 und CB2 untersucht. Die Gruppe von Nong konnte einen Anstieg der mRNA-Expression beider Rezeptoren zeigen, missachtete aber bei der Untersuchung sowohl den Einfluss akuten Cannabiskonsums sowie den Einfluss zusätzlichen Nikotinkonsums (Nong et al. 2002). Beide potentiellen Störvariablen wurden in unserer Untersuchung einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Geräte mit den jeweiligen Bezugsquellen aufgeführt. Allgemeine Chemikalien wie z. B. Bestandteile der Puffer und Lösungen waren von entsprechender analytischer Qualität und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich (München) bezogen.

2.1.1 Chemikalien

Acylchloride, >99%	Nu-Check Prep, Elysian, MN, USA
Agarose, Katalog-Nr. 161-3102	Bio-Rad Laboratories, München
D ₄ -Ethanolamid, >98%	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
Diethylpyrocarbonat (DECP)	Sigma-Aldrich, München
DNA Molekular Weight Marker XIV (100 base pair ladder), Nr. 1721933	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM)	Sigma-Aldrich, München
Ethanolamid, >98%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid (EtBr)	Bio-Rad Laboratories, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10%, Katalog-Nr. 161-0416	Bio-Rad Laboratories, München
Silberacetat, 99% p.a.	Sigma-Aldrich, München

2.1.2 Reagenzien

Aceton, für die HPLC	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ameisensäure, 99% p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform, stabilisiert mit Amylen, für HPLC	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Chloroform (RNA-Isolation) C-5312	Sigma-Aldrich, München
Dichlormethan, HPLC Gradient Grade	Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA
Ethanol, absolut zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol I-0398	Sigma-Aldrich, München
Methanol, HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tripure [®] Reagenz	Boehringer Mannheim, Mannheim

2.1.3 Lösungen und Puffer

Wasser wurde aus der Wasseraufbereitungsanlage (SG Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerationsstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) verwendet.

PBS-Puffer (pH 7,3, Ansatz 1000 ml)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Aqua (demineralisiert)	ad 1000 ml

Tris-HCL-EDTA-Puffer (pH 7,5, Ansatz 1000 ml)

Tris	6,06 g
EDTA	1,68 g
Aqua (demineralisiert)	ad 1000 ml

Mittels HCl wurde ein pH von 7,5 eingestellt.

TAE (= Tris-Essigsäure-EDTA)-Puffer (pH 8,3, Ansatz 500 ml)

Tris	12,1 g
Essigsäure	28,6 ml
EDTA	18,6 g
Aqua (demineralisiert)	ad 500 ml

Der TAE-Puffer wurde nach der Herstellung autoklaviert.

Bromphenolblau-Lösung (1%)

Bromphenolblau	100 mg
Aqua (demineralisiert)	9,75 ml
2 M NaOH	0,25 ml

6x LB DNA Probenpuffer („Loading-Puffer“)

Glycerol	5 ml
50x TAE	200 µl
Bromphenolblau (1%)	4,8 ml

2.1.4 Enzyme und Inhibitoren

Hexamprimer p(dN) ₆	Roche, Mannheim
RNAse-Inhibitor (40 U/μl)	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Reverse Transkriptase, RT-AMV (avian myeloblastosis virus)	Roche, Mannheim
RT-AMV Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl ₂ , 150 mM KCl, 5 mM Dithio-1,4-treitol, pH 8,5)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, pH 8,3)	Roche, Mannheim

Die Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen.

Desoxynukleotidgemisch (dNTP)

dATP 100 mM	5 μl
dGTP 100 mM	5 μl
dCTP 100 mM	5 μl
dTTP 100 mM	5 μl
DTT 1M	1,25 μl
Aqua (demineralisiert)	103,75 μl

Das Gemisch wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Taq Polymerase/Gelatine-Lösung (0,25U)

Taq-Polymerase (5 U/μl)	1 μl
Gelatine (2% in Aqua dem.)	1 μl
Aqua (demineralisiert)	18 μl

2.1.5 Geräte

Analysenwaagen	Kern 770 (Feinwaage), Kern GJ Kern & Sohne GmbH, Balingen Laborwaage Sartorius L610, Göttingen
Elektrophoresekammer mit Einhängethermostat der Firma Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach	Eigenkonstruktion der Werkstatt des Institut für Pharmakologie der Universität Bonn
HPLC-Säulen	Hypersil® BDS C18 (100 × 2,1 mm; 3 μm) mit entsprechender Vorsäule (10 × 2,1 mm; 3 μm) Thermo Electron, Dreieich
Labsonic 1510 Ultraschallstab	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
LC-MS/MS-System	Autosampler: Surveyor® Autosampler LC- Pumpe: Surveyor® MS Pump MS/MS-Detektor: TSQ-Quantum Systemsoftware: Finnigan Xcalibur® Quantifizierungssoftware: LC® Quan ThermoElectron, San Jose, CA, USA
Lumi-Imager F1	Boehringer Mannheim, Mannheim
Lumi-Analyst® 3.0	Boehringer Mannheim, Mannheim

pH-Meter	pH 211 Microprozessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Eppendorf Pipetten 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Eppendorf AG, Hamburg Mikroliterpipette Eppendorf Nr. 4780, Eppendorf AG, Hamburg Direktverdrängungs-Mikropipetten Acura [®] (10-50 µl und 60-100 µl), Wheaton Science Products, Millville, NJ USA Mikroliterspritze (HAMILTON), 10 µl, Fisher Scientific, Schwerte
Stickstoffabdampfanlage im Wasserbad	Eigenkonstruktion der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie der Universität zu Köln
Thermo Cycler	Firma Hybaid, Heidelberg
Thermostat Julabo Typ MP	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Tiefkühlschränke	Freezer HFU 686 Basis, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Transilluminator zur Ansicht des Elektrophorese-Gels	MWG Biotech AG, Ebersberg
Ultraschallbad	Transonic 780, Elma GmbH Singen
Vortex- Mixer	Fisherbrand [®] TopMix 11118 Reagenzien-Mixer, Eckli, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Eppendorf Kühlzentrifuge 5810 R und

5402, Eppendorf AG, Hamburg

Heraeus Labofuge 400R

Thermo Electron, Dreieich

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

2ml- Glasvials	Renner GmbH, Dannstadt
Proben-Vials, 8 ml, Borsilikatglas, mit Schraubdeckel	Fisher Scientific GmbH, Schwertennnn
Standard-Synthese-Vials 3 und 30 ml	Supleco, Bellefonte, PA, USA
Fisherbrand® Glaspipetten (1, 2 und 5 ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fisherbrand® Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Gummihütchen für Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Pipettenspitzen (1000 µl)	Brand GmbH, Wertheim
S-Monovette® 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
EDTA-Monvetten® 2,7 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
BD Vacutainer™ CPT™ Tube 8 ml	Becton Dickinson, NJ, USA
Falcon Röhrchen 15 ml	Nalge Nunc Int. Corp., Naperville, IL, USA
Autosampler Vials (1,5 ml) mit Kappe	Thermo Electron, Dreieich
Microinserts für Autosampler Vial	Thermo Electron, Dreieich
Reaktionsgefäße 2 ml Eppendorf 2343	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Experimentelles Design

2.2.1 Studienpopulation

Ingesamt nahmen 28 gesunde Probanden (14 männlich, 14 weiblich) an der Untersuchung teil. Alle Probanden waren Teil eines gesunden Kontrollkollektivs einer fortlaufenden klinischen Studie über Endocannabinoide und psychiatrische

Störungen an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität zu Köln. Die Studie wurde durch die unabhängige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln genehmigt und nach den Regularien der Deklaration von Helsinki sowie den entsprechenden europäischen und internationalen Richtlinien durchgeführt. Alle Probanden gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme ab, nachdem sie zuvor über potentiellen Risiken der Teilnahme aufgeklärt worden waren. Alle Probanden waren zudem damit einverstanden, dass das von ihnen entnommene Material für weitere Untersuchungen aufbewahrt wird.

Auswahlkriterien für die Rekrutierung waren die Faktoren Cannabis- und Nikotinkonsum. Bezüglich Cannabiskonsum wurde unterschieden in „*high frequency user*“ (HFU) und „*low frequency user*“ (LFU). HFU bedeutete, dass die Probanden mehr als 20 Mal im Leben Cannabis konsumiert hatten, jedoch nicht in den letzten sechs Monaten. Bei den LFU hingegen hatten die Probanden nicht mehr als fünf Mal im Leben Cannabis konsumiert, zudem nicht in den letzten sechs Monaten. Zweiter Einflussfaktor auf die Auswahl war der Nikotinkonsum. Es wurde unterschieden in Raucher (R) und Nichtraucher (NR). Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die Verteilung der Studienpopulation. Alle rekrutierten Probanden willigten schriftlich ein, dass die zusätzlich entnommenen Blutproben im Rahmen ihrer Teilnahme an der wissenschaftlichen Studie zur „Untersuchung von endogenen Cannabinoiden und anderen Parametern im Serum von gesunden Kontrollpersonen“ verwendet wird, dazu gehörte auch die Bestimmung der mRNA aus Leukozyten.

Die Gesundheit der Probanden wurde im Rahmen von Vor- und Nachuntersuchungen überprüft. Diese bestanden aus einer gründlichen körperlichen Untersuchung, umfassenden klinischen Labortests und einer psychiatrischen Krankheitsanamnese.

Tabelle 3: Studienpopulation

Gruppe	Probanden	Alter [Jahre]	Geschlecht [w/m]	Cannabiskonsum [HFU/LFU]	Nikotinkonsum [NR/R]
A	1	28	w	HFU	NR
	2	25	w	HFU	NR
	3	27	w	HFU	NR
	4	30	m	HFU	NR
	5	28	w	HFU	NR
	6	29	w	HFU	NR
B	7	29	w	HFU	R
	8	34	m	HFU	R
	9	27	m	HFU	R
	10	33	m	HFU	R
	11	27	m	HFU	R
	12	32	m	HFU	R
	13	30	w	HFU	R
C	14	34	m	LFU	NR
	15	26	w	LFU	NR
	16	29	m	LFU	NR
	17	24	w	LFU	NR
	18	20	w	LFU	NR
	19	24	m	LFU	NR
	20	23	w	LFU	NR
	21	28	m	LFU	NR
D	22	23	m	LFU	R
	23	28	m	LFU	R
	24	41	m	LFU	R
	25	41	w	LFU	R
	26	33	w	LFU	R
	27	32	w	LFU	R
	28	26	m	LFU	R

2.2.2 Blutabnahme

Allen Probanden wurde jeweils in vier Sarstedt- Monovetten[®] (9 ml) sowie 4 BD Vacutainer[™] CPT[™] (8 ml) Tubes Blut abgenommen. Diese Spezialröhrchen dienen der Separation weißer Blutzellen. Zudem wurde für die klinische Laboruntersuchung eine EDTA-Monovette[®] (2,7 ml) abgenommen und für ein Differentialblutbild in das Institut für Klinische Chemie der Universität zu Köln geschickt.

2.2.3 Blutprobenaufbereitung

2.2.3.1 Serumgewinnung

Zur Gewinnung der Serumproben wurden die Sarstedt-Monovetten[®] sofort nach Abnahme in der Kühlzentrifuge bei +4 °C und 3200 x g fünf Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde danach in 2 ml Glasvials bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Gewinnung der mononukleären Zellen

Zur Gewinnung der mononukleären, weißen Zellen aus dem Vollblut wurden zwei der vier abgenommenen BD Vacutainer[™] CPT[™] Tubes innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme bei Raumtemperatur in einem horizontalen Rotor (Eppendorf Centrifuge 5810R) bei 2200 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit der Zellbande in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt, und gewaschen (mehrmaliges vorsichtiges Umschwenken). Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2200 x g für zehn Minuten. Das resultierende Zellpellet wurde nach Abgießen des Überstandes in 1 ml PBS aufgenommen und bei -80 °C für die folgende RNA-Isolation gelagert.

2.3 Bestimmung der endogenen Cannabinoide im Serum

2.3.1 Synthese der [²H₄]-markierten und nicht-markierten Standardreferenzsubstanzen

Die Synthese der deuteriummarkierten sowie nicht-markierten Fettsäureethanolamide AEA, OEA, PEA sowie d₄-AEA, d₄-OEA und d₄-PEA verlief identisch und basierte auf der Methode von Giuffrida und Piomelli (1998a). Ausgangsstoffe sind die jeweiligen Acylchloride Arachidonylchlorid, Oleoylchlorid und Palmitoylchlorid, sie wurden in Dichlormethan (10 mg/ml) gelöst und für 15 Minuten der Reaktion mit einem Equivalent nicht-markiertem oder [²H₄]-markiertem Ethanolamin bei 0-4 °C unterzogen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gereinigtem Wasser gestoppt. Nach vorsichtigem Rühren und Phasentrennung wurde die obere Phase verworfen und die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen, um nicht abreagiertes Ethanolamin zu entfernen. Die Reaktion resultierte in einer quantitativen Umsetzung der Acylchloride (Devane et al. 1992; Giuffrida und Piomelli 1998a). Es folgten eine Aufkonzentrierung der entstandenen Acylethanolamide unter Schutzgasatmosphäre (N₂) und das Lösen des Rückstandes in Chloroform mit einer Konzentration von 20 mM. Die deuterierten und nicht-deuterierten Acylethanolamide wurden bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Identität und Reinheit wurden durch Dünnschichtchromatographie und HPLC bestimmt.

2.3.2 Methodenentwicklung

Die Analytik erfolgte an einem LC-MS/MS-System der Firma Thermo Electron (San Jose, CA, USA), das aus einem Surveyor[®] Autosampler mit temperaturkontrollierter Probenlagerung und Säulenofen, einer Surveyor[®] MS-Pumpe und einem TSQ Quantum Triple Quadrupol-Massenspektrometer mit einem Interface zur Electrospray-Ionisierung (ESI) bestand. Das System wurde durch die implementierte Xcalibur[®]-Software (Version 1.3) kontrolliert. Zur Festlegung geeigneter MS/MS-Parameter wurden wässrige Stammlösungen von AEA, OEA und PEA und den jeweiligen internen Standards d₄-AEA, d₄-OEA und d₄-PEA in Methanol mit Konzentrationen von ca. 1000 ng/ml hergestellt.

Für jeden einzelnen Analyten wurde durch Direktinfusion der Einzellösungen und mit Hilfe der Quantum Tune Master[®]-Software (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) das Fragmentation mit der höchsten Signalintensität detektiert. Anschließend wurden die optimalen MS/MS-Bedingungen durch Direktinfusion der Einzelstammlösungen und Loop-Injektionen der Gesamtlösung ermittelt. Zur Optimierung des *selected reaction monitoring* (SRM) wurden zu diesem Zweck folgende Parameter variiert:

- Ionisierungsquelle
- Ionisierungsenergie
- *sheath gas*-Fluss
- *auxillary gas*-Fluss
- Detektor
- Temperatur der *heated capillary*
- Kollisionsenergie (CE)
- Kollisionsgas-Fluss (Argon)

Die chromatographische Trennung der Analyten wurde durch Flüssiginjektion wässriger Stammlösungen und gespikter, aufgearbeiteter Serumproben entwickelt. Das Verfahren wurde durch Variation verschiedener Säulenmaterialien, der Laufmittelzusammensetzung, der Säulenofentemperatur und des Laufmittelgradienten optimiert.

Die Probenaufbereitung ist angelehnt an das von Giuffrida und Piomelli (1998a) entwickelte Aufbereitungsverfahren zur Bestimmung endogener Cannabinoide in Plasma. Grundprinzip der Quantifizierung ist die Isotopenverdünnungs-Methode, siehe Kapitel 2.3.3.1, basierend auf der Zugabe von internem Standard. Das genaue Verfahren der Probenaufbereitung ist in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

2.3.3 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

2.3.3.1 Isotopenverdünnungs-Methodik (*isotope dilution assay*)

Die Isotopenverdünnung ist ein häufig in der Massenspektrometrie angewandtes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Identifizierung.

Diese Methodik basiert hier auf der Zugabe von deuteriummarkierten Fettsäureethanolamiden ($[^2\text{H}_4]$ -AEA, $[^2\text{H}_4]$ -PEA und $[^2\text{H}_4]$ -OEA) als interne Standards. Eine bekannte Konzentration dieser Substanzen (Herstellung siehe 2.3.1) wird vor der Aufbereitung (Extraktions- und Reinigungsschritte) dem biologischen Untersuchungsmaterial zugesetzt.

Der Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass etwaige Verluste während der Aufbereitung die Quantifizierung nicht beeinträchtigen, da nur Isotopenverhältnisse gemessen werden und davon ausgegangen werden kann, dass interner Standard und Analyt sich in gleicher Weise hinsichtlich etwaiger Verluste verhalten.

Standardkalibrationskurven werden durch Zugabe konstanter, bekannter Konzentrationen deuterierter Fettsäureethanolamide zu steigenden Konzentrationen des jeweilig korrespondierenden unmarkierten Fettsäureamides erstellt (siehe Kapitel 2.3.3.3).

2.3.3.2 Matrixproben

Die Matrixproben dienen der Validierung der Bestimmungsmethode in der Matrix. Dazu verwendet man in der Regel Leerplasma- bzw. Leerserumproben. Da dies bei der Analytik endogener Substanzen, die *a priori* die zu bestimmenden Analyten enthalten, nicht möglich ist, findet zusätzlich eine „Nullwertbestimmung“ statt.

Serumproben eines gesunden, männlichen Probanden wurden zur Validierung wie unter Kapitel 2.2.3.1 beschrieben gewonnen, aufbereitet, in Glasvials aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Drei dieser Proben wurden einmal mit drei verschiedenen bekannten Konzentrationen (25, 10 und 2,5 pmol/ml) sowie den entsprechenden Standards (25 pmol/ml für AEA und 500 pmol/ml für OEA und PEA) vor der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen

Aufbereitung gespikt und einmal nach der Aufbereitung gespikt. Das Ganze erfolgte in drei Ansätzen.

2.3.3.3 Interne Standard- Lösungen

Es wurden jeweils 25 pmol/ml d₄-AEA sowie 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA interne Standards in Methanol hergestellt.

Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.3.4 Herstellung der Kalibrierlösungen

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurden die Stammlösungen aus Kapitel 2.3.1 verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen in 1 ml MeOH mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 500 sowie 100 pmol/ml nur für OEA und PEA sowie 25, 10, 5, 2,5, 1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,025 pmol/ml für AEA, PEA und OEA. Jede Kalibrationsprobe enthielt zudem 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA und 25 pmol/ml d₄-AEA als interne Standards.

2.3.3.5 Herstellung der Qualitätskontrollen (QCs)

Separat wurden drei Qualitätskontrollproben (QCs) mit 400, 20 sowie 0,4 pmol/ml OEA sowie PEA und 20, 10 und 0,2 pmol/ml AEA hergestellt und jeweils 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA und 25 pmol/ml d₄-AEA als interne Standards.

Die unterschiedlichen Kalibrationsbereiche richteten sich nach den ungefähr erwarteten Konzentrationen in den Proben, die für PEA sowie OEA höher anzunehmen waren als für AEA.

Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Probenaufbereitung

Die Extraktion der sehr hydrophoben Fettsäureamide erfolgt mit organischen Lösungsmitteln. Die Wahl der speziellen Methode hängt ab von der Beschaffenheit

des biologischen Untersuchungsmaterials. Der Einsatz von Methanol und Chloroform hat sich zur Extraktion der Cannabinoide aus Plasma bzw. Gewebe bewährt (Giuffrida und Piomelli 1998b).

Folgendes Aufbereitungsschema (Lipidextraktion) galt für alle Serumproben:

Nach Auftauen der Proben auf Eis wurden 1 ml Aliquote mit jeweils 25 pmol/ml d_4 -AEA und 500 pmol/ml d_4 -OEA und d_4 -PEA versehen. Danach folgte Zugabe von 1 ml kaltem Aceton und kurzes Mischen auf dem Vortex-Mixer. Dann verweilten die Proben für zwei Minuten auf Eis. Es folgte Zentrifugation in der Kühlzentrifuge für zehn Minuten bei 4000 x g. Dann wurde der Überstand in ein neues 8 ml Vial überführt und im Wasserbad (37°C) unter Stickstoff eingedampft, bis das Aceton verdampft war. Dann erfolgte die Zugabe von zunächst 1 ml Methanol mit anschließendem Vortex-Mixen für zwei Minuten. Danach wurden 2 ml Chloroform zugeben und erneut zwei Minuten geschüttelt. Dann wurde zur vollständigen Phasentrennung fünf Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und die Chloroformphase mittels einer Pasteurpipette in ein neues Glasvial überführt. Die Chloroformphase wurde komplett im Wasserbad unter Stickstoff eingedampft und danach in 20 µl Chloroform und 60 µl Methanol aufgenommen. Löste sich der Rückstand nach Zugabe von 20 µl Chloroform nicht klar, sondern blieb trüb, wurden zusätzliche 20 µl Chloroform zum vollständigen Lösen zugeben. Die Lösung wurde in ein Vial mit Microinsert für die LC-MS/MS überführt und sofort bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Chromatographie

Zur Chromatographie wurde eine Surveyor® MS-Pumpe mit zugehörigem Autosampler eingesetzt. Laufmittel A bestand aus einer 70 µM wässrigen Silberacetat-Lösung mit 0,1 % Ameisensäure. Die Ameisensäure im Laufmittel diente der Unterstützung der Protonierung und somit der positiven Ionisierung in der Ionenquelle. Laufmittel B war eine 70 µM methanolische Silberacetat-Lösung. Die Injektion erfolgte über ein Sechskanalventil mit 20 µl Probenschleife.

Folgende HPLC-Bedingungen wurden gewählt:

<u>Analytische Trennsäule</u>	Hypersil® BDS C18 (100 × 2,1 mm; 3 µm)
<u>Vorsäule</u>	Hypersil® BDS C18 (10 × 2,1 mm; 3 µm)
<u>Autosampler</u>	
Probeninjektionsvolumen	20 µl
Spülflüssigkeit (nach jeder Injektion)	Methanol
Spülvolumen	1000 µl
Temperatur des Säulenofens	30 °C
Temperatur des Probenplatelets	5 °C
<u>LC-Pumpe</u>	
Flussrate	200 µl/min
Laufzeit	12 min

Folgender Laufmittelgradient wurde gewählt:

Zeit (min)	Fluss (µl/min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
0	200	30	70
5	200	0	100
8	200	0	100
10	200	30	70
12	200	30	70

Zur chromatographischen Separation der Analyten in der Probenmatrix wurde der oben beschriebene Laufmittelgradient eingesetzt. Dabei wurde innerhalb von fünf Minuten die Laufmittelzusammensetzung von anfangs 30 % Laufmittel A und 70 %

Laufmittel B auf 100 % Laufmittel B angehoben und für drei Minuten konstant gehalten. Anschließend wurde innerhalb von zwei Minuten das Ausgangsverhältnis wiederhergestellt und abschließend über zwei Minuten zur Equilibrierung der Säule gehalten.

Aufgrund der aufwändigen Flüssig-Flüssig-Extraktion waren die Proben zur Analyse aufgereinigt. Daher konnte darauf verzichtet werden, am Beginn der Chromatographie den Laufmittelstrom an der Ionenquelle vorbei in einen Abfallbehälter zu leiten, um eventuell Matrix abzutrennen.

Die Retentionszeiten betragen 6,8 Minuten für AEA, 7,4 Minuten für PEA und 7,6 Minuten für OEA. Die nachfolgende Abbildung 7 zeigt ein Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe und den entsprechenden Retentionszeiten der Analyten.

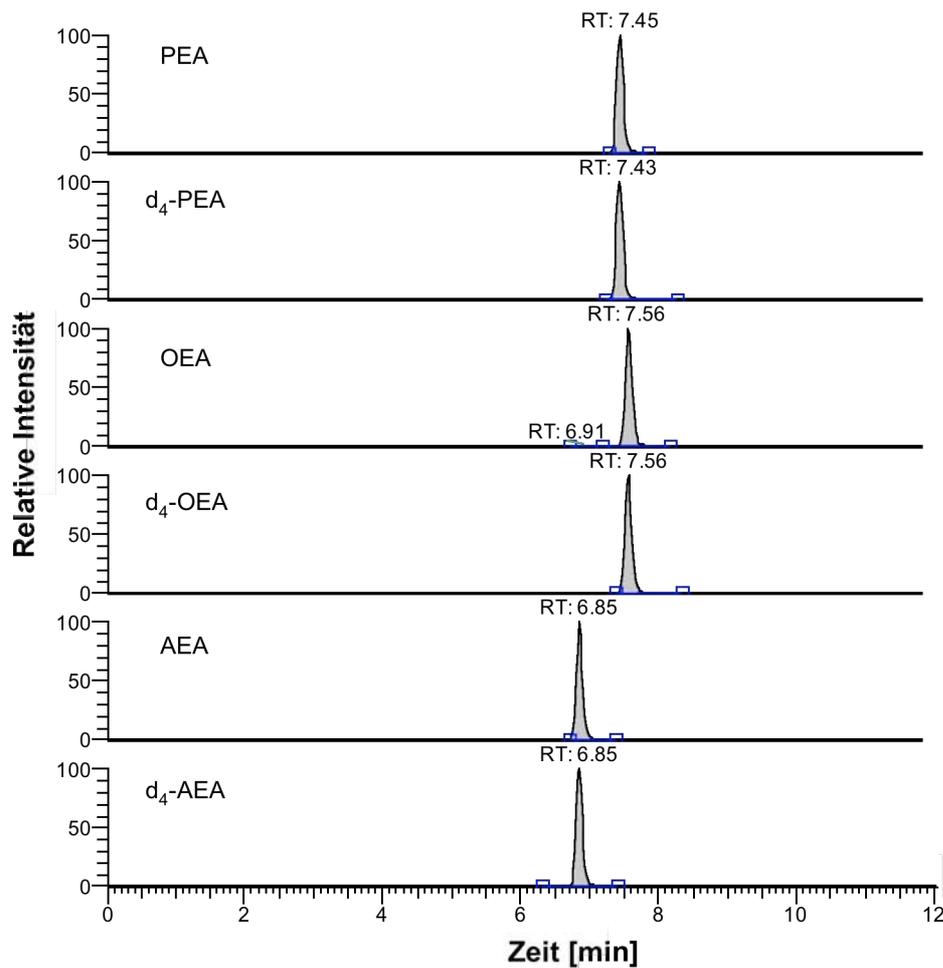


Abbildung 7: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentrationen: 25 pmol/ml AEA, OEA und PEA sowie 25 pmol/ml d₄-AEA und 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA als interne Standards

2.3.6 Massenspektrometrische Detektion

Das Prinzip der massenspektrometrischen Detektion besteht in der Auftrennung der Analyten nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) (Budzikiewicz 1998). Voraussetzung hierfür ist, dass die Analyten ionisiert in der Gasphase vorliegen. Diese Voraussetzungen werden während der Ionisierung in der Ionenquelle erfüllt. Nach Eintritt der geladenen Analyten in den TSQ Quantum MS Detektor werden die Ionen zunächst durch drei Kammern geführt. Über diese wird schrittweise ein Hochvakuum aufgebaut. Die Kammern sind durch Linsensysteme voneinander getrennt, die Ionen werden durch elektrische Felder auf einer stabilen Bahn gehalten, während nicht geladene Matrixbestandteile abgetrennt werden. Die eigentliche Auftrennung

nach m/z erfolgt dann unter Hochvakuum (10^{-7} - 10^{-5} Torr) im Quadrupol-System (Analysator). Ein Quadrupol-System besteht aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben. Zwei gegenüberliegende Stäbe sind jeweils gleich gepolt. Durch das Übereinanderlagern von Gleich- und Wechselspannung wird zwischen den Stäben ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die Analyten nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt werden können. In Abhängigkeit von den Spannungsverhältnissen haben nur Teilchen mit einem bestimmten m/z eine stabile oszillierende Bahn durch das Stabsystem, während alle anderen abgelenkt und an den Stäben entladen werden. An den ersten Quadrupol schließt sich die so genannte Kollisionszelle an. Auch hierbei handelt es sich um ein Quadrupol-System, das im TSQ Quantum in einem rechten Winkel angeordnet ist. In der Kollisionszelle können die Analyten durch die Kollision mit Argonatomen und durch Zuführen von kinetischer Energie über Potentialdifferenzen fragmentiert werden (siehe Abbildung 8). Die Art und Weise, wie eine bestimmte Verbindung fragmentiert, ist abhängig von ihrem molekularen Aufbau. Es entsteht hierbei ein Fragmentmuster oder auch Produktionenspektrum, das spezifisch ist für die entsprechende Substanz (siehe Abbildung 9-11). Hinter der Kollisionszelle befindet sich ein drittes Quadrupol-System, in dem die Teilchen erneut nach m/z aufgetrennt werden können, um so z.B. ein Produktionenspektrum aufzuzeichnen. Der Elektronenmultiplier wandelt die Ionen in ein elektrisches Signal um.

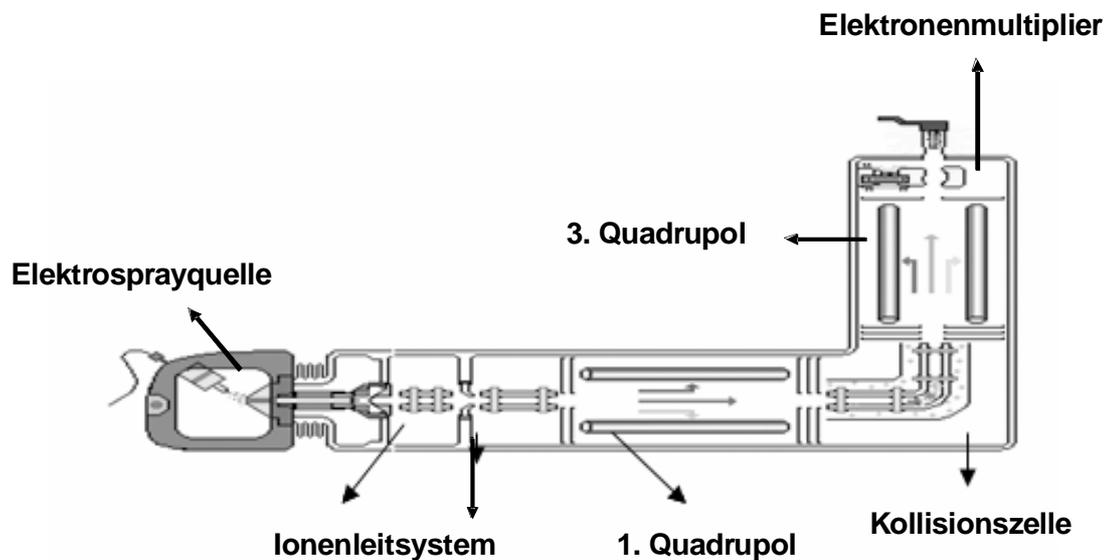


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des TSQ Quantum® (Thermo Electron)

2.3.6.1 Ionisierung

Bei der Ionisierung mittels Elektrospray (Kearle 1997) wird der Laufmittelfluss durch das Anlegen einer Hochspannung (Sprayvoltage) zerstäubt. Der Sprayvorgang wird pneumatisch durch zwei Stickstoffgasflüsse (*sheath gas*, *auxillary gas*) unterstützt. Währenddessen werden die Analytenmoleküle ionisiert und gehen durch Evaporation des Laufmittels letztendlich in die Gasphase über. Wenn sie in den MS-Detektor eintreten, durchqueren sie zunächst eine beheizte Kapillare (*heated capillary*), wo die letzten Laufmittelreste verdunsten. Prinzipiell ist es möglich, je nach Polarität der Spannung, positive oder negative Ionen zu generieren. Für die Analyten AEA und OEA wurde zur Ionisierung die Eigenschaft von Lipiden genutzt, mit Silberionen Komplexe über ihre Doppelbindungen zu bilden (Morris 1966; Winstein S. 1938). Komplexierung mit Silber-Ionen resultiert in der Beobachtung zweier MS-Signale, entsprechend den zwei vorkommenden Isotopenformen ^{107}Ag (52%) und ^{109}Ag (48%). Der Analyt PEA, der keine Doppelbindung in der Molekülstruktur besitzt, wurde mittels Protonierung ionisiert. Dem Laufmittel wurde neben Silberacetat zusätzlich 0,1 % Ameisensäure zugesetzt, damit zur Unterstützung der Ionisierung

mittels Elektrospray schon im Laufmittel aus den Analyten die entsprechenden Kationen $[M-Ag]^+$ und $[M-H]^+$ gebildet werden konnten.

2.3.6.2 Full-scan-Spektren

Mittels Full-Scan-Experimenten wurden Massenspektren generiert, wobei der Massenbereich m/z 50-500 abgedeckt wurde. Hierdurch erfolgte die Identifizierung der Molekülonen. Für ein solches Experiment wird nur ein Quadrupol-System benötigt, das zweite Quadrupol-System und die Kollisionszelle transportieren die Ionen in diesem Fall nur weiter. Durch Fragmentierung des Molekülonen erhält man ein Produktionenspektrum.

2.3.6.3 Produktionenspektren

Zur Generierung von Produktionenspektren werden alle analytischen Quadrupol-Systeme des Tandem-MS-Detektors benötigt. Im ersten Quadrupol wird die Muttermasse oder das Molekülion isoliert ($[M-Ag]^+$ bzw. $[M-H]^+$). In der Kollisionszelle herrscht ein Argonpartialdruck von 1,5 mTorr. Durch den Zusammenstoß mit Argon und das Zuführen von Energie über Potentialdifferenzen (Kollisionsenergie: CE, 15-60V) werden die Analytenmoleküle fragmentiert. Der nachfolgende Quadrupol scant über den Massenbereich, in dem die Fragmente erwartet werden, und zeichnet so ein Fragment- oder Produktionenspektrum des Molekülonen auf.

Mit Hilfe der Gerätesoftware XCalibur™ (Thermo Electron) ist es möglich, das intensivste Fragment eines Molekülonen zu identifizieren und seine Kollisionsenergie bzw. den Argonpartialdruck optimieren zu lassen.

2.3.6.4 Selected reaction monitoring (SRM)

Zur Quantifizierung der endogenen Cannabinoide arbeitet das TSQ Quantum Triple Quadrupol-Massenspektrometer im *selected reaction monitoring* Modus. Hierbei wird im ersten Quadrupol wieder nur das Molekülion selektiert und in der Kollisionszelle wird unter den optimierten Bedingungen fragmentiert. Der dritte Quadrupol lässt nur

das intensivste Produktion passieren, dessen Signal dann detektiert und ausgewertet wird. Dieser Detektionsmodus bietet die höchste mögliche Sensitivität und Spezifität des Instruments. Die Sensitivität wird dadurch erzielt, dass nur eine bestimmte und spezifische Fragmentierungsreaktion beobachtet wird und alle anderen Teilchen ausgeblendet werden. Dadurch wird der Hintergrund der Detektion auf ein Minimum reduziert. In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die Übergänge für sämtliche Analyten sowie die optimierten Kollisionsenergien dargestellt. Für die SRM-Experimente wurde die Scanzeit auf 0,2 sec gesetzt, die massenspektrometischen Auflösung gemessen als Halbwertsbreite (FWHM) betrug für beide Quadrupol-Systeme 0,7 Da. Die Scanweite für alle SRM-Übergänge betrug m/z 0,5.

Als *sheath* und *auxiliary gas* wurde Stickstoff mit einem Druck von 60 bzw. 2 Hilfseinheiten (arbitrary units) verwendet. Die Spannung der ESI-Kapillare (*spray voltage*) wurde auf 4500 V, die Temperatur der Ionentransferkapillare (*capillary temperature*) auf 350 °C eingestellt.

Tabelle 4: SRM-Übergänge und Kollisionsenergien der MS/MS-Detektion der Analyten und ihrer jeweiligen internen Standards

Analyt	SRM-Übergang [m/z]	Kollisionsenergie [eV]
AEA	456,2 → 438,2	30
[² H ₄]-AEA	460,3 → 442,3	30
OEA	434,2 → 416,2	30
[² H ₄]-OEA	438,2 → 420,2	28
PEA	300,3 → 62,3	18
[² H ₄]-PEA	304,3 → 66,3	22

Die Abbildungen 9 bis 11 zeigen die Fragmentationenspektren der ausgewählten Übergänge aller drei Analyten, die der jeweiligen internen Standards sind unter Berücksichtigung des Massenshifts identisch.

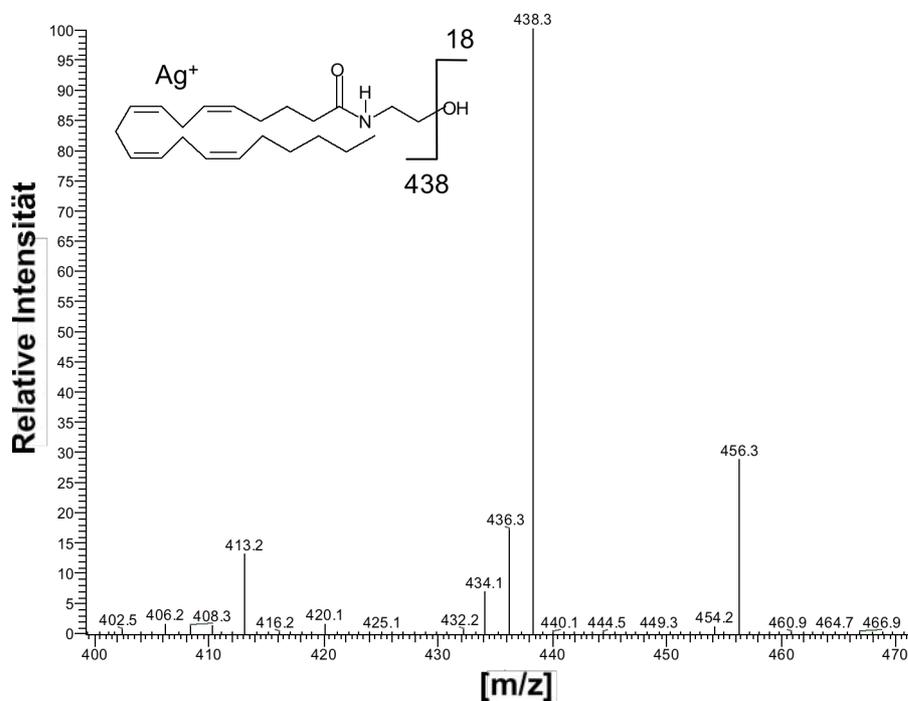


Abbildung 9: Fragmentationenspektrum von Anandamid (AEA) mit Fragmentierung des intensivsten Übergangs: 456,2 → 438,2 [m/z]

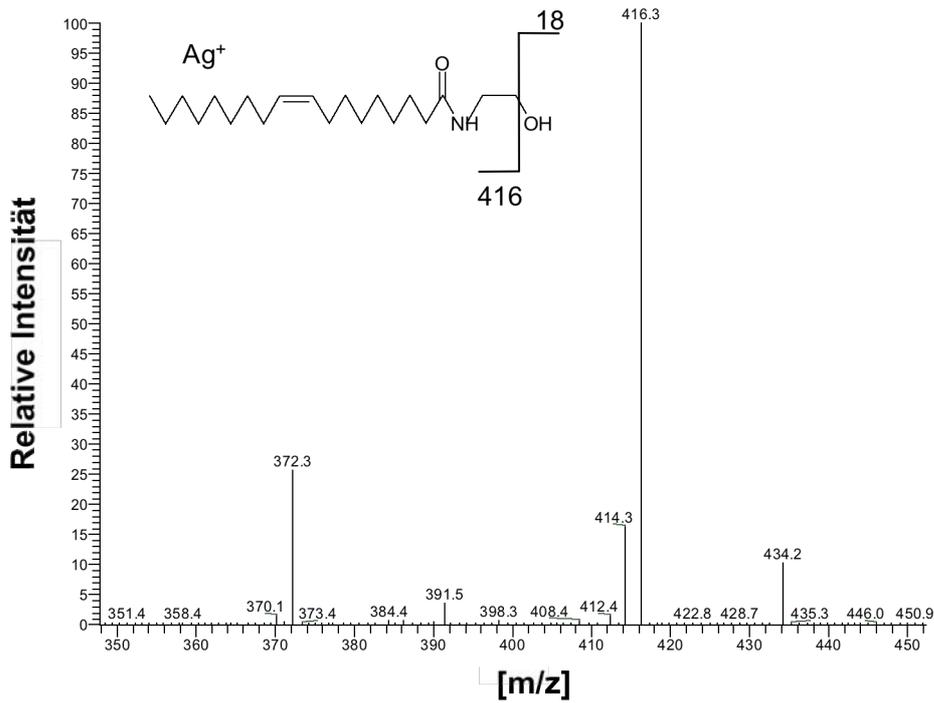


Abbildung 10: Fragmentationenspektrum von Oleoylethanolamid (OEA) mit Fragmentierung des intensivsten Übergangs: 434,2 → 416,2 [m/z]

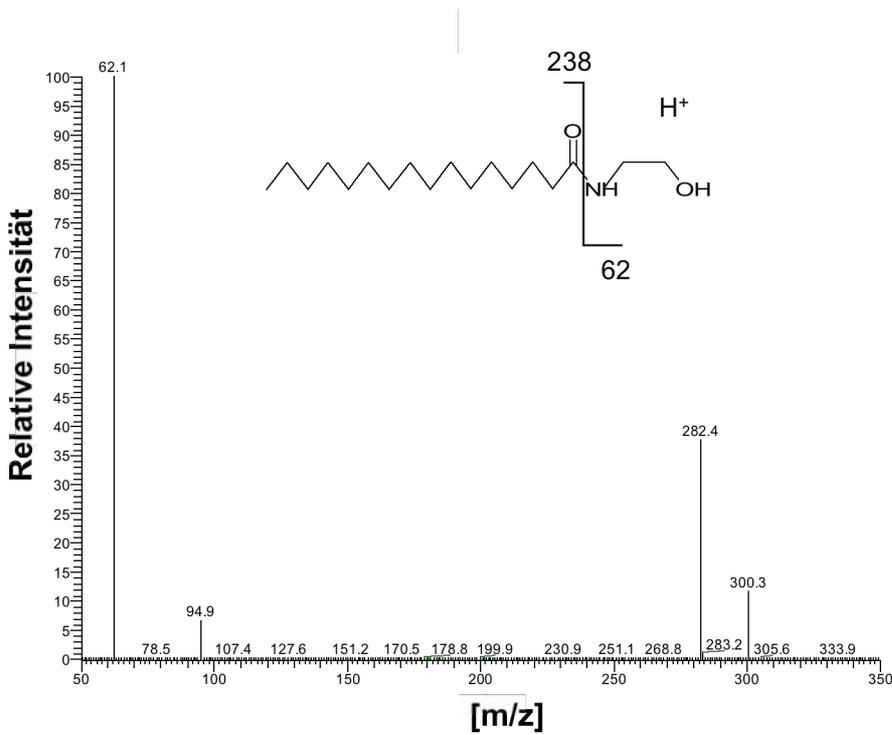


Abbildung 11: Fragmentationenspektrum von Palmitoylethanolamid (PEA) mit Fragmentierung des intensivsten Übergangs: 300,3 → 62,3 [m/z]

2.3.7 Datenauswertung

Alle LC-MS/MS-Peaks wurden mit der Software XCalibur™ LC-Quan (Version 1.3) ausgewertet. Zur Integration wurde ISIS Peakdetektionsalgorithmus eingesetzt. Die Integration sämtlicher Signale wurde aber zudem visuell überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert und nachintegriert.

2.3.8 Kalibration

Die Kalibriergeraden wurden aus zwei Sätzen Kalibrierstandards erstellt, die jeweils vor und nach den Probensequenzen vermessen wurden. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 0,025 – 25 pmol/ml für AEA, und 0,025 – 500 pmol/ml für OEA und PEA. Die linearen Kalibriergeraden basieren auf dem Quotienten der Peakflächen von Analyt und internem Standard aufgetragen gegen die Konzentration. Um die Güte der linearen Regression im unteren Konzentrationsbereich zu erhöhen, wurde eine Wichtung ($1/x$) durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.4.2).

2.3.9 Einsatz der Methode zur Vermessung der Probandenproben aus der Studie

Die Vermessung der Proben erfolgte gemäß den in Kapitel 2.3 beschriebenen Verfahren. Die Probensequenz bestand aus einem vollständigen Satz an Kalibrationsproben am Anfang und am Ende einer Messreihe, sowie den Serumproben mit unbekanntem Konzentrationen.

2.4 Validierung analytischer Methoden

Ziel einer jeden analytischen Messung ist es, den *wahren Wert* einer Größe zu bestimmen. Die wichtigste Voraussetzung für die Beurteilung von Analysemethoden ist die Validierung.

Ziel der Validierung einer Analysemethode ist die Überprüfung und Bewertung ihrer Qualität bzw. Ermittlung der Fehler. Dabei muss nachgewiesen werden, dass das Analyseverfahren aussagekräftige, richtige und präzise Informationen über das analytische Problem liefert.

Wichtige Qualitätsmerkmale von Analysemethoden sind:

- Präzision (engl. *precision*)
- Richtigkeit (engl. *accuracy*)
- Selektivität, Spezifität (engl. *selectivity, specificity*)
- Wiederfindung (engl. *recovery*)
- Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*)
- Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification*)
- Linearität (engl. *linearity*)
- Empfindlichkeit (engl. *sensitivity*)
- Bestimmungsbereich (engl. *range*)

Für die Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum wurde eine Methodvalidierung vorgenommen, die sich an internationalen Richtlinien orientiert (CPMP/ICH/281/95 1996; CPMP/ICH/381/95 1994; FDA 2001; Shah et al. 1991).

2.4.1 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Die Kalibrier- und Qualitätskontrollösungen für die Validierung wurden separat und unabhängig voneinander aus verschiedenen Wägungen und Verdünnungen hergestellt.

Die höchste Konzentration der Kalibrierproben lag über der höchsten erwarteten Konzentration in den zu analysierenden Proben. Für die Qualitätskontrollproben wurden Konzentrationen im Konzentrationsbereich der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ), sowie im mittleren Quantifizierungsbereich und an der oberen Quantifizierungsgrenze gewählt und hergestellt. Die detaillierte Beschreibung der Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen findet sich im Kapitel 2.3.3.

2.4.2 Kalibrierung

Kalibrierlösungen mit steigender Konzentration an Standardsubstanz und internem Standard (Isotopenverdünnung-Methode) wurden hergestellt. Zur Quantifizierung wurde der Quotient aus der Fläche des Analyten und der Fläche des internen Standards herangezogen und graphisch gegen die Konzentration aufgetragen.

Bei direkter Proportionalität (linearer Abhängigkeit) erhält man eine Gerade (Kalibriergerade). Eine Kalibriergerade wurde als geeignet angesehen, wenn zumindest bei zwei Drittel der Datenpunkte die Abweichung vom Sollwert nicht über 20 % an der Quantifizierungsgrenze sowie nicht über 15 % für alle anderen Konzentrationen lag.

Datenpunkte, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden ausgeschlossen.

2.4.3 Präzision und Richtigkeit

2.4.3.1 Präzision

Definition: Die Präzision (= Genauigkeit, engl. *precision*) ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau gleichen Bedingungen. Die Präzision kann durch

die Standardabweichung (s) oder die relative Standardabweichung (s_{rel}), auch Variationskoeffizient (CV) genannt, zahlenmäßig erfasst werden.

Die Präzision wird auch als „Streuparameter“ bezeichnet mit der relativen Standardabweichung oder CV als statistische Größe.

Zur Berechnung gilt folgende Formel :

$$\text{Relative Standardabweichung [\%]} = \frac{\text{Standardabweichung der Ist - Konzentrationen}}{\text{Mittlere Ist - Konzentration}} \cdot 100$$

2.4.3.2 Richtigkeit

Definition: Unter der Richtigkeit (engl. *accuracy*) versteht man die Übereinstimmung des Messergebnisses mit dem „wahren“ Wert. Da der wahre Wert oft nicht bekannt ist, wird stattdessen ein durch Abschätzung ermittelter Näherungswert zur Berechnung der Richtigkeit herangezogen, den man als „richtigen“ Wert bezeichnet.

Die Richtigkeit wird auch als „Lageparameter“ bezeichnet mit dem relativen Fehler (RE) als statistische Größe. Die Richtigkeit gibt Aufschluss über mögliche systematische Fehler in der Probenaufbereitung und -messung.

Zur Berechnung gilt folgende Formel:

$$\text{Relativer Fehler [\%]} = \frac{(\text{Mittlere Ist - Konzentration}) - (\text{Soll - Konzentration})}{\text{Soll - Konzentration}} \cdot 100$$

2.4.3.3 Bewertung von Präzision und Richtigkeit

Zur Bewertung von Präzision und Richtigkeit wurden sowohl *interday*- (zwischen den Tagen) wie auch *intraday*- (innerhalb eines Tages) Analysen durchgeführt.

Für die *intraday*-Analysen wurden die unter 2.4.1 genannten Qualitätskontrollproben in den vier verschiedenen Konzentrationen gemeinsam aufbereitet und jeweils fünfmal in einem Messvorgang bestimmt und ausgewertet.

Für die *interday*-Analysen wurden an fünf verschiedenen Tagen die unter 2.4.1 genannten Qualitätskontrollproben aufbereitet und mit der gleichen Messvorrichtung und -methode bestimmt und ausgewertet.

Für die Bewertung der Präzision der Methode innerhalb eines Tages (*intraday-precision*) wurde der Median der Werte für die Präzision herangezogen, die innerhalb eines Tages jeweils an den verschiedenen Messtagen ermittelt wurden. Für die Präzision zwischen verschiedenen Tagen (*interday-precision*) galt das Entsprechende. Die ermittelten Werte (CV) sollten $\leq 15\%$ sein. An der Quantifizierungsgrenze durften die Abweichungen maximal 20 % betragen.

Für die Bewertung der Richtigkeit der Methode innerhalb eines Tages (*intraday-accuracy*) wurde der Median der Werte für die Richtigkeit herangezogen, die innerhalb eines Tages jeweils an den verschiedenen Messtagen ermittelt wurden. Für die Richtigkeit zwischen verschiedenen Tagen (*interday-accuracy*) galt das Entsprechende. Diese Werte (RE) sollten entsprechend der Präzision $\leq 15\%$, sowie an der Quantifizierungsgrenze maximal 20 % Abweichung betragen.

2.4.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Definition: Die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification, LLOQ*) gilt für quantitative Bestimmungen und ist die niedrigste Masse bzw. der niedrigste Gehalt, der unter den angegebenen Analysenbedingungen in einem vorliegenden Material noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann.

Definition: Die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*) gilt für qualitative Analysen und gibt die niedrigste Masse bzw. den niedrigsten Gehalt („Grenzkonzentration“) einer Substanz an, die mit einem Verfahren noch zuverlässig identifiziert werden kann. Dabei wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 angenommen, was bedeutet, dass nur Signale, die mindestens dreimal so intensiv sind wie die Mittelwerte der Rausch-Signale, als eindeutig positiv gelten.

2.4.5 Selektivität

Definition: Die Selektivität gibt an, inwieweit eine analytische Methode für eine bestimmte Substanz in Gegenwart anderer Substanzen präzise und richtige Ergebnisse liefert. Die Summe der Begleitstoffe bezeichnet man als „Matrix“.

Es wurde die Selektivität der Übergänge untersucht. Hierzu wurden Lösungen der einzelnen Analyten AEA (25 pmol/ml), PEA und OEA (je 500 pmol/ml) mit den jeweiligen internen Standards hergestellt, vermessen und die Spuren der verschiedenen Übergänge auf störende Einflüsse verglichen.

2.4.6 Wiederfindung (*recovery*) des Analyten

Als Wiederfindung (engl. *recovery*) bezeichnet man das Verhältnis des Detektorsignals einer der Matrix zugesetzten Substanzmenge nach Probenaufbereitung zu dem Detektorsignal einer Substanzmenge in einer methanolischen Standardlösung. Die Wiederfindung wurde aus je drei Messungen bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Recovery [\%]} = \frac{\text{Mittlere Peakfläche der Matrixprobe}}{\text{Mittlere Peakfläche der Referenzlsg.}} \cdot 100$$

2.4.7 Stabilität

Zur Bestimmung der Stabilität wurden die gemessenen Konzentrationen der Untersuchungslösungen auf Abweichungen gegenüber Referenzlösungen untersucht.

Für die Bewertung wurde die relative Abweichung zur mittleren Ist-Konzentration der jeweils entsprechenden Referenzprobe herangezogen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Stabilität [\%]} = \frac{(\text{Mittlere Ist - Konz. der Untersuchungslsg.}) - (\text{Mittlere Ist - Konz. der Referenzlsg.})}{\text{Mittlere Ist - Konz. der Referenzlsg.}} \cdot 100$$

Grenzwerte lagen bei 10 % Abweichung für den oberen und mittleren Messbereich, 15 % für den unteren, an der Quantifizierungsgrenze liegenden Bereich.

2.4.7.1 Stabilität in Proben im Autosampler (engl. *autosampler stability*)

Drei Proben der jeweils höchsten und niedrigsten QC-Konzentration wurden aufbereitet, vermessen und nach Ablauf der maximal erwarteten Verweildauer im Autosampler nochmals vermessen.

2.4.7.2 Stabilität nach Einfrieren und Wiederauftauen (engl. *freeze thaw stability*) der Kalibrationslösungen

Drei Proben der jeweils höchsten und niedrigsten QC-Konzentration wurden aufbereitet, vermessen und anschließend erneut eingefroren. Nach ca. eineinhalb Monaten wurden die Proben nochmals aufbereitet und vermessen.

2.4.7.3 Stabilität nach Einfrieren und Wiederauftauen (engl. *freeze thaw stability*) des Probenmaterials

Fünf Serumproben wurden nach erstmaligem Auftauen aufbereitet und vermessen und anschließend erneut eingefroren. Nach ca. drei Monaten wurden die Proben nochmals aufbereitet und vermessen.

2.4.8 Qualitätssicherung während der Serumprobenmessung

Nach erfolgreicher Validierung konnte die Methode zur Konzentrationsbestimmung unbekannter Konzentrationen endogener Cannabinoiden im Serum eingesetzt werden. In jeder Messreihe wurden am Anfang und am Ende jeweils eine Kalibrierreihe sowie die Qualitätskontrollproben vermessen.

Die Messungen galten als verwertbar, wenn die Kalibriergeraden als geeignet gelten konnten (siehe Anforderungen aus Kapitel 2.4.2) und wenn für mindestens 2/3 der QCs galt:

- Abweichung vom Sollwert nicht über 20% an den Quantifizierungsgrenzen
- Abweichung vom Sollwert nicht über 15% für alle anderen Konzentrationen,

wobei nicht mehr als 50% aller QCs einer Konzentration außerhalb der Grenzen liegen dürfen. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, war die ganze Messreihe zu wiederholen.

2.4.9 Nachmessungen

Vereinzelt waren Nachmessungen nötig. In diesen Fällen waren die Substanzpeaks uneindeutig und z.T. stark überlagert von anderen Matrixbestandteilen. In einigen Fällen fehlte auch der interne Standard. Die Gründe dafür waren offensichtlich Fehler in der Aufbereitung. Bei der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Probenaufbereitung handelt es sich um eine Lipidextraktion. Die Extraktion mit Methanol und Chloroform hat sich hierbei zur Aufreinigung der Cannabinoide bewährt. Dennoch beinhaltet der gesamte Aufbereitungsprozess einige kritische Stellen, an denen die genaue Einhaltung des Aufbereitungsprotokolls unabdingbar ist, um die Verschleppung nicht erwünschter Matrixbestandteile in den finalen, zu vermessenden Extrakt zu vermeiden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung der mRNA

Das in Kapitel 2.2.3.2 gewonnene Zellpellet aus mononukleären Zellen wurde aufgetaut, bei Raumtemperatur in der Eppendorf Kühlzentrifuge 5402 mit 13000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde mit 1 ml Tripure® versetzt und mittels Ultraschallstab eine Minute bei 100 Watt homogenisiert. Das Tripure®-Reagenz erlaubt die Isolierung von totaler RNA, DNA und Protein der gleichen Probe in einer Flüssigphasentrennung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Die Suspension wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugesetzt, das Gemisch 15 Sekunden lang geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13000 x g für 15 Minuten. Der klare, wässrige Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert. Zur Proteinfällung wurden 500 µl Isopropanol zupipettiert und durch zweimaliges vorsichtiges Umkippen gemischt. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13000 x g für zehn Minuten, der Überstand wurde abpipettiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C und 7500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Es folgte ein 15 minütiges Trocknen an der Luft. Das Pellet wurde dann in 30 µl Aqua dem. + 0,1% (V/V) Diethylpyrocarbonat (DEPC, RNase Inhibitor) aufgenommen und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Diese Stammlösung wurde bis zur folgenden reversen Transkription bei -80 °C eingefroren.

2.5.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription diente dazu, die mRNA-Stränge aus Kapitel 2.5.1 mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase aus dem „avian myeloblastosis virus“ (RT AMV) in die entsprechende cDNA zu überführen. Erst diese cDNA kann mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) detektiert werden, RNA selbst ist durch PCR nicht zu vervielfältigen.

Das Reaktionsgemisch mit einem Endvolumen von 50 μ l setzte sich wie folgt zusammen:

10 μ l RNA (5 μ g)

1 μ l Hexaprimer (0,5 μ g)

10 μ l RT AMV Reaktionspuffer 5x

4 μ l Desoxynukleotidgemisch (dNTP)

1 μ l RT AMV (20 U)

1 μ l RNase Inhibitor (2,5 U)

23 μ l Aqua dem.

Die Ansätze wurden in 1,5 ml Eppendorf Gefäße pipettiert und für 1,5 Stunden auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden bei Raumtemperatur 5 μ l 0,2 % RNase A in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 zu jedem Ansatz zugesetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) der cDNA des CB1- bzw. CB2-Rezeptors und von β -Actin

Die einzelnen Stränge der gewonnenen cDNA lassen sich mittels PCR exponentiell vervielfältigen (amplifizieren), um sie dann durch einen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar zu machen und zu quantifizieren.

Ein Amplifikationszyklus besteht aus drei Teilprozessen und beginnt mit der Anlagerung von Primern bei 50 °C. Primer sind kurze, aus ca. 11 bis 35 Basen bestehende DNA-Oligonukleotide, die zu den Enden der zu vermehrenden cDNA komplementär sind. Sie dienen als Startsequenz. Im Folgenden wird durch die Zugabe hitzestabiler DNA-Polymerase bei 72 °C mit der Herstellung neuer Stränge begonnen. Die cDNA-Stränge dienen dabei als Vorlage. Danach erfolgt Denaturierung der DNA-Synthese-Doppelstrangprodukte durch kurzzeitiges Erhitzen auf 91 °C mit anschließendem Wiederabkühlen auf eine Temperatur zwischen 60 und 70°C. Dann folgt ein neuer Zyklus. Da in jedem Zyklus beide Stränge eines DNA-Moleküls als Vorlage genutzt werden, nimmt die Zahl der DNA-Moleküle im

Gesamtverlauf einer PCR exponentiell zu. Die Zahl steigt theoretisch um 2^n , wobei n die Zahl der Reaktionszyklen ist. Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt das verwendete Geräteprogramm

Die Reaktionsgemische für die PCR setzten sich wie folgt zusammen (Mengen gelten für 4 cDNA Proben):

4 μ l cDNA (aus Kapitel 2.5.2)

1 μ l *sense* Primer (CB1, CB2 oder β -Actin)

1 μ l *antisense* Primer (CB1, CB2 oder β -Actin)

2,5 μ l dNTP

5 μ l Taq Polymerase/Gelantine-Lösung

1,5 μ l $MgCl_2$ (50 mM)

30 μ l Aqua (demineralisiert)

Tabelle 5: Verwendetes Programm des Thermo cyclers für die PCR

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
94 °C, 1 min	94 °C, 1 min 56 °C, 1 min 72 °C, 1 min	72 °C, 3 min
	35 Zyklen	

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden in einer Konzentration von je 0,25 μM eingesetzt. Die folgende Tabelle 6 zeigt die verwendeten Primersequenzen.

Tabelle 6: Sequenz der verwendeten CB1-, CB2- und β -Actin-Primer des Menschen

mRNA-Art	sense Primer	antisense Primer
CB1 (Mensch)	5'-TGCAGGCCTTCCTACCACTTCATC-3'	5'-GACGTGTGGATGATGATGCTCTTC-3'
Die Primer für den CB1-Rezeptor des Menschen entsprechen Position 593-616 (sense) und 1090-1113 (antisense); Genbank X54937.		
CB2 (Mensch)	5'-GGAGAACGTGGCTGTGCTCTATCT-3'	5'-TGTAGATGATTCCGGAAAAGAGGA3'
Die Primer für den CB2-Rezeptor des Menschen entsprechen Position 273-296 (sense) und 725-748 (antisense); Genbank X74328.		
β-Actin (Mensch)	5'-GATGGTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'	5'-GCTCATTGCCGATAGTGATGACCT-3'
Die Primer für β -Actin des Menschen entsprechen Position 1457-1480 (sense) und 2529-2552 (antisense); genbank J00691.		

2.5.4 Agarose- Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch einen fluoreszierenden Farbstoff unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht.

Dazu wurde ein Agarose-Gel aus 1,3 % Agarose in 180 ml TAE-Puffer (pH 8,3) und 8 μl Ethidiumbromid gegossen, in das während der Erkaltungsphase zwei Probenkämme (einer an der Seite, einer in der Mitte des Gels) gesteckt wurden. Je 10 μl von jeder cDNA-Probe mit je 1 μl „Loading-Puffer“ wurden einmal in jeder Reihe in eine Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Tasche in jeder Reihe 1 μl DNA-Ladder mit 9 μl Aqua dem. und 1 μl „Loading-Buffer“ eingefüllt. Jede Probe wurde jeweils viermal aufgetragen. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei 120 Volt in einer mit

TAE-Puffer (pH 8,3) gefüllten Elektrophoresekammer. Das fertige Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen, auf einem UV-Tisch durchleuchtet und digital fotografiert. Die densitrometrische Auswertung der cDNA-Banden erfolgte mithilfe der Software Lumi-Analyst[®] 3.0.

2.6 Statistische Auswertung der Endocannabinoid- und mRNA-Rezeptorbestimmung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS® Version für Macintosh (SPSS Inc., Chicago, USA) und Microsoft Excel 2004 für Mac® (Microsoft Corp., Redmond, USA).

2.6.1 Deskriptive Statistik

Die Beschreibung des Datensatzes erfolgte mithilfe der im Folgenden dargelegten Lage- und Streuungsmaße.

Zu den Lagemaßen zählen arithmetrischer Mittelwert (\bar{x}) sowie der Median (\tilde{x}).

Zu den Streuungsmaßen zählen Standardabweichung (s), Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) und der Variationskoeffizient (engl. *coefficient of variation*, CV).

Die Berechnungen der einzelnen Parameter erfolgen nach den folgenden Formeln:

Arithmetrischer Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Median:

Der Median ist der Messwert der eine geordnete Reihe halbiert, sodass oberhalb und unterhalb dieses Messwertes gleich viele (50 %) der Messwerte liegen. Bei ungerader Anzahl an Messwerten ist der Median direkt abzulesen, bei gerader Anzahl liegt er zwischen den beiden zentralen Werten und ist dann der Mittelwert zwischen diesen beiden Werten.

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Variationskoeffizient:

$$CV [\%] = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

2.6.2 Beurteilende Statistik

2.6.2.1 Charakterisierung der unabhängigen Variable „Cannabiskonsum“

Die unabhängige Variable ist eine zweistufige, zugewiesene Variable, die nicht gezielt variiert wurde. Die zwei Stufen sind:

1. HFU („*high frequency user*“)
2. LFU („*low frequency user*“)

HFU sind operational definiert als Personen, die nach eigenen Aussagen mehr als zwanzig Mal im Leben Cannabis konsumiert haben, nicht aber in den letzten sechs Monaten. LFU sind operational definiert als Personen, die weniger als fünf Mal im Leben Cannabis konsumiert haben.

2.6.2.2 Charakterisierung der abhängigen Variablen

Bei den abhängigen Variablen handelt es sich zum einen um die gemessenen Cannabinoidkonzentrationen AEA, OEA und PEA in [pmol/ml] sowie um die bestimmten mRNA-Expressions-Level der CB1 und CB2-Rezeptoren, gemessen in [CB/ β -actin]. Die Messung der abhängigen Variablen erfolgte nach den in Kapitel 2.3.9. sowie Kapitel 2.5. beschriebene Verfahren.

2.6.2.3 Charakterisierung des Untersuchungsdesigns

Da die Zuordnung der Untersuchungsteilnehmer zu den Stufen der unabhängigen Variablen vorgegeben ist, handelte sich um eine quasi-experimentelle Untersuchung. Die Auswahl der Untersuchungsteilnehmer aus dem Gesamtkollektiv erfolgte zufällig.

Eine mögliche „Störvariable“ dieser quasi-experimentellen Untersuchung, also eine Variable, die mit den abhängigen Variablen neben der eigentlich interessierenden unabhängigen Variablen konfundiert sein könnte, ist die Variable „Nikotinkonsum“. Dieses Merkmal wurde vor der Untersuchung als möglicher beeinflussender Faktor identifiziert (siehe dazu Kapitel 1.2.5) und als zweistufige Kontrollvariable mit erhoben. Auch hier erfolgte die Zuordnung der Probanden zu den Stufen auf der Basis eigener Aussagen der Studienteilnehmer als „Raucher“ oder „Nichtraucher“.

2.6.2.4 Charakterisierung des Auswertungsverfahrens

Zur Auswertung der Untersuchung wurde eine getrennte „Kovarianzanalyse“ für jede abhängige Variable durchgeführt.

Die Kovarianzanalyse prüft folgende Hypothesen:

1. Die Messergebnisse der abhängigen Variablen AEA, OEA und PEA unterscheiden sich in den beiden Teilpopulationen „HFU“ und „LFU“ ($H_1: \mu_{HFU(AEA,OEA,PEA)} \neq \mu_{LFU(AEA,OEA,PEA)}$); $H_0: \mu_{HFU(AEA,OEA,PEA)} = \mu_{LFU(AEA,OEA,PEA)}$).
2. Die Messergebnisse der abhängigen Variablen CB1-mRNA-Expression der Teilpopulation „HFU“ sind größer als die CB1-mRNA-Expression der Teilpopulation „LFU“ ($H_1: \mu_{HFU(CB1-mRNA-Expression)} > \mu_{LFU(CB1-mRNA-Expression)}$); $H_0: \mu_{HFU(CB1-mRNA-Expression)} \leq \mu_{LFU(CB1-mRNA-Expression)}$). Die Messergebnisse der abhängigen Variablen CB2-mRNA-Expression der Teilpopulation „HFU“ sind größer als die CB2-mRNA-Expression der Teilpopulation „LFU“ ($H_1: \mu_{HFU(CB2-mRNA-Expression)} > \mu_{LFU(CB2-mRNA-Expression)}$); $H_0: \mu_{HFU(CB2-mRNA-Expression)} \leq \mu_{LFU(CB2-mRNA-Expression)}$).

Die Hypothesen basieren auf Literaturdaten, beschrieben in Kapitel 1.2.4.

Die Voraussetzungen für die Kovarianzanalyse zur Prüfung der Nullhypothesen auf Signifikanz sind:

- Normalverteilung der untersuchten Stichprobe
- Varianzhomogenität

Die Überprüfung der Normalverteilungsannahme erfolgte durch den Kolmogorov-Smirnov-Test, zur Prüfung auf Varianzhomogenität wurde der Levene-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau der gerichteten Hypothese wurde auf $p_{(\text{einseitig})} < 0,05$ festgelegt, das der ungerichteten Hypothese auf $p_{(\text{zweiseitig})} < 0,05/2 = 0,025$.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenvalidierung

3.1.1 Bestimmungsbereich und Linearität

Die Kalibrierstandards für die Validierung enthielten jeweils 25 pmol/ml d₄-AEA sowie 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA internen Standard sowie die in Tabelle 7 angegebenen Konzentrationen von AEA, OEA und PEA.

Tabelle 7: Konzentrationen von AEA, OEA und PEA in den Kalibrierlösungen

Kalibrierprobe	AEA [pmol/ml]	OEA [pmol/ml]	PEA [pmol/ml]
1	0	500	500
2	0	100	100
3	25	25	25
4	10	10	10
5	5	5	5
6	2,5	2,5	2,5
7	1,0	1,0	1,0
8	0,5	0,5	0,5
9	0,25	0,25	0,25
10	0,1	0,1	0,1
11	0,025	0,025	0,025
12	0	0	0

Zur Erhöhung der Güte der linearen Regression wurde eine Wichtung (1/x) durchgeführt. Die folgenden Abbildungen 12 bis 14 zeigen die einzelnen

Kalibriergeraden für AEA, OEA und PEA. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist in allen Fällen $> 0,99$ und zeigt somit ein sehr gutes Maß der Anpassung des mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte.

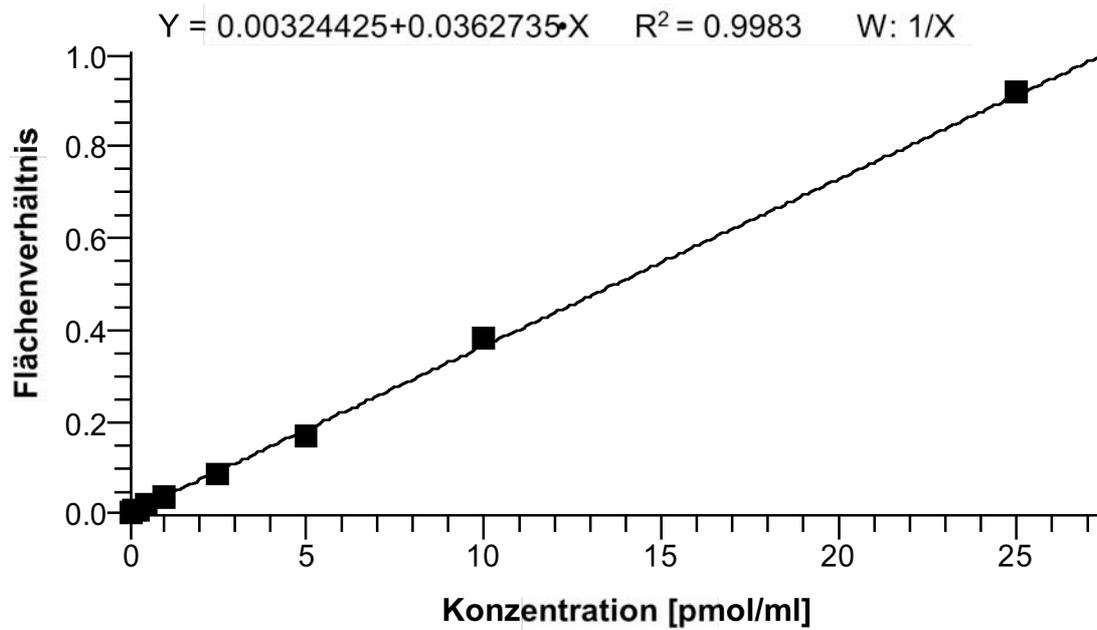


Abbildung 12: Kalibriergerade von Anandamid (AEA)

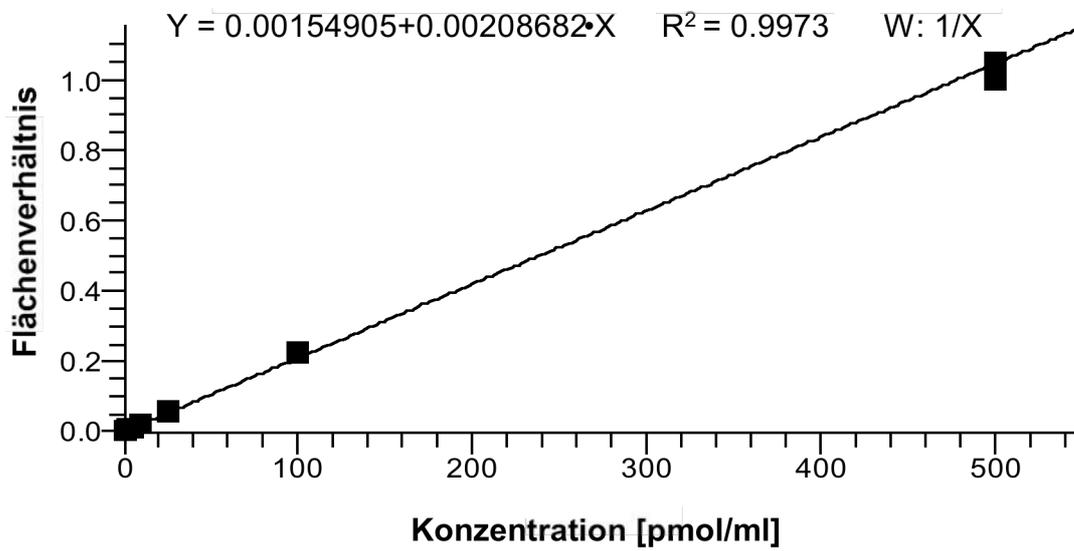


Abbildung 13: Kalibriergerade von Oleoylethanolamid (OEA)

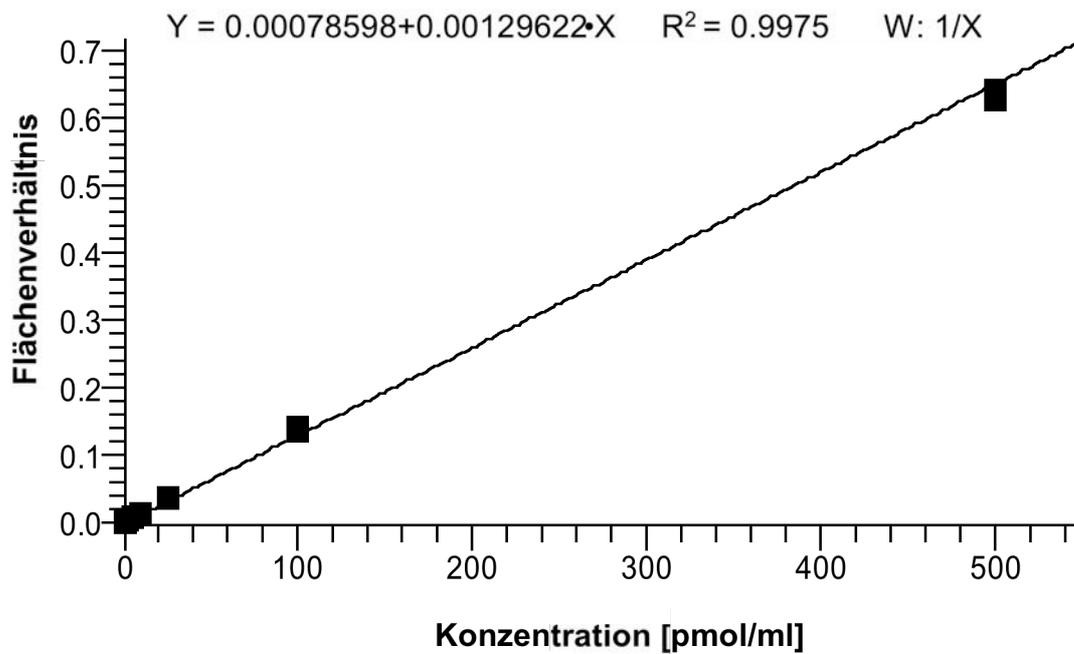


Abbildung 14: Kalibriergerade von Palmitoylethanolamid (PEA)

3.1.2 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit wurden Qualitätskontrollproben (QCs) mit den in Tabelle 8 angegebenen Konzentrationen hergestellt. Jede QC beinhaltete ebenfalls je 25 pmol/ml d₄-AEA, sowie 500 pmol/ml d₄-OEA und d₄-PEA als interne Standards.

Tabelle 8: Konzentrationen von AEA, OEA und PEA in den Qualitätskontrollproben

QC-Level	AEA [pmol/ml]	OEA [pmol/ml]	PEA [pmol/ml]
1	20	400	400
2	10	20	20
3	0,4	2,0	2,0
4	0,2	0,4	0,4

Gemäß den Angaben unter 2.4.3 wurde die Validierung von Präzision und Richtigkeit durchgeführt. Vier Proben der jeweiligen QC-Konzentrationen wurden aufbereitet und vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Ergebnisse zur Validierung der Präzision und Richtigkeit vier aufeinander gemessener gleicher Konzentration (Intraday-Analytik) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Interday-Analytik) für alle vier QC- Level von AEA, OEA und PEA

Analyt	QC-Level	Intraday-Analyse		Interday-Analyse	
		CV [%]	RE [%]	CV [%]	RE [%]
AEA	QC1	1,3	12,2	4,0	10,6
	QC2	2,8	0,8	2,2	0,9
	QC3	7,7	8,7	7,0	6,7
	QC4	3,4	3,3	12,9	3,1
OEA	QC1	0,4	3,9	1,1	3,6
	QC2	0,6	-4,0	1,7	-3,2
	QC3	6,2	2,6	13,3	8,6
	QC4	3,1	0,9	4,5	0,4
PEA	QC1	0,7	5,6	1,5	5,0
	QC2	2,3	2,2	3,3	1,8
	QC3	5,3	14,1	13,7	15,8
	QC4	15,2	-0,3	15,6	0,7

Außer dem QC3-Level von PEA entsprachen alle QC-Levels der in Kapitel 2.4.3.3 geforderten Kriterien für Präzision und Richtigkeit.

3.1.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Nach erfolgreicher Validierung von Präzision und Richtigkeit ergaben sich folgende Bestimmungsgrenzen (engl. *limit of quantification, LLOQ*):

Anandamid (AEA):	0,2 pmol/ml
Oleoylethanolamid (OEA):	0,4 pmol/ml
Palmitoylethanolamid (PEA):	0,4 pmol/ml

Aus der Vermessung der Kalibrationsreihen aus Kapitel 3.1.1 ergaben sich folgende Nachweisgrenzen (engl. *limit of detection*):

Anandamid (AEA):	0,025 pmol/ml
Oleoylethanolamid (OEA):	0,1 pmol/ml
Palmitoylethanolamid (PEA):	0,1 0mol/ml

3.1.4 Selektivität

Die folgenden Abbildungen zeigen die Chromatogramme der einzelnen Analyten AEA, PEA und OEA mit den jeweiligen internen Standards. Bis auf ein gewöhnliches Rauschen zeigen sich keine störenden Einflüsse auf den jeweils anderen Spuren.

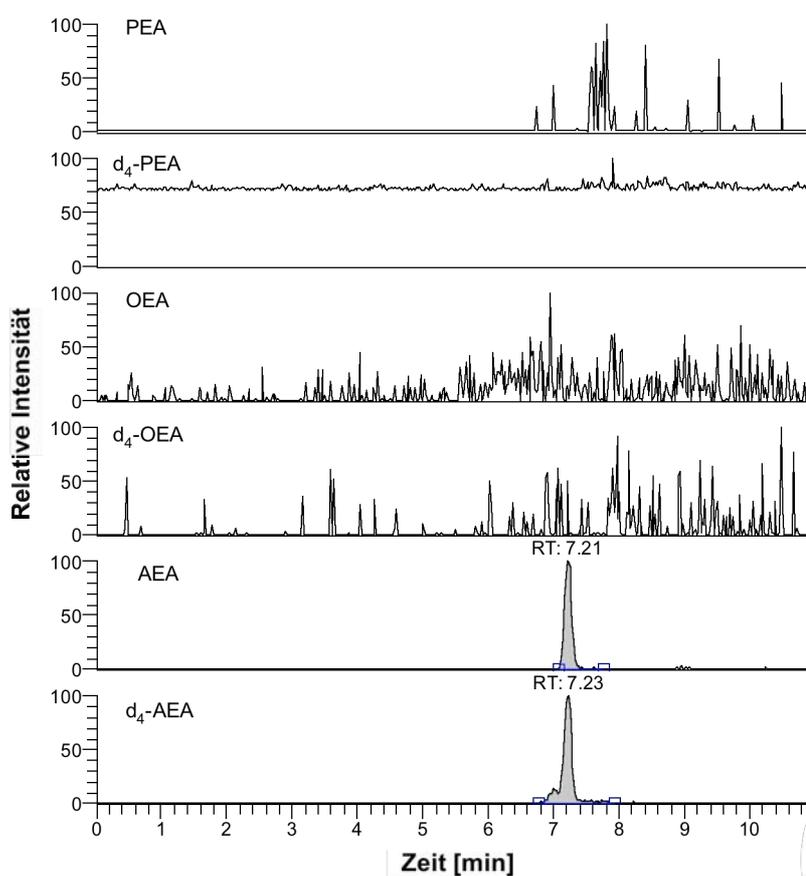


Abbildung 15: Selektivität des Übergangs von Anandamid (Beispielkalibrierkonzentration: je 25 pmol/ml AEA und d₄-AEA)

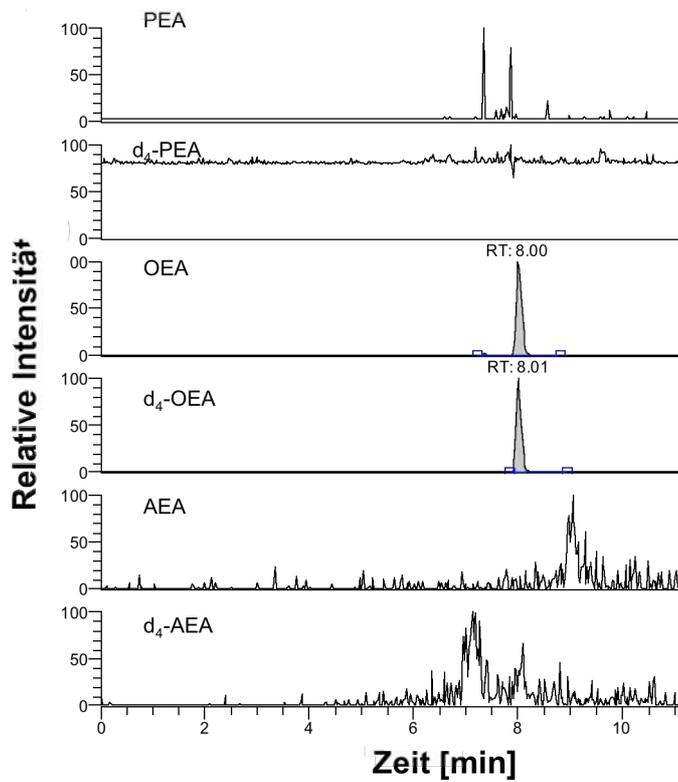


Abbildung 16: Selektivität des Übergangs von Oleoylethanolamid (Beispielkalibrierkonzentration: 25 pmol/ml OEA und 500 pmol/ml d₄-OEA)

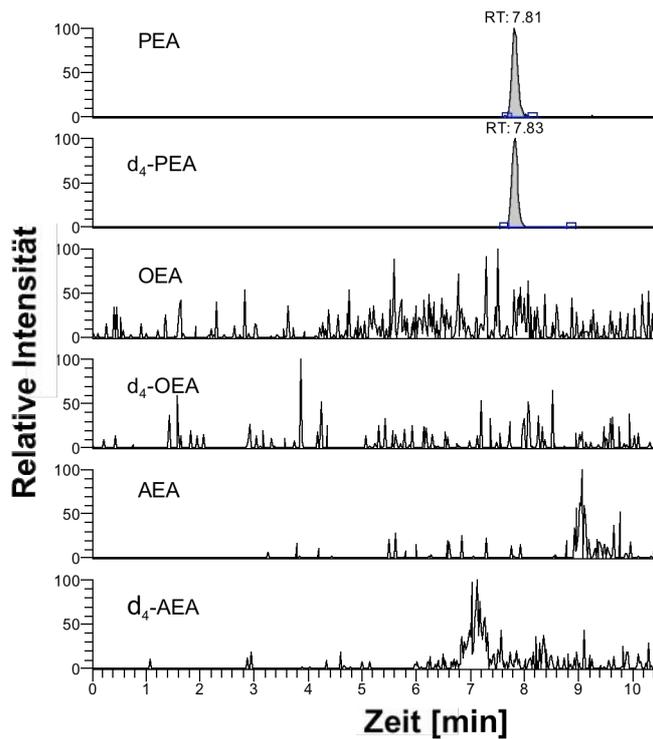


Abbildung 17: Selektivität des Übergangs von Palmitoylethanolamid (Beispielkalibrierkonzentration: 25 pmol/ml PEA und 500 pmol/ml d₄-PEA)

3.1.5 Wiederfindung der Analyten im Serum

Die Ergebnisse der nach Kapitel 2.4.6 durchgeführten Wiederfindungsuntersuchung sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 10: Mittlere Wiederfindung (*recovery*) der Analyten AEA, OEA und PEA im Serum in [%] (aus n=3)

Analyt	Niedriges Level (2,5 pmol/ml)	Mittleres Level (10 pmol/ml)	Hohes Level (25 pmol/ml)
AEA in [%]	92	93	99
OEA in [%]	76	82	99
PEA in [%]	98	91	98

3.1.6 Stabilität

3.1.6.1 Stabilität von Proben im Autosampler (engl. *autosampler stability*)

Die Proben QC1 und QC4 wurden nach fünftägiger Lagerung im Autosampler bei 5 °C erneut vermessen und erbrachten die in Tabelle 11 aufgelisteten Konzentrationsveränderungen gegenüber den direkt nach Aufbereitung vermessenen Proben.

Tabelle 11: Stabilitätsuntersuchung von AEA, PEA und OEA nach fünftägiger Probenlagerung im Autosampler bei 5°C

Autosampler-Stabilität	QC-Level	
	QC1	QC4
Mittlere Abweichung der AEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-6,3	-14,7
Mittlere Abweichung der PEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-2,3	-15,0
Mittlere Abweichung der OEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	1,4	2,8

3.1.6.2 Stabilität nach Einfrieren und Wiederauftauen (engl. *freeze thaw stability*) der Qualitätskontrollproben (QCs)

Die Überprüfung der Stabilität, nachdem die Proben nach der ersten Vermessung für ca. drei Monate erneut bei -20 °C gelagert wurden, ergab die in Tabelle 12 aufgelisteten mittleren Konzentrationsänderungen gegenüber der ersten frischen Vermessung.

Tabelle 12: Stabilitätsuntersuchung von AEA, PEA und OEA nach erneuter dreimonatiger Lagerung bei -20 °C und anschließendem Wiederauftauen und Vermessen

Freeze/Thaw-Stabilität der QCs	QC-Level	
	QC1	QC4
Mittlere Abweichung der AEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-7,0	-9,1
Mittlere Abweichung der PEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-2,8	-12,7
Mittlere Abweichung der OEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-0,5	3,1

3.1.6.3 Stabilität nach Einfrieren und Wiederauftauen (engl. *freeze thaw stability*) des Probenmaterials

Zur Überprüfung der Serumprobenstabilität nach einem Einfrierzyklus wurden fünf Serumproben aufbereitet und vermessen und dann erneut eingefroren. Nach ca. zwei Monaten erfolgte eine erneute Aufbereitung und Vermessung, dabei zeigten sich die in Tabelle 13 dargestellten mittleren Konzentrationsveränderungen.

Tabelle 13: Stabilitätsuntersuchung von AEA, PEA und OEA in Serumproben nach einem Auftau/Einfrierzyklus

Freeze/Thaw-Stabilität der Proben	Serumproben-Nummer				
	1	2	3	4	5
Mittlere Abweichung der AEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-44,3	-50,5	-77,2	-27,2	-53,2
Mittlere Abweichung der PEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-37,8	-56,9	-28,8	-18,6	-88,0
Mittlere Abweichung der OEA -Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-62,3	-67,6	-61,4	-30,1	-70,7

3.1.7 Gesamtergebnis der Methodvalidierung

Die Ergebnisse der Validierung entsprachen den in Kapitel 2.4 angeführten Kriterien. Somit konnte die Methode zur Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen in den Serumproben zeigten jedoch, dass es zu einem erheblichen Verlust der Analyten führt, wenn die Proben erneut eingefroren und nach einer gewissen Lagerzeit erneut aufgetaut, aufbereitet und vermessen werden. Aus diesem Grund wurden die Proben des Studienkollektivs zu je 1 ml (mit etwas Überschuss) aliquotiert und eingefroren, um ein doppeltes Einfrieren per se auszuschließen.

3.2 Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum

Die Serumproben wurden zur Vermessung wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben aufbereitet. Während der Messung wurden alle Vorgaben zur Qualitätssicherung nach Kapitel 2.4.8 eingehalten.

Die Abbildung 18 zeigt ein typisches Probandenchromatogramm.

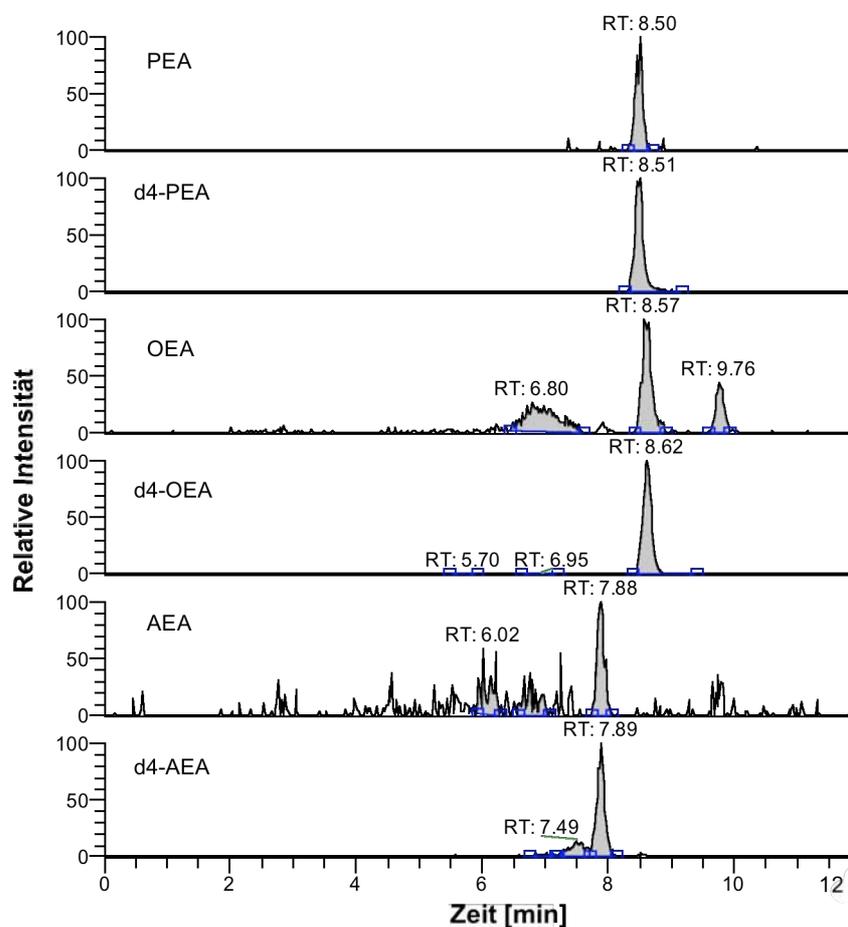


Abbildung 18: Beispielchromatogramm einer Serumprobe

3.2.1 Messergebnisse der Konzentrationsbestimmung von AEA, PEA und OEA mittels LC-MS/MS

Die Vermessung der Serumproben erfolgte nach dem in Kapitel 2.3.9. beschriebenen Verfahren. Tabelle 14 zeigt die Messergebnisse von AEA, OEA und PEA im Serum der 28 Probanden des Studienkollektivs. Alle Konzentrationen lagen innerhalb der Kalibrationsbereiche (siehe Kapitel 3.1.1.).

Tabelle 14: Endocannabinoidkonzentrationen im Serum in [pmol/ml], n.d. = nicht detektierbar

Gruppe	Probanden-Nr.	AEA [pmol/ml]	PEA [pmol/ml]	OEA [pmol/ml]
A	1	n.d.	60,183	6,412
	2	1,910	56,440	6,370
	3	2,698	57,650	6,023
	4	2,480	59,847	4,226
	5	2,438	77,041	9,167
	6	1,009	42,572	5,371
B	7	1,254	59,130	5,627
	8	1,292	40,027	6,074
	9	1,211	11,229	5,093
	10	1,037	25,065	4,539
	11	2,215	50,309	4,763
	12	0,609	55,433	3,281
	13	1,991	44,007	7,953
	\bar{x}	1,679	49,149	5,761
C	14	0,628	26,629	2,515
	15	0,581	11,679	2,727
	16	0,857	26,395	4,062
	17	0,444	10,174	2,786
	18	0,497	25,745	2,674
	19	1,294	26,321	2,750
	20	2,055	63,856	8,212
	21	1,095	36,697	3,514
D	22	0,479	3,069	2,935
	23	0,956	8,030	6,827
	24	0,819	6,747	3,921
	25	0,566	3,301	3,762
	26	0,660	4,987	4,246
	27	0,893	5,104	3,972
	28	1,343	9,935	5,216
	\bar{x}	0,879	17,911	4,008

3.2.2 Statistische Datenauswertung und graphische Darstellung der Cannabinoidbestimmungen

Für alle drei untersuchten abhängigen Variablen können die Voraussetzungen für die Kovarianzanalyse als erfüllt angesehen werden, da sowohl der Kolmogoroff-Smirnov-Test auf Normalverteilung als auch der Levene-Test auf Varianzhomogenität kein signifikantes Ergebnis zeigten.

3.2.2.1 Anandamid (AEA)

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprechen dafür, die Nullhypothese zu verwerfen. Die AEA-Konzentrationen der HFU („*high frequency user*“) unterschieden sich signifikant von denen der LFU („*low frequency user*“) ($p < 0,001$). Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis ($p = 0,075$).

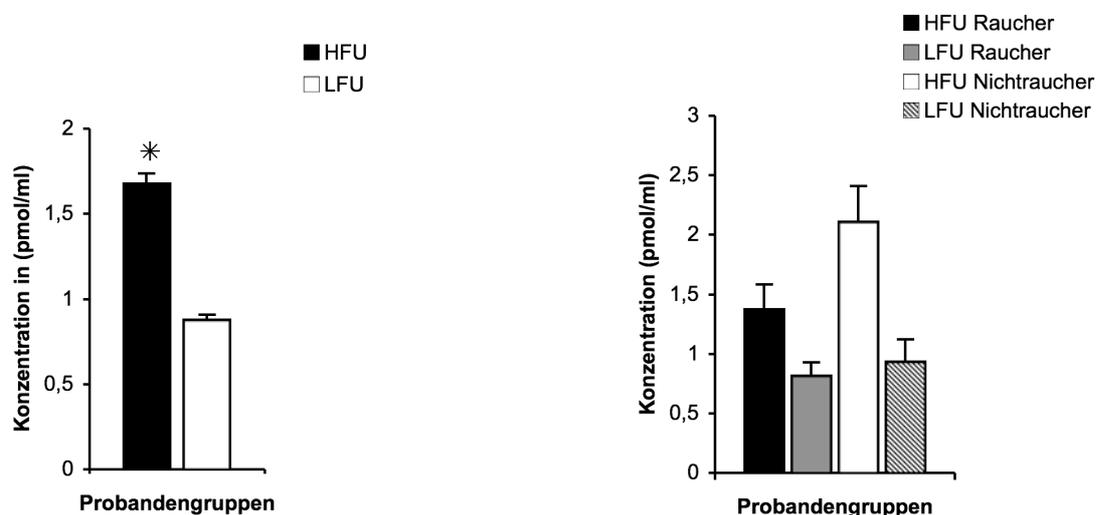


Abbildung 19: Mittlere AEA-Konzentrationen der untersuchten Probandengruppen

3.2.2.2 Oleoylethanolamid (OEA)

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprechen dafür, die Nullhypothese zu verwerfen. Die OEA-Konzentrationen der HFU („*high frequency user*“) unterschieden sich signifikant von denen der LFU („*low frequency user*“) ($p=0,009$). Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis ($p=0,968$).

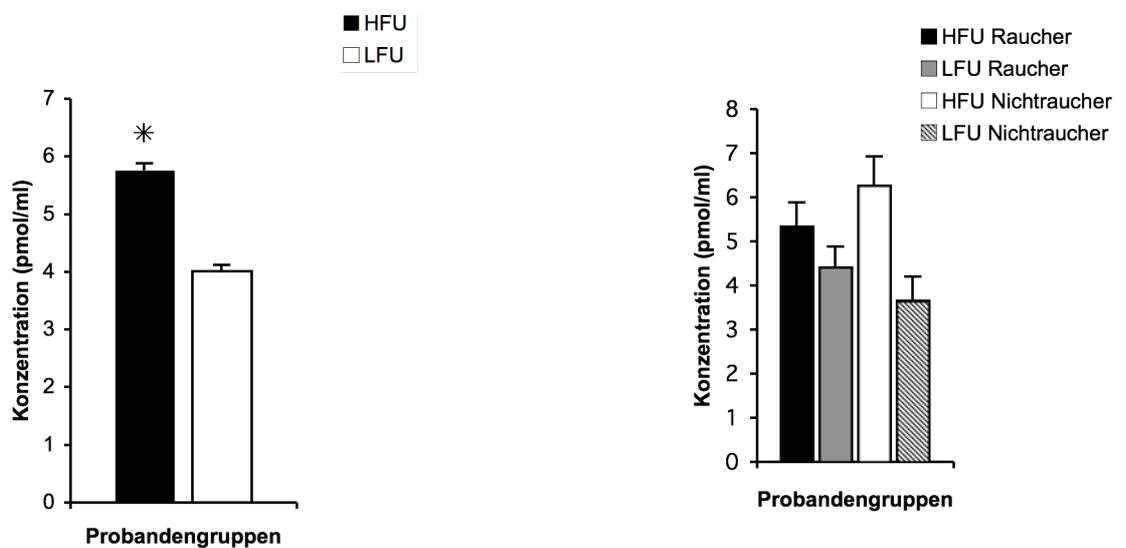


Abbildung 20: Mittlere OEA-Konzentrationen in pmol/ml der untersuchten Probandengruppen

3.2.2.3 Palmitoylethanolamid (PEA)

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprechen dafür, die Nullhypothese zu verwerfen. Die PEA-Konzentrationen der HFU („*high frequency user*“) unterschieden sich signifikant von denen der LFU („*low frequency user*“) ($p < 0,001$). Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte hier zudem einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis ($p < 0,001$).

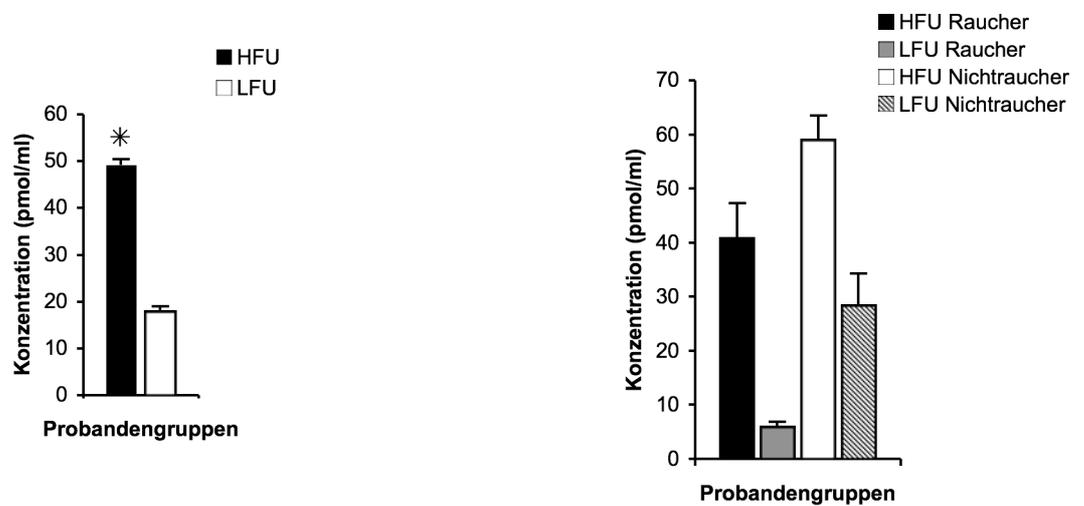


Abbildung 21: Mittlere PEA-Konzentrationen in pmol/ml der untersuchten Probandengruppen

3.3 Bestimmung der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression

Die Proben wurden wie in Kapitel 2.5 beschrieben aufbereitet und bestimmt.

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Transkription der CB1- und CB2-mRNA wurde nach densitometrischer Auswertung aller Banden mithilfe der Software Lumi-Analyst® der Quotient aus den Flächen der CB1- und CB2-Rezeptorbanden mit denen der zugehörigen β -Actin-Banden gebildet. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in der Abbildung 22 beispielhaft dargestellt. Die Beschriftung entspricht einer willkürlichen, fortlaufenden Nummerierung der Proben im molekularbiologischen Labor.

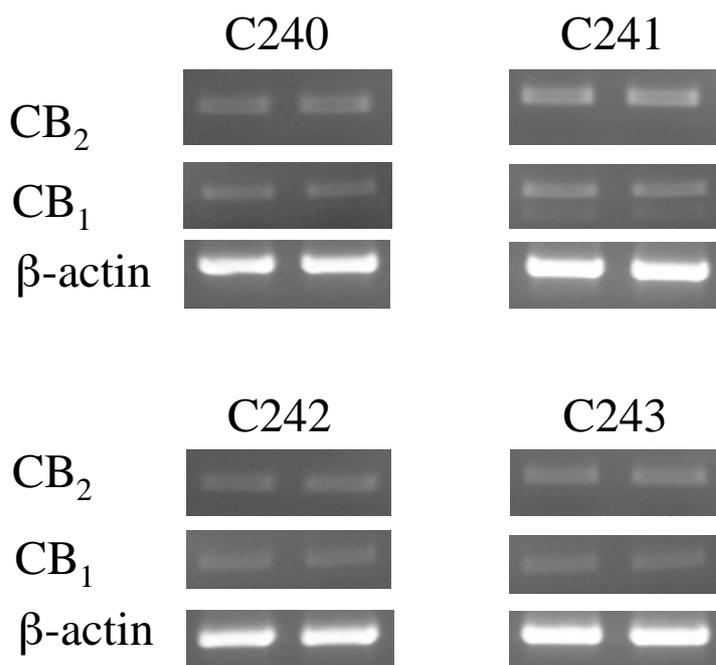


Abbildung 22: cDNA-Banden des CB1- und CB2-Rezeptors und von β -Actin für vier Proben. Die Amplifikation des CB1-Rezeptors entsprach 520 bp, die Amplifikation des CB2-Rezeptors entsprach 475 bp und die Amplifikation von β -Actin entsprach 650 bp. bp = Basenpaare

3.3.1 Messergebnisse der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression

Tabelle 15 zeigt die Messergebnisse der CB-Rezeptor-mRNA-Expression weisser Blutzellen der 28 Probanden des Studienkollektivs.

Tabelle 15: CB-mRNA-Expression in [CB/ β -actin] \pm SEM (N = Anzahl der Bestimmungen)

Gruppe	Probanden-Nr.	CB1/ β -actin \pm SEM	N	CB2/ β -actin \pm SEM	N
A	1	0,391 \pm 0,054	6	0,385 \pm 0,024	6
	2	0,362 \pm 0,085	6	0,389 \pm 0,054	6
	3	0,129 \pm 0,012	6	0,365 \pm 0,019	6
	4	0,172 \pm 0,020	4	0,360 \pm 0,019	4
	5	0,193 \pm 0,036	4	0,323 \pm 0,048	4
	6	0,304 \pm 0,118	4	0,443 \pm 0,015	4
B	7	0,272 \pm 0,083	6	0,416 \pm 0,058	6
	8	0,496 \pm 0,103	6	0,493 \pm 0,145	6
	9	0,189 \pm 0,066	6	0,296 \pm 0,042	6
	10	0,348 \pm 0,010	4	0,501 \pm 0,016	4
	11	0,324 \pm 0,033	4	0,333 \pm 0,022	4
	12	0,282 \pm 0,049	4	0,402 \pm 0,030	4
	13	0,469 \pm 0,012	4	0,359 \pm 0,009	4
	\bar{X}	0,302		0,390	
C	14	0,200 \pm 0,017	6	0,289 \pm 0,007	6
	15	0,317 \pm 0,049	6	0,335 \pm 0,016	6
	16	0,447 \pm 0,086	6	0,417 \pm 0,130	6
	17	0,339 \pm 0,008	6	0,341 \pm 0,050	6
	18	0,320 \pm 0,060	6	0,217 \pm 0,060	6
	19	0,214 \pm 0,050	6	0,216 \pm 0,019	6
	20	0,138 \pm 0,033	6	0,225 \pm 0,055	6
	21	0,163 \pm 0,011	6	0,287 \pm 0,046	6
D	22	0,275 \pm 0,020	6	0,318 \pm 0,049	6
	23	0,340 \pm 0,053	6	0,378 \pm 0,040	6
	24	0,131 \pm 0,007	6	0,169 \pm 0,017	6
	25	0,229 \pm 0,039	4	0,231 \pm 0,076	4
	26	0,210 \pm 0,027	4	0,186 \pm 0,006	4
	27	0,235 \pm 0,030	4	0,219 \pm 0,003	4
	28	0,201 \pm 0,010	4	0,191 \pm 0,007	4
		\bar{X}	0,251		0,268

3.3.2 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Cannabinoid-Rezeptor-mRNA-Expression

Für beide untersuchten abhängigen Variablen können die Voraussetzungen für die Kovarianzanalyse als erfüllt angesehen werden, da sowohl der Kolmogoroff-Smirnov-Test auf Normalverteilung sowie der Levene-Test auf Varianzhomogenität kein signifikantes Ergebnis zeigten.

3.3.2.1 CB1-Rezeptor-mRNA-Expression

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprechen dafür, die Nullhypothese beizubehalten. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der CB1-mRNA-Expression zwischen HFU („*high frequency user*“) und LFU („*low frequency user*“) ($p=0,203$). Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis ($p=0,631$).

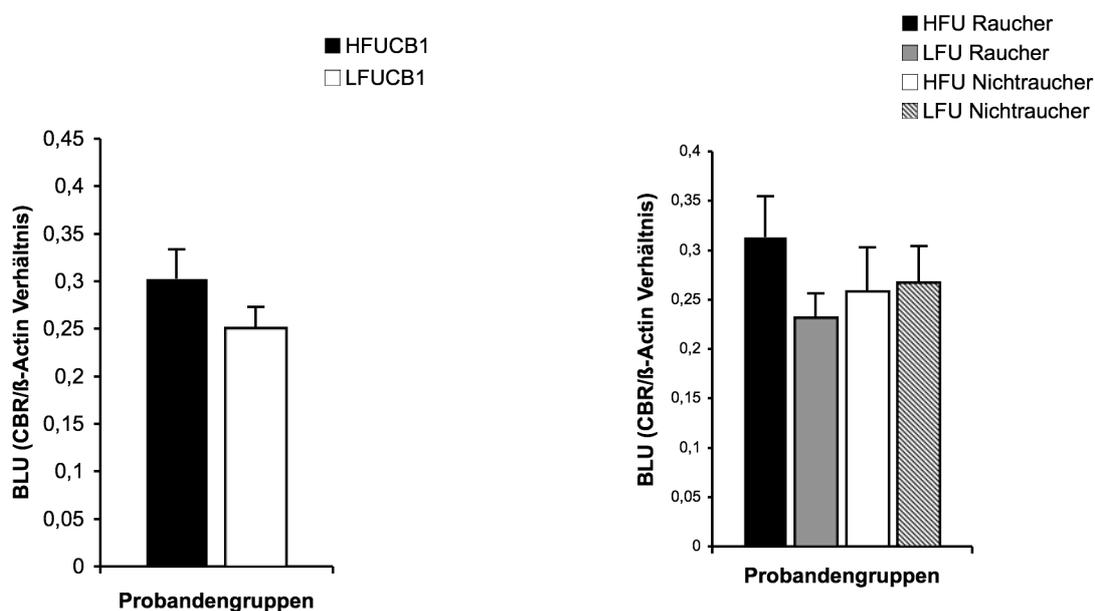


Abbildung 23: Mittlere mRNA-Konzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$ aus 4 bzw. 6 verschiedenen PCR-Experimenten) des CB1-Rezeptors der untersuchten Probandengruppen in peripheren Blutzellen. BLU = Boehringer Light Unit, CBR = Cannabinoid-Rezeptor

3.3.2.2 CB2-Rezeptor-mRNA-Expression

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprechen dafür die Nullhypothese zu verwerfen. Es zeigt sich eine signifikant höhere CB2-mRNA-Expression bei den HFU („high frequency user“) gegenüber den LFU („low frequency user“) ($p < 0,001$). Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis ($p = 0,540$).

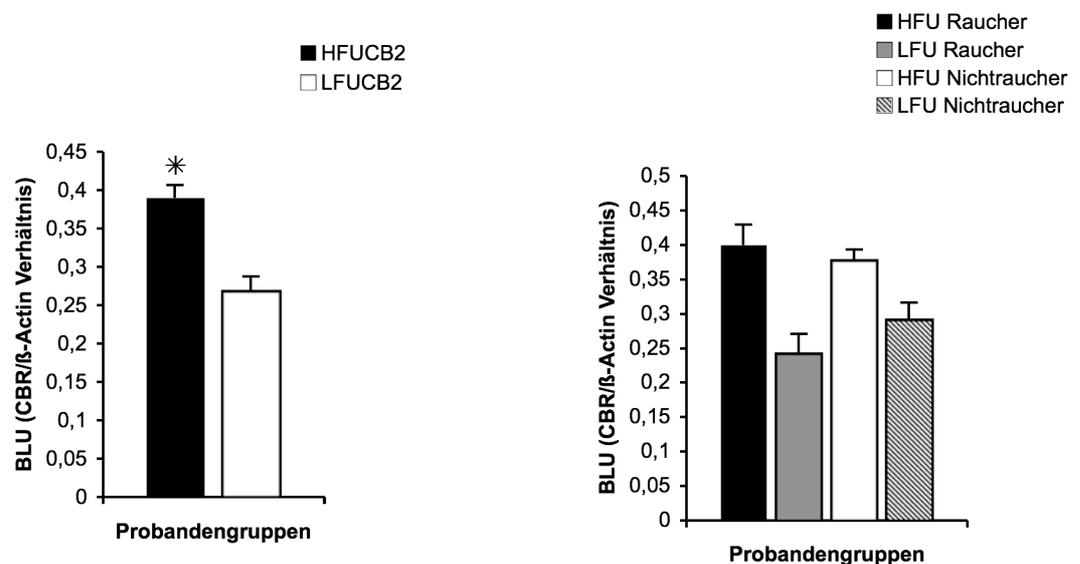


Abbildung 24: : Mittlere mRNA-Konzentrationen ($\bar{x} \pm$ SEM aus 4 bzw. 6 verschiedenen PCR-Experimenten) des CB2-Rezeptors der untersuchten Probandengruppen in peripheren Blutzellen. BLU = Boehringer Light Unit, CBR = Cannabinoid-Rezeptor

4 Diskussion

Das endogene Cannabinoidsystem und die Aufklärung seiner molekularen, endogenen Prozesse haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Nach der Identifizierung der Cannabinoid-Rezeptoren, CB1 und CB2, sowie der chemischen Charakterisierung verschiedener endogener Liganden in den 1990er Jahren steht nun vor allem die Untersuchung der physiologischen und pathologischen Relevanz dieses neuen Signalsystems im Vordergrund. Da die Konzentrationen der endogenen Liganden vor allem in Körperflüssigkeiten extrem niedrig sind (pmol/ml-Bereich), bedarf es sehr empfindlicher und selektiver Methoden zur quantitativen Analyse. Die Verbesserung der Detektionsmöglichkeiten für die konventionelle HPLC-Analytik in den letzten zehn Jahren bietet heute durch den Einsatz massenspektrometrischer Techniken die Möglichkeit, Methoden mit hoher Selektivität und Sensitivität zu entwickeln (z.B. Quadrupol-Systeme).

In dieser Arbeit wurde eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung endogener Cannabinoide in humanem Serum entwickelt. Nach erfolgreicher Validierung wurde im Rahmen einer Studie der Einfluss von Cannabiskonsum auf die Endocannabinoidkonzentrationen untersucht. Des Weiteren untersuchten wir mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) die mRNA-Expression der CB-Rezeptoren. Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der physiologischen und pathologischen Relevanz des Endocannabinoidsystems im zirkulierenden, peripheren Blutkreislauf sowie speziell im Immunsystem diskutiert.

4.1 LC-MS/MS-Methodenvalidierung zur Quantifizierung endogener Cannabinoide im Serum

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine neue LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der endogenen Cannabinoide AEA, OEA und PEA entwickelt. Die Validierung dieser Analytik orientierte sich an den Internationalen Richtlinien für analytische Validierungsprozesse (CPMP/ICH/281/95 1996; CPMP/ICH/381/95 1994; FDA 2001; Shah et al. 1991).

Ziel der Entwicklung und Validierung der LC-MS/MS-Analytik war eine sensitive und vor allem zeitsparende Methode zur Bestimmung der endogenen Fettsäureethanolamide im Serum. Sowohl GC/MS, HPLC/MS als auch LC-MS/MS-Methoden sind zwar bereits beschrieben, die existierenden Methoden erreichen aber kaum die erforderlichen Quantifizierungsgrenzen und sind zudem sehr zeitaufwändig. In der vorliegenden Arbeit gelang es, ein Verfahren mit einer Chromatographie von zwölf Minuten pro Probe gegenüber Laufzeiten von bis zu 40 Minuten existierender Verfahren zu entwickeln. Es ist uns zudem mit dieser Methode gelungen, Bestimmungsgrenzen von 0,2 pmol/ml für AEA und 0,4 pmol/ml für PEA und OEA zu erzielen. Dies sind solide Grenzen für eine robuste Bestimmung der Analyten im Serum, die deutlich unterhalb der Grenzen bestehender massenspektrometrischer Verfahren liegen (Giuffrida und Piomelli 1998a; Giuffrida et al. 2000; Kingsley und Marnett 2003; Koga et al. 1997).

Die Probenaufbereitung wurde an die von Giuffrida und Piomelli entwickelten Extraktionstechniken von Fettsäureethanolamiden in biologischen Flüssigkeiten angelehnt (Giuffrida und Piomelli 1998b). Es handelt sich dabei um eine aufwendige Lipidextraktion, die aber aus verschiedenen Gründen unumgänglich ist. Da mit Serumproben gearbeitet wird, befinden sich extrem viele, die Analytik störende, Begleitstoffe in der Matrix, die eliminiert werden müssen. Die Proteinpräzipitation wird zu Beginn der Aufbereitung durch Zugabe von Aceton erreicht, in der folgenden Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform und Methanol werden dann die vielen hydrophilen Matrixbestandteile abgetrennt. Die zwei in der Prozedur enthaltenen Eindampfungsschritte dienen der Aufkonzentrierung und sind aufgrund der extrem niedrigen Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen unabdingbar. Weiterhin ist bei der Probenaufbereitung wie auch schon bei der Probengewinnung der Kontakt mit Kunststoffen zu vermeiden bzw. so gering wie möglich zu halten, da es zur Adsorption an das Plastik kommen kann und somit zum Verlust der Analyten. Daher wird bei der gesamten Aufbereitung ausschließlich mit Glasmaterialien gearbeitet. Bei der Blutentnahme ist auf kurze Kontaktzeiten, sprich umgehende Zentrifugation und sofortiges Aliquotieren und Einfrieren bei -80 °C zu achten. Ein Nachteil dieser aufwendigen Probenaufbereitung ist neben dem Zeitaufwand der Verlust der Fettsäureethanolamide, die es zu bestimmen gilt. Durch die Anwendung der Isotopenverdünnungs-Methodik (*isotope dilution assay*), also der Zugabe interner,

markierter Standards, konnte jedoch eine exakte Quantifizierung gewährleistet werden. Sichtbar wurde der Analytenverlust während der Aufarbeitung in der bei durchschnittlich nur bei 50 % liegenden absoluten *recovery* aller drei Substanzen. Diese Effekte wurden allerdings durch die internen Standards egalisiert, sodass die relative *recovery*, also das Verhältnis der analytischen Wiederfindung von Analyt und internem Standard, insgesamt zwischen 80 % und 100 % lag. Die absolute *recovery* ist zwar etwas niedriger als in anderen Verfahren, die relative *recovery* hingegen liegt jedoch in den gewünschten Grenzen und ist weit höher als in vorherigen Untersuchungen. Die Gruppe von Koga erreichte nur eine relative *recovery* zwischen 67 und 73 % für AEA, die Gruppe von Kingsley erreichte sogar nur eine relative *recovery* von 51 bis 82 % für AEA (Kingsley und Marnett 2003; Koga et al. 1997; Maccarrone et al. 2001).

Aufkonzentrierung und Aufreinigung durch diese Extraktionsschritte überwiegen also im Ergebnis insgesamt dem Nachteil des Probenverlustes, sodass sich das verwendete Probenaufbereitungsverfahren als geeignet erwiesen hat. Die Probenaufbereitung bietet dennoch Optimierungsspielraum zur Erreichung einer besseren absoluten *recovery* und damit noch niedrigerer Quantifizierungsgrenzen wie zum Beispiel für die Analytik von Cerebrospinalflüssigkeit, deren Endocannabinoidkonzentrationen nochmals um den Faktor 10 bis 100 niedriger liegen und in bisherigen Untersuchungen nur außerhalb der Quantifizierungsgrenzen bestehender Methoden gemessen werden konnten (Giuffrida et al. 2004).

Die Messbereiche wurden nach den zu erwartenden Konzentrationen gewählt. Dazu wurden bisher nicht veröffentlichte Serumdaten - gemessen mittels HPLC/MS in Kooperation mit der University of California, Irvine, USA - herangezogen. Für alle drei Analyten erwiesen sich die Messbereiche als adäquat. Die Linearität konnte gezeigt werden, alle QC-Konzentrationen konnten mit einer einzigen Ausnahme im Rahmen der erlaubten Variabilität quantifiziert werden. Die Richtigkeit von 15,8 % bei QC3-Level von PEA in der Interday-Analyse wich um 0,8 % von den geforderten 15 % ab. Dies kann jedoch für Anwendung des Verfahrens zur Serumkonzentrationsbestimmung unter Einbeziehung der zu erwartenden und schließlich auch gemessenen deutlich höheren PEA-Konzentrationen akzeptiert werden.

Die Analysenzeit pro Probe konnte mit dieser Methode stark verkürzt werden. Obwohl alle drei Peaks innerhalb kürzester Zeit nacheinander eluiert werden, sind sie doch vollständig chromatographisch getrennt, außerdem gewährt die Selektivität der Übergänge solide Messergebnisse. Das Beispielchromatogramm in Kapitel 2.3.5 zeigt die saubere Auftrennung der Substanzpeaks und ihrer jeweiligen internen Standards mit den mittleren Retentionszeiten von 6,8 Minuten für AEA, 7,4 Minuten für PEA und 7,6 Minuten für OEA neben gewöhnlichem Rauschen.

Bei der Untersuchung der Stabilität konnten alle QC-Level sowohl bei der Bestimmung der Autosamplerstabilität als auch bei der *freeze thaw* Stabilität, also der Stabilität beim erneuten Einfrieren und Auftauen der QC-Proben, im Rahmen der erlaubten Variabilität quantifiziert werden. Erstaunliche und bisher aus anderen Veröffentlichungen nicht bekannte Ergebnisse erbrachte die Untersuchung der *freeze thaw* Stabilität des Probenmaterials (Serum) nach einem Einfrierzyklus. Wir konnten mittlere Abweichungen aller Analyt-Konzentrationen zwischen -18 % bis hin zu -88 % feststellen. Schon ein einziger Auftau-Einfrierzyklus führte also zu Verlusten in den absoluten Analytkonzentrationen. Für unsere Probenaufbereitung bedeutete dieses Ergebnis, dass eine Aliquotierung der benötigten Probenmenge Serum (1 ml) direkt nach der Gewinnung notwendig war. Damit erfolgte kein erneutes Auftauen derselben Probe und valide Ergebnisse waren gewährleistet. In keiner der bereits beschriebenen Messmethoden wurde dieses Phänomen bisher angesprochen, sodass man die Validität der Messergebnisse bzw. zumindest die Probenhandhabung hinterfragen muss. Diese extreme Instabilität der Analyten im Probenmaterial muss bei zukünftigen Untersuchungen beachtet und in die Probenhandhabung einbezogen werden, um valide Ergebnisse zu produzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es uns zum ersten Mal, ein Verfahren zu entwickeln, das sich im Vergleich mit bisher existierenden Methoden durch eine höhere Sensitivität sowie bessere relative *recovery* auszeichnet und das durch optimierte Probenhandhabung und Aufbereitung valide Messergebnisse für die Endocannabinoidbestimmung im Serum garantiert. Die Stabilitätsdaten unterstreichen, welchen Stellenwert eine sorgfältige Probenhandhabung für die Qualität der Analyseergebnisse hat.

4.2 Endogene Cannabinoidkonzentrationen im Serum von Cannabiskonsumenten

Die LC-MS/MS-Methode wurde nach der Validierung erfolgreich zur Bestimmung der endogenen Cannabinoide AEA, OEA und PEA im Serum eines Probandenkollektivs eingesetzt.

Das Beispielchromatogramm in Kapitel 3.2 unterstreicht die Eignung der Analytik zur Endocannabinoidbestimmung im Serum. Die Peaks der Analyten und ihrer jeweiligen internen Standards sind selektiv identifizierbar. Die wenigen Störpeaks, z.B. auf der Spur von OEA bei der Retentionszeit von 6,8 oder 9,7 sowie auf der AEA Spur sind wahrscheinlich verursacht durch andere lipophile Matrixbestandteile, die trotz des aufwändigen Extraktionsverfahrens mitextrahiert wurden. Da sie die Peaks der Analyten jedoch nicht direkt stören, können sie vernachlässigt werden. Auffällig ist zudem, dass die Peaks der Serumproben im Vergleich zu den Kalibrationsstandards insgesamt um ca. eine Minute verschoben sind, sodass wir mittlere Retentionszeiten von 7,8 Minuten für AEA, 8,5 Minuten für PEA und 8,6 Minuten für OEA fanden. Dieser Effekt ist bedingt durch die Probenmatrix, konnte aber akzeptiert werden, da zum einen die internen Standards ebenfalls verschoben sind und zum anderen die Verschiebung über die gesamten Messungen hinweg konstant war, so dass die Ergebnisse unbeeinflusst blieben.

Alle Probandenserumproben wurden vermessen, ein einziger Endocannabinoidwert konnte nicht bestimmt werden, nämlich die AEA-Konzentration der ersten Probe. Vermutlich durch fehlerhafte Aufbereitung war der AEA-Peak nicht eindeutig identifizierbar und musste daher bei der Auswertung vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse sprachen bei allen drei Endocannabinoiden dafür, die Nullhypothese zu verwerfen. Die AEA-, OEA- und PEA-Konzentrationen der HFU unterschieden sich signifikant von denen der LFU.

Bisher liegt keine Untersuchung des Einflusses von Cannabiskonsum auf die endogenen Cannabinoidkonzentrationen AEA, OEA und PEA im Serum vor. Die einzige uns bekannte Veröffentlichung untersuchte lediglich den Einfluss von Cannabiskonsum auf die AEA- und 2-AG-Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte sowie auf die CB-Rezeptoren des Hirns (Di Marzo et al.

2000). Aufgrund dieser fehlenden Voruntersuchungen war es nicht möglich, eine statistisch gerichtete Hypothese zu formulieren. Die jeweiligen Mittelwerte der signifikant unterschiedlichen Endocannabinoidkonzentrationen AEA, PEA und OEA deuten dennoch stark auf eine Erhöhung bei HFU gegenüber den LFU hin. Die Störvariable „Nikotinkonsum“ hatte nur beim PEA einen signifikanten Einfluss, nicht aber bei AEA und OEA. Dieses Ergebnis lässt auf einen möglichen Zusammenhang des endogenen Cannabinoidsystems mit chronischem Nikotinkonsum schließen. Eine Untersuchung der Gruppe von Gonzalez konnte nach chronischer Gabe von Nikotin einen Anstieg von AEA in verschiedenen Hirnarealen zeigen. Andere endogene Liganden wurden nicht untersucht und mRNA-Level und Bindungskapazitäten des CB1-Rezeptors waren nicht beeinflusst (Gonzalez et al. 2002). Wir konnten jedoch keinen signifikanten Einfluss des Nikotinkonsums auf die AEA-Konzentrationen im Serum zeigen. Die Betrachtung der graphischen Darstellung von PEA zeigt, dass jeweils die Nichtraucher sowohl in der HFU als auch in der LFU-Gruppe höhere PEA-Konzentrationen aufwiesen als die Raucher. Betrachtet man allerdings die graphische Darstellung aller drei Analyten, zeigt sich auch für AEA eine leichte Tendenz in die gleiche Richtung. Möglicherweise würde sich also der Effekt bei größerer Stichprobenanzahl auch für diese Analyten herausstellen. Dafür spricht zudem, dass ebenfalls für AEA einige immunmodulatorische Effekte gezeigt werden konnten, jedoch schwächer als für den CB2-Agonisten PEA. Der gezeigte Einfluss des Nikotinkonsums auf die PEA-Konzentration führt im Prinzip nur zu einer Verstärkung des Ergebnisses, nämlich des signifikanten Unterschieds zwischen den HFU und LFU. Darauf soll in Kapitel 4.4 näher eingegangen werden.

Schon in den frühen 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass Cannabiskonsum eine Suppression der Lymphozytenproliferation sowie Veränderungen in den PBMC-Immunszellsubtypen verursacht (Nahas et al. 1974). Δ^9 -THC beeinträchtigt in-vivo und in-vitro die zellvermittelte Immunität, die humorale Abwehr sowie die zelluläre Abwehr gegenüber einer Vielzahl infektiöser Agenzien. Betrachtet man nun zum einen diese immunsuppressive Wirkung von Δ^9 -THC und zum anderen die Annahme, dass die physiologische Funktion des endogenen Cannabinoidsystems neuro- sowie immunmodulatorische Aufgaben umfasst, könnte man die erhöhten Endocannabinoidkonzentrationen bei HFU als eine Art „Gegenregulation“ des

Körpers gegenüber dem durch Δ^9 -THC verursachten, immunsuppressiven Effekt interpretieren. Obwohl bis heute der Einfluss der Endocannabinoide auf das Immunsystem unklar sind, vermutet man, dass Endocannabinoide im Immunsystem möglicherweise für die Aufrechterhaltung der Immunzellaktivierung sorgen und somit eine spontane Aktivierung von Immunzellfunktionen verhindern. Man geht von vorübergehenden Effekten aus, z.B. dann, wenn eine Aktivierung als Antwort auf Infekte nötig ist (zusammengefasst in Croxford und Yamamura 2005). Diese Hypothese wird unterstützt von neuesten Erkenntnissen, dass die endogenen Cannabinoid-Liganden über eine reversible Hemmung ihres abbauenden Enzyms FAAH diese endogenen Tonuskontrolle regulieren (Dainese et al. 2005). Einen weiteren Hinweis auf die mögliche Rolle endogener Cannabinoide in der Antwort des Immunsystems auf exogene Cannabinoide geben die Ergebnisse von Pestonjasp und Burstein. Sie konnten im Mausmodell zeigen, dass Cannabinoide wie Δ^9 -THC die Freisetzung von Arachidonsäure, dem Ausgangsprodukt für die AEA-Synthese, in Makrophagen über einen CB2-Rezeptor-vermittelten Prozess fördern und zu einem Anstieg von AEA führen (Pestonjasp und Burstein 1998).

All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Lymphozyten eine große Rolle in der Regulierung des peripheren Endocannabinoidsystems und des Endocannabinoidgleichgewichts zu spielen scheinen. In wieweit dies auch für die endogenen CB-Rezeptor-Liganden PEA und OEA gilt, ist bisher ungeklärt.

Da die HFU-Gruppe seit mindestens sechs Monaten kein Cannabis mehr konsumiert hatte, handelt es sich bei den erhöhten Endocannabinoidkonzentrationen nicht mehr um akute Effekte auf das Immunsystem. Diese Ergebnisse könnten ein möglicher Hinweis auf ein anhaltend immunsupprimiertes System sein, das der endogenen Gegenregulation bedarf. Unter Umständen handelt es sich auch schon nicht mehr um einen möglichen endogenen „Schutzmechanismus“, sondern um eine durch exogene Cannabinoide ausgelöste Dysregulation des Endocannabinoidsystems.

4.3 Cannabinoidrezeptor-mRNA-Expression auf peripheren mononuklearen Blutzellen von Cannabiskonsumenten

Basierend auf den Literaturdaten der Gruppe um Nong konnte für die Untersuchung der CB-mRNA-Expression eine gerichtete Hypothese formuliert werden (Nong et al. 2002). Nong studierte mittels RT-PCR die relative Expression von CB-Rezeptoren in peripheren mononuclearen Blutzellen verschiedener Donorgruppen. Die Gruppe fand bei Marihuanarauchern eine höhere CB-mRNA-Expression sowohl für CB1 als auch für CB2 mit einem Verhältnis von 1:3 ohne Beeinflussung durch Alter, Geschlecht oder ethnischer Zugehörigkeit. Die Untersuchung ließ jedoch entscheidende Faktoren unbeachtet, welche in unsere Untersuchung eingeschlossen wurden. Zum einen wurde bei den zehn von Nong untersuchten Probanden der akute Cannabiskonsum nicht ausgeschlossen. Die Probanden konsumierten Cannabis mehrmals in der Woche direkt vor der Blutabnahme, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Ergebnisse durch den akuten Konsum beeinflusst wurden. Unsere Einschlusskriterien setzten voraus, dass die HFU in den letzten sechs Monaten kein Cannabis konsumiert hatten, sodass ein akuter Konsum ausgeschlossen werden konnte. Dies wurde zudem durch ein negatives Drogenscreening im Urin abgesichert. Zum zweiten ließ die Untersuchung der Gruppe Nong den möglichen Störfaktor „Nikotinkonsum“ unbeachtet. Gemeinsame Verabreichung von Δ^9 -THC und Nikotin führte bei Ratten zu ähnlichen pharmakologischen Effekten und Nikotin zeigt wie auch Δ^9 -THC immunsuppressive Effekte. Neueste Studien zeigen Veränderungen der Endocannabinoidkonzentrationen im Gehirn bei Nikotinabusus, so dass ein möglicher Zusammenhang zwischen endogenem Cannabinoidsystem und Nikotinabusus nahe liegt. Wir erhoben und berücksichtigten daher den Nikotinkonsum in unserer Untersuchung als möglichen Störfaktor.

Unter Einbezug dieser beiden wichtigen Faktoren bestätigte unsere Untersuchung nur zum Teil die vorliegenden Ergebnisse der Gruppe von Nong. Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse der CB1-Rezeptor-mRNA-Expression sprachen dafür, die Nullhypothese beizubehalten. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der CB1-

mRNA-Expression zwischen HFU und LFU. Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis.

Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse der CB2-Rezeptor-mRNA-Expression sprachen jedoch dafür, die Nullhypothese zu verwerfen. Es zeigte sich ein signifikante Erhöhung der CB2-mRNA-Expression bei den HFU gegenüber den LFU. Die untersuchte Kontrollvariable „Nikotinkonsum“ hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis. Betrachtet man die absoluten Werte im Vergleich zu denen der Gruppe von Nong können wir auch das gefundene Verhältnis von CB1:CB2 mit 1:3 nicht bestätigen. Unsere Ergebnisse weisen eher auf sehr ähnliche Expressionslevel von CB1 und CB2 hin.

In der RT-PCR wurde ein sogenanntes *house-keeping* Gen - β -Actin - zur Normierung eingesetzt. Daher hat die absolute Anzahl der untersuchten weißen Blutzellen, aus denen die mRNA-Isolierung erfolgte, keinen Einfluss auf die Quotienten CB1-/ β -Actin und CB2-/ β -Actin und konnte somit als weiterer Störfaktor ausgeschlossen werden.

Da sich der Störfaktor „Nikotinkonsum“ als einflusslos erwiesen hat, lassen die Unterschiede der Ergebnisse im Vergleich zu denen der Gruppe von Nong die Vermutung zu, dass sie durch den akuten Cannabiskonsum bedingt sind. Möglicherweise führte die Einstellung des Cannabiskonsums unserer HFU-Probanden mindestens sechs Monaten vor der Blutabnahme zu einer Wiederanpassung und Erniedrigung der CB1-Rezeptorexpression. Erstaunlicherweise war dies nicht der Fall bei der CB2-Expression, deren *up*-Regulierung wir bestätigen konnten. Danach könnte Cannabiskonsum einen stärkeren Langzeiteinfluss auf die CB2-Rezeptorexpression als auf die CB1-Rezeptorexpression auf peripheren Blutzellen haben. In vorangegangenen Untersuchungen (bisher nicht veröffentlicht) konnten wir beim Vergleich zwischen 17 Frauen und 15 Männern zudem eine Geschlechtsunabhängigkeit der m-RNA-Expression zeigen, was die Daten von Nong et al. bestätigt. Wir haben demnach den Faktor „Geschlecht“ als Störfaktor vernachlässigt, dennoch ist das ausgewählte Kollektiv diesbezüglich recht gleichmäßig ausgewählt.

Die *up*-Regulation der CB2-Rezeptor-mRNA-Expression ist in Anbetracht der literaturgestützten Erwartungen einer Rezeptordesensitivierung und *down*-Regulation bei chronischer Exposition von CB-Rezeptoren mit Cannabis zunächst überraschend (Breivogel et al. 1999; Massi et al. 1997; Oviedo et al. 1993). Im Allgemeinen führt

eine kontinuierliche Exposition gegenüber Substanzen, inklusive Cannabinoiden, zu pharmakologischer Toleranz, Desensitivierung und Verminderung des Ligandeneffekts (Hsieh et al. 1999). Verschiedene Modelle G-Protein-gekoppelter Rezeptordesensitivierungen sind beschrieben worden und lassen vermuten, dass ab einem bestimmten Punkt in der Langzeitexposition des Liganden die Anzahl der Rezeptoren reduziert wird und diese durch Proteinsynthese erneuert werden müssen (Lefkowitz 1998). Diese Annahme einer vermehrter Protein-Synthese konnte schon für die CB1-Wiederherstellung Rezeptor-Gen-transfizierter Zellen gezeigt werden (Hsieh et al. 1999). Diese Ergebnisse lassen daher die Hypothese zu, dass dauerhafter Cannabiskonsum zu einer rezeptorvermittelten Toleranz führt und dass in Folge dessen Zellen, die die CB-Rezeptoren exprimieren, möglicherweise höhere Rezeptor-Gen-Transkription und Translationsaktivität zeigen, um dieses Defizit wieder auszugleichen. Unsere sowie die Ergebnisse der Gruppe Nong unterstreichen diese Hypothese für den CB2-Rezeptor, dass Marihuanakonsum zu einer Abnahme von CB2-Rezeptoren - bedingt durch Rezeptor-*down*-Regulation - führt. Die Folge ist ein Anstieg der intrazellulären Rezeptor-mRNA-Level. Unsere Ergebnisse zeigen dies jedoch im Unterschied zu der Arbeit von Nong et al. nicht für die CB1-Rezeptoren. Möglicherweise führte die sechsmonatige Abstinenz bei den CB1-Rezeptoren schon zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Rezeptorverteilung. Betrachtet man im Vergleich zu Nong et al. zudem die absoluten Messzahlen der m-RNA-Expressionslevel, finden wir insgesamt niedrigere Werte für die CB2-Expression, annähernd gleich der CB1-mRNA-Expressionswerte. Das lässt vermuten, dass möglicherweise auch bei den CB2-Rezeptoren eine Wiederanpassung erfolgt, jedoch eine sechsmonatige Abstinenz nicht ausreichend ist. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf eine größere Bedeutung der CB2-Rezeptoren gegenüber den CB1-Rezeptoren auf peripheren Zellen, wie z.B. den Immunzellen.

4.4 Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das endogene Cannabinoidsystem

Dies ist die erste Untersuchung über den Einfluss von Cannabiskonsum auf die endogenen CB-Rezeptor-Liganden AEA, OEA und PEA in humanem Serum unter gleichzeitiger Betrachtung der CB-Rezeptor-mRNA-Expression auf weißen Blutzellen. Sieht man die Ergebnisse insgesamt, lässt sich eindeutig feststellen, dass der Konsum von Cannabis mehr als 20 Mal im Leben signifikante Veränderungen im endogenen Cannabinoidsystem, vor allem im sogenannte „Immunocannabinoid-System“ bedingt, die im Folgenden noch einmal zusammenfassend diskutiert werden. Unter dem „Immunocannabinoid-System“ versteht man alle endogenen CB-Rezeptor-Liganden sowie deren Rezeptoren, die im Immunsystem präsent sind. Vielfach wurde gezeigt, dass dieses „Immunocannabinoid-System“ in die Immunregulation involviert ist. Da der CB2-Rezeptor gegenüber dem CB1-Rezeptor vermehrt im Immunsystem exprimiert wird, geht man davon aus, dass er der hauptsächliche CB-Rezeptor mit immunmodulierenden Eigenschaften ist. Endogene Fettsäureamidliganden des CB2-Rezeptors oder auch andere Agonisten modulieren immanente sowie adaptierte Immunreaktionen, solche immunmodulierende Eigenschaften von Cannabinoiden fehlen in *CB2-Knockout*-Mäusen. Man vermutet daher, dass der CB2-Rezeptor beim primären Signalweg der endocannabinoidergen Immunmodulation eine wichtige Rolle spielt und somit in die Immunantwort des Körpers sowohl im gesunden wie auch im erkrankten Zustand involviert ist (zusammengefasst in Sipe et al. 2005).

Da es sich bei allen Probanden um gesunde Personen handelte, wie vor Einschluss in die Untersuchung durch gründliche körperliche, klinische und psychiatrische Untersuchungen bestätigt wurde, zeigen diese Veränderungen bisher keinen diagnostizierbaren pathologischen Einfluss auf die Gesundheit oder den Allgemeinzustand der Probanden. Somit stellt sich die Frage nach den potentiellen Auswirkungen oder Folgen unserer gezeigten signifikanten Veränderungen. Denn es ist trotz momentaner Symptomfreiheit nicht auszuschließen, dass diese Dysregulation mögliche spätere Folgen haben kann. Wie könnte die in Kapitel 4.3 aufgestellte Hypothese der möglichen Rezeptortoleranz-Entwicklung mit den veränderten Endocannabinoidkonzentrationen in Verbindung gebracht werden? Durch den vermehrten Konsum von Cannabis kommt es zur Dysregulation der

endogenen cannabinoidergen Ligandenkonzentrationen mit der Folge eines signifikanten Anstiegs. Alle drei von uns untersuchten endogenen Liganden zeigen einen signifikanten Konzentrationsanstieg, und alle unterliegen den gleichen Synthese- und Abbausystemen. Dienen die erhöhten Ligandenkonzentrationen dem Körper womöglich dazu, nach dauerhaftem Cannabiskonsum und somit dauerhaft erhöhter Zufuhr exogener Cannabinoide die entstandene rezeptorvermittelte Toleranz temporär zu kompensieren, sodass die Zellen, die die Rezeptoren exprimieren, durch höhere Rezeptor-Gen-Transkription und Translationsaktivität dieses Defizit wieder ausgleichen? Diese Hypothese würde die heutige Annahme stützen, dass es sich beim endogenen Cannabinoidsystem um ein neuromodulatorisches System handelt, welches nach Ansicht vieler Autoren möglicherweise eine Art „Puffer-Funktion“ für verschiedene externe Reize und Einflüsse im Körper übernimmt. Wenn es sich also tatsächlich um eine noch nicht abgeschlossene Wiederanpassung der CB₂-Rezeptorexpression handelt, könnte eine erneute Untersuchung desselben Kollektivs zu einem späteren Zeitpunkt Aufschluss geben.

Andererseits könnten diese signifikanten Erhöhungen der Ligandenkonzentrationen Ausdruck einer anhaltenden Dysregulation des Systems nach vermehrtem Cannabiskonsum sein. Möglicherweise verursacht durch eine Störung des abbauenden Systems, wie zum Beispiel Blockade des abbauenden Enzyms FAAH. In diesem Fall könnte diese *up*-Regulation des endogenen cannabinoidergen Systems auf CB₂-Rezeptor- sowie Ligandenebene nach mehrfachem Cannabiskonsum erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbare Auswirkungen zeigen. Möglicherweise in Form einer geschwächten Immunabwehr oder einer erhöhten Prävalenz, eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Diese Theorien können ebenfalls nur durch sich anschließende, ergänzende auch tierexperimentelle Untersuchungen der CB-Rezeptoren und ihrer endogenen CB-Rezeptor-Liganden, speziell des „Immunocannabinoid-Systems“, bestätigt oder verworfen werden.

Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, sind neueste Ergebnisse darüber, dass Endocannabinoide auch CB₁/CB₂-unabhängige Aktivitäten zeigen. Eine potentiell beteiligte Rezeptorklasse sind die nukleären Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR), von denen bis heute die drei Subtypen PPAR- α , PPAR- β und PPAR- γ identifiziert sind. Obwohl die einzelnen Funktionen nicht ganz

geklärt sind, konnte für PPAR- α und PPAR- γ die Involvierung in den Lipidmetabolismus gezeigt werden. Darüber hinaus wurden immunregulatorische Funktionen gefunden (Clark 2002). OEA wurde kürzlich als Ligand für PPAR- α identifiziert, PEA wird als Ligand für PPAR- γ diskutiert. Metabolite von AEA inhibieren immunmodulatorisch die Interleukin-2-Freisetzung, vermutlich vermittelt über PPAR- γ (Fu et al. 2003; LoVerme et al. 2005; Rockwell und Kaminski 2004). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhten CB-Rezeptor-Ligandenkonzentrationen neben der Aktivität an den CB-Rezeptoren ebenfalls andere potentielle Rezeptorsysteme beeinflussen und darüber immunmodulatorisch agieren.

Der als möglicher Störfaktor in die Untersuchung einbezogene Nikotinkonsum zeigte nur auf die PEA-Konzentrationen einen signifikanten Einfluss. Jeweils die Nichtraucher sowohl in der HFU- wie auch in der LFU-Gruppe zeigen höhere PEA-Konzentrationen als die Raucher. Wie ist dies zu erklären? Während akute Effekte von Nikotinkonsum auf das Immunsystem noch unklar sind, hat chronischer Nikotinkonsum Veränderungen der humoralen und zellulären Immunität zur Folge (Matsunaga et al. 2001). Inwieweit diese mit dem endogenen Cannabinoidsystem zusammenhängen ist bisher ebenfalls unklar. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem endogenen Cannabinoidsystem und Nikotinabusus gibt. Neueste Untersuchungen beschränken sich dabei jedoch zumeist auf Interaktionen mit dem CB1-Rezeptor und der potentiellen Anwendung eines CB1-Antagonisten (Rimonabant) zur Substitutionsbehandlung bei der Nikotinabhängigkeit. Co-Administration von THC und Nikotin zeigte neben pharmakologisch ähnlichen Effekten zudem eine Abschwächung der THC-Toleranz sowie eine Potenzierung der Erhöhung der Anzahl immunreaktiver Zellen in verschiedenen Hirnregionen (Valjent et al. 2002). Potenziert der Nikotinkonsum in unserer Untersuchung möglicherweise den immunmodulatorischen Effekt des Cannabiskonsums und beeinflusst zudem den gegenregulierenden Mechanismus des endogenen Cannabinoidsystems negativ? Für diese Hypothese würde sprechen, dass wir für PEA in den beiden Gruppen LFU und HFU jeweils bei den Rauchern deutlich niedrigere Konzentrationen gefunden haben als bei den Nichtrauchern.

4.5 Ausblick

Durch das in den letzten Jahren immer stärker gewordene Interesse an der Aufklärung der Funktionen des endogenen Cannabinoidsystems sind die chemischen und strukturellen Eigenschaften der endogenen Liganden sowie der Rezeptoren und der Auf- und Abbauewege recht gut untersucht und charakterisiert. Tierexperimentell konnten zudem verschiedene mögliche Signalwege gezeigt werden. Die genauen Funktionen dieses Systems im Körper sind allerdings weitgehend unaufgeklärt. Die von uns entwickelte Analytik zur Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum ermöglicht eine selektive und zeitsparende sowie vor allem sensitive, analytische Methode, um diesen Fragestellungen intensiver nachzugehen. Das neue Messverfahren bietet zudem eine geeignete Basis für die Weiterentwicklung der Aufbereitungstechnik mit anschließender Anwendung auch für anderer Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe.

Auch die Ergebnisse unserer ersten Studie, die die Eignung der Methode zur robusten Endocannabinoidbestimmung bestätigt hat, bietet viel Raum für weiterführende Untersuchungen. Eine erneute Rekrutierung des Probandenkollektivs mit nochmaliger Untersuchung der endogenen Liganden sowie der CB-Rezeptor-mRNA-Expression, kombiniert mit immunhistochemischen CB-Rezeptor-Bestimmungen, könnte weitere Aufschlüsse folgender Fragestellungen geben: Handelt es sich bei den gefundenen Ergebnissen tatsächlich um eine noch nicht abgeschlossene Wiederherstellung des Gleichgewichts des Immunsystems über das endogene Cannabinoidsystem nach Dysregulation durch exogene Cannabinoide? Oder liegt möglicherweise schon eine irreversible Dysregulation des Systems durch Cannabiskonsum vor, die sich in anhaltenden Veränderungen der Ligandenkonzentrationen sowie der CB-mRNA-Rezeptorexpression zeigt? Ein potentieller Ansatz, um die immunmodulierende Rolle exogen zugeführter Cannabinoide noch weiter zu untersuchen, wäre die differenziertere Rezeptorbestimmung verschiedener Subzellfraktionen der weißen Blutzellen, kombiniert mit der Bestimmung der Endocannabinoide in mit diesen Zellfraktionen angereichertem Serum. Es gibt viele in-vitro und auch tierexperimentelle Untersuchungen zu den CB-Rezeptorverteilungsmustern bzw. der mRNA-Expression auf diesen Zellen. Zudem konnten die

Synthese- sowie Inaktivierungsmechanismen für AEA und auch PEA beispielsweise in Makrophagen und basophilen Zellen gezeigt werden, sodass eine Rolle als lokale Immun- sowie Entzündungsmodulatoren für diese beiden endogenen Liganden sehr wahrscheinlich ist (zusammengefasst in Parolaro et al. 2002).

Dennoch gibt es kaum humanexperimentelle Studien, die den Einfluss exogener Cannabinoide auf dieses scheinbar sehr sensitive System näher untersuchen.

Daraus könnten jedoch noch detailliertere Informationen über die spezifische Verteilung der Rezeptoren und ihrer endogenen Liganden auf bzw. in Immunzellen gewonnen werden. Sollte dies gelingen und könnten entsprechende Zusammenhänge gezeigt werden, so würde man nicht nur die potentielle Rolle der Endocannabinoide im Immunsystem besser verstehen, sondern auch mögliche neue diagnostische Ansätze für Erkrankungen des Immunsystems finden und in Folge dessen auch neue pharmazeutische Entwicklungsansätze finden können.

5 Zusammenfassung

Bei dem endogenen Cannabinoidsystem handelt es sich um ein neuromodulatorisches Signalsystem, das an einer Vielzahl neuronaler, immunologischer und endokrinologischer Steuerungsprozesse beteiligt ist. Obwohl die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. eine der ältesten Kulturpflanzen ist und deren wichtigste Inhaltsstoffe, die Cannabinoide, zu denen auch das psychoaktive Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) gehört, schon länger bekannt sind, gelang die Identifizierung der Cannabinoidrezeptoren (CB1 und CB2) sowie die Charakterisierung verschiedener endogener Liganden erst seit Ende der 1980er Jahre. Heute steht neben den weiterhin interessanten Grundlagenfragen vor allem die Untersuchung der physiologischen und pathologischen Relevanz dieses Systems im Vordergrund des Interesses.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von Cannabiskonsum auf das endogene Cannabinoidsystem zu untersuchen. Dabei stand die Entwicklung einer selektiven und sensitiven LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der endogenen Cannabinoide Anandamid (AEA), Oleoylethanolamid (OEA) und Palmitoylethanolamid (PEA) in humanem Serum im Mittelpunkt. In Körperflüssigkeiten sind im Gegensatz zu Geweben nur sehr geringe Konzentrationen dieser Substanzen zu finden (pmol/ml-Bereich), so dass besonderes Augenmerk auf die Sensitivität gelegt wurde. Quantifizierungsgrenzen bisher existierender Methoden reichen nicht sicher aus, um valide Messergebnisse in humanem Serum zu produzieren. Um neben der Untersuchung der Auswirkungen von Cannabiskonsum auf die endogenen Liganden zudem den Einfluss auf das CB-Rezeptorsystem zu untersuchen, wurde parallel die mRNA-Expression der CB-Rezeptoren auf weißen Blutzellen mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt.

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein Verfahren zu entwickeln, das sich im Vergleich zu bisher existierenden Methoden durch höhere Sensitivität auszeichnet und das durch optimierte Probenhandhabung und -aufbereitung valide Messergebnisse für Endocannabinoide im Serum gewährt.

Die anschließende Studie war die erste Untersuchung des Einflusses von Cannabiskonsum auf die endogenen Ligandenkonzentrationen von AEA, OEA und PEA in

humanem Serum unter gleichzeitiger Betrachtung der CB-Rezeptor-mRNA-Expression auf weißen Blutzellen. Unsere Untersuchung zeigte einen signifikanten Anstieg aller drei untersuchten endogenen Liganden sowie eine Erhöhung der CB2-Rezeptor-mRNA-Expression bei Cannabiskonsumenten. Diese Ergebnisse lassen feststellen, dass der mehr als 20malige Konsum von Cannabis im Leben signifikante Veränderungen im endogenen Cannabinoidsystem, vor allem im so genannten „Immunocannabinoidsystem“ bedingt, worunter man alle endogenen CB-Rezeptor-Liganden sowie deren Rezeptoren, präsent im Immunsystem, zusammenfasst. Der CB2-Rezeptor ist gegenüber dem CB1-Rezeptor vermehrt im Immunsystem zu finden und man geht heute davon aus, dass er beim primären Signalweg der endocannabinoidergen Immunmodulation eine wichtige Rolle spielt und somit in die Immunantwort des Körpers involviert ist.

Bei allem Probanden der Studie handelte es sich um gesunde Personen ohne körperliche, klinische oder psychiatrische Symptome, so dass die Frage der potentiellen Auswirkungen dieser signifikanten Veränderungen des endogenen Cannabinoidsystems nach mehrfachem Konsum exogener Cannabinoide zunächst offen bleibt. Aufgrund der neuromodulatorischen Eigenschaften endogener Cannabinoide könnte es sich auch hier um einen solchen Effekt handeln. Möglicherweise dienen die erhöhten Ligandenkonzentrationen dem Körper dazu, die durch dauerhaft erhöhte Zufuhr exogener Cannabinoide entstehende Rezeptor-vermittelte Toleranz temporär zu kompensieren und durch höhere Rezeptor-Gen-Transkription und Translationsaktivität dieses Defizit wieder auszugleichen. Vielleicht sind die Veränderungen aber auch Ausdruck einer anhaltenden Dysregulation des Systems verursacht durch vermehrten Cannabiskonsum, dessen Auswirkungen erst zu einem späteren Zeitpunkt klinisch sichtbar werden.

Die genauen Funktionen des endogenen Cannabinoidsystems sind bis heute immer noch weitgehend ungeklärt und auch der Einfluss exogener Cannabinoide auf dieses scheinbar sehr sensitive System ist humanexperimentell kaum untersucht. Vor allem daher bietet die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung endogener Cannabinoide im Serum eine geeignete Basis zur weiteren Aufklärung der Rolle des endogenen Cannabinoidsystems an physiologischen wie auch pathologischen Prozessen.

6 Abkürzungen

2-AG	2-Arachidonylglycerol
Δ^9 -THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
AEA	Anandamid (Arachidonyethanolamid)
Aqua dem.	Aqua (demineralisiert)
AM 404	4-(hydroxyphenyl)-arachidonamid
AT	Aktiver Transporter
bp	Basenpaare
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBD	Cannabidiol
CE	Kollisionsenergie
CV	Variationskoeffizient
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxyacytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EC	Extrazellulärraum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i> , Fettsäureamidhydrolase
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Alternativhypothese
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Intrazellulärraum
LC	<i>Liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LC-MS/MS	HPLC-Tandemmassenspektrometrie
LFU	<i>Low frequency use</i> , geringer Cannabiskonsum
LLOQ	<i>Lower limit of quantification</i> , unteres Quantifizierungslimit
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MS	Multiple Sklerose
m/z	Quotient aus Masse durch Ladung
μ	Erwartungswert
NAPE	N-arachidonyl-phosphatidylethanolamid
NAT	N-Acyl-Transferase
NOPE	N-oleoyl-phosphatidylethanolamid
NPPE	N-palmitoyl-phosphatidylethanolamid
NR	Nichtraucher
OEA	Oleylethanolamid
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere weiße Blutzellen
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEA	Palmitoylethanolamid
PLD	Phospholipase D

PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
QC	Qualitätskontrolle
R	Raucher
RT	Retentionszeit
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	<i>Standard error of the mean,</i> Standardfehler des arithmetischen Mittels
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-methylamin
ZNS	Zentralnervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58: 315-348
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatr* 184: 110-117
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006) Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 396: 113-116
- Axelrod J, Felder CC (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochem Res* 23: 575-581
- Baldwin GC, Tashkin DP, Buckley DM, Park AN, Dubinett SM, Roth MD (1997) Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1606-1613
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10: 89-97
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33: 181-191
- Berry E, Mechoulam R (2002) Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther* 95: 185
- Block RI (1996) Does heavy marijuana use impair human cognition and brain function? *JAMA* 275: 560-561
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237: 704-711
- Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1993) Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 214: 173-180
- Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Vogt LJ, Sim-Selley LJ (1999) Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem* 73: 2447-2459
- Budney AJ, Hughes JR, Moore BA, Vandrey R (2004) Review of the validity and significance of cannabis withdrawal syndrome. *Am J Psychiatr* 161: 1967-1977

- Budzikiewicz H (1998) Massenspektrometrie, Eine Einführung. Willey-VCH, Weinheim, Willey-VCH, Weinheim
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* 17: 1226-1242
- Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci* 16: 3934-3942
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277-281
- Calignano A, La Rana G, Piomelli D (2001) Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 419: 191-198
- Carlo GD, Izzo AA (2003) Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 39-49
- Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW (2005) Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatr* 57: 1117-1127
- Childers SR, Breivogel CS (1998) Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alcohol Depend* 51: 173-187
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Clark RB (2002) The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol* 71: 388-400
- Cohen C, Kodas E, Griebel G (2005) CB1 receptor antagonists for the treatment of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 387-395
- Cook SA, Lowe JA, Martin BR (1998) CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 1150-1156
- Corey S (2005) Recent developments in the therapeutic potential of cannabinoids. *P R Health Sci J* 24: 19-26
- CPMP/ICH/281/95 (1996) EEC Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology
- CPMP/ICH/381/95 (1994) EEC Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology

- Croxford JL, Yamamura T (2005) Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 166: 3-18
- Dainese E, Gasperi V, Maccarrone M (2005) Partial QSAR analysis of some selected natural inhibitors of FAAH suggests a working hypothesis for the development of endocannabinoid-based drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 709-714
- Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov D (2001) Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 103: 9-15
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-613
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949
- Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (2000) Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9- tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J Neurochem* 74: 1627-1635
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons [see comments]. *Nature* 372: 686-691
- Di Tomaso E, Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Desarnaud F, Venance L, Piomelli D (1997) Endogenous lipids that activate cannabinoid receptors. Formation and inactivation. *Adv Exp Med Biol* 407: 335-340
- Ehrenreich H, Rinn T, Kunert HJ, Moeller MR, Poser W, Schilling L, Gigerenzer G, Hoehe MR (1999) Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology (Berl)* 142: 295-301
- Elphick MR, Egertova M (2001) The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 381-408.
- Elsohly MA, Slade D (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 78: 539-548
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995) Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92: 3376-3380
- FDA Food and Drug Administration (2001) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation

- Felder CC, Glass M (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 179-200
- Fernandez-Ruiz JJ, Berrendero F, Hernandez ML, Romero J, Ramos JA (1999) Role of endocannabinoids in brain development. *Life Sci* 65: 725-736
- Fox P, Bain PG, Glickman S, Carroll C, Zajicek J (2004) The effect of cannabis on tremor in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 62: 1105-1109
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83: 1017-1066
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425: 90-93
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232: 54-61
- Gaoni M, Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647
- Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, Schreiber D, Koethe D, Faulhaber J, Klosterkotter J, Piomelli D (2004) Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology* 29: 2108-2114
- Giuffrida A, Piomelli D (1998a) Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. *FEBS Lett* 422: 373-376
- Giuffrida A, Piomelli D (1998b) *Lipid Second Messenger*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, CRC Press LLC, Boca Raton, FL
- Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Piomelli D (2000) Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 280: 87-93
- Gonzalez S, Grazia Cascio M, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* 954: 73
- Hall W, Solowij N (1998) Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352: 1611-1616
- Haney M, Hart CL, Vosburg SK, Nasser J, Bennett A, Zubarán C, Foltin RW (2004) Marijuana withdrawal in humans: effects of oral THC or divalproex. *Neuropsychopharmacology* 29: 158-170
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547: 267-74

- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-1936
- Holter SM, Kallnik M, Wurst W, Marsicano G, Lutz B, Wotjak CT (2005) Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *Eur J Pharmacol* 510: 69-74
- Howlett AC (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci.* 35: 1803-1810
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 345-358
- Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K (1999) Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 73: 493-501
- Iversen L, Chapman V (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief. *Curr Opin Pharmacol* 2: 50-55
- Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998) The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76: 189-199
- Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez De Fonseca F, Navarro M, Moratalla R, Garcia-Segura LM (2003) Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 119: 309-318
- Kalant H (2004) Adverse effects of cannabis on health: an update of the literature since 1996. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 849-863
- Kaminski NE, Koh WS, Yang KH, Lee M, Kessler FK (1994) Suppression of the humoral immune response by cannabinoids is partially mediated through inhibition of adenylate cyclase by a pertussis toxin-sensitive G-protein coupled mechanism. *Biochem Pharmacol* 48: 1899-1908
- Kebarle PH, Y (1997) On the mechanism of electrospray mass spectrometry, in *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, applications* (Cole RB ed). John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Kingsley PJ, Marnett LJ (2003) Analysis of endocannabinoids by Ag(+) coordination tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 314: 8-15
- Klein TW (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5: 400-411
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74: 486-496
- Koga D, Santa T, Fukushima T, Homma H, Imai K (1997) Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of

- anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J Chromatogr B Biomed Appl* 690: 7-13
- Kouri EM, Pope HG, Jr., Lukas SE (1999) Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use. *Psychopharmacology (Berl)* 143: 302-308
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-414
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273: 18677-18680
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67: 15-19
- LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci* 77: 1685-1698
- Luetje CW, Patrick J, Seguela P (1990) Nicotine receptors in the mammalian brain. *FASEB J* 4: 2753-2760
- Lundqvist T (2005) Cognitive consequences of cannabis use: comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 319-330
- Maccarrone M, Attina M, Cartoni A, Bari M, Finazzi-Agro A (2001) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of endogenous cannabinoids in healthy and tumoral human brain and human cells in culture. *J Neurochem* 76: 594-601
- Maldonado R, Rodriguez de Fonseca F (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci* 22: 3326-3331
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530-534
- Martin BR, Aceto MD (1981) Nicotine binding sites and their localization in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 5: 473-8
- Massi P, Patrini G, Rubino T, Fuzio D, Parolaro D (1997) Changes in rat spleen cannabinoid receptors after chronic CP-55,940: an autoradiographic study. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 73-8
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564

- Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y (2001) Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol* 167: 6518-6524
- Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A (1996) N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur.J.Pharmacol.* 300: 227-236
- Mechoulam R, Ben Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90
- Mechoulam R, Ben-Shabat S (1999) From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Nat Prod Rep* 16: 131-143
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22: 9742-9753
- Morris LJ (1966) Separations of lipids by silver ion chromatography. *J Lipid Res* 7: 717-732
- Müller-Vahl KR, Schneider U, Prevedel H, Theloe K, Kolbe H, Daldrup T, Emrich HM (2003) Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *J Clin Psychiatr* 64: 459-465
- Munro S, Thomas KL, Abu Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65
- Nahas GG, Suci-Foca N, Armand JP, Morishima A (1974) Inhibition of cellular mediated immunity in marijuana smokers. *Science* 183: 419-420
- Nong L, Newton C, Cheng Q, Friedman H, Roth MD, Klein TW (2002) Altered cannabinoid receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from marijuana smokers. *J Neuroimmunol* 127: 169-176
- Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J (2004) Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53: 208-213
- Obata T, Sakurai Y, Kase Y, Tanifuji Y, Horiguchi T (2003) Simultaneous determination of endocannabinoids (arachidonylethanolamide and 2-arachidonoylglycerol) and isoprostane (8-epiprostaglandin F2alpha) by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring for medical samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792: 131-140

- Oviedo A, Glowa J, Herkenham M (1993) Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 616: 293-302
- Parolaro D, Massi P, Rubino T, Monti E (2002) Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 319-332
- Perkonigg A, Lieb R, Hofler M, Schuster P, Sonntag H, Wittchen HU (1999) Patterns of cannabis use, abuse and dependence over time: incidence, progression and stability in a sample of 1228 adolescents. *Addiction* 94: 1663-1678
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-180
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 1553-1571
- Pestonjamas VK, Burstein SH (1998) Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1394: 249-260
- Pillay SS, Rogowska J, Kanayama G, Jon DI, Gruber S, Simpson N, Cherayil M, Pope HG, Yurgelun-Todd DA (2004) Neurophysiology of motor function following cannabis discontinuation in chronic cannabis smokers: an fMRI study. *Drug Alcohol Depend* 76: 261-271
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-884
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21: 218-224
- Pope HG, Gruber AJ, Hudson JI, Cohane G, Huestis MA, Yurgelun-Todd D (2003) Early-onset cannabis use and cognitive deficits: what is the nature of the association? *Drug Alcohol Depend* 69: 303-310
- Pope HG, Jr., Gruber AJ, Yurgelun Todd D (1995) The residual neuropsychological effects of cannabis: the current status of research. *Drug Alcohol Depend* 38: 25-34
- Porter AC, Felder CC (2001) The endocannabinoid nervous system. Unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60
- Randall M, Harris D, Kendall D, Ralevic V (2002) Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* 95: 191
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-244

- Rockwell CE, Kaminski NE (2004) A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 683-690
- Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* 276: 2050-2054
- Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Calderon JL, Gorriti MA, Navarro M (1998) Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol Dis* 5: 483-501
- Rodriguez de Fonseca F, Gorriti MA, Fernandez Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA (1994) Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 47: 33-40
- Romero J, Garcia L, Fernandez Ruiz JJ, Cebeira M, Ramos JA (1995) Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 731-737
- Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1997) Effects of chronic exposure to delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 46: 100-108
- Rubino T, Vigano D, Massi P, Parolaro D (2000a) Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940 [In Process Citation]. *J Neurochem* 75: 2080-2086
- Rubino T, Vigano D, Massi P, Spinello M, Zagato E, Giagnoni G, Parolaro D (2000b) Chronic Delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. *Neuropharmacology* 39: 1331-1336
- Rubino T, Vigano D, Zagato E, Sala M, Parolaro D (2000c) In vivo characterization of the specific cannabinoid receptor antagonist, SR141716A: behavioral and cellular responses after acute and chronic treatments. *Synapse* 35: 8-14
- Sallan SE, Zinberg NE, Frei E, 3rd (1975) Antiemetic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol in patients receiving cancer chemotherapy. *N Engl J Med* 293: 795-797
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 278-287
- Schmid HH, Berdyshev EV (2002) Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 363-376

- Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V (1996) The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chem Phys Lipids* 80: 133-142
- Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, et al. (1991) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16: 249-255
- Shay AH, Choi R, Whittaker K, Salehi K, Kitchen CM, Tashkin DP, Roth MD, Baldwin GC (2003) Impairment of antimicrobial activity and nitric oxide production in alveolar macrophages from smokers of marijuana and cocaine. *J Infect Dis* 187: 700-704
- Sim LJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Childers SR (1996) Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 16: 8057-8066
- Sipe JC, Arbour N, Gerber A, Beutler E (2005) Reduced endocannabinoid immune modulation by a common cannabinoid 2 (CB2) receptor gene polymorphism: possible risk for autoimmune disorders. *J Leukoc Biol* 78: 231-238
- Solowij N (1998) *Cannabis and Cognitive Functioning*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Solowij N, Stephens RS, Roffman RA, Babor T, Kadden R, Miller M, Christiansen K, McRee B, Vendetti J (2002) Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *JAMA* 287: 1123-1131
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F (2005) Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 434: 782-786
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K (1996) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 113-117
- Thomas BF, Wei X, Martin BR (1992) Characterization and autoradiographic localization of the cannabinoid binding site in rat brain using [³H]11-OH-delta 9-THC-DMH. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 1383-1390
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411
- Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R (2002) Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br J Pharmacol* 135: 564-578
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329-332

- Wagner JA, Varga K, Kunos G (1998) Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J Mol Med* 76: 824-836
- Watson SJ, Benson JA, Jr., Joy JE (2000) Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch Gen Psychiatr* 57: 547-552
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
- Winstein LHJ (1938) The coordination of silver ion with unsaturated compounds. *J Am Chem Soc* 60: 836
- Yang HY, Karoum F, Felder C, Badger H, Wang TC, Markey SP (1999) GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. *J Neurochem* 72: 1959-1968
- Zajicek JP, Sanders HP, Wright DE, Vickery PJ, Ingram WM, Reilly SM, Nunn AJ, Teare LJ, Fox PJ, Thompson AJ (2005) Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 76: 1664-1669

8 Danksagung

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie sowie dem Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln durchgeführt. Mein Dank gilt in besonderer Weise Herrn PD Dr. F. M. Leweke für seine freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die fortwährende wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Antje Jülicher und Frau Dr. Miriam Schneider für die vielen anregenden Diskussionen wissenschaftlicher Fragestellungen sowie für ihre große fachliche Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit. Nicht zuletzt danke ich auch Frau Sonja Groß und Frau Dr. Brit Meike Nolden für das freundschaftliche Zusammenarbeiten sowie allen anderen Mitgliedern und Ärzten der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit. Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Harlfinger für ihre freundliche und kompetente Einführung und Unterstützung am LC-MS/MS im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln. Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme danken, vor allem danke ich Herrn Prof. Dr. E. Schömig für die Kooperation sowie die Nutzung der Labore und Geräte.

Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. F. M. Leweke für die Ermöglichung eines 7-monatigen Forschungsaufenthalts an der University of California, Irvine, USA zu Beginn meiner Doktorandenzeit. Dieser Auslandsaufenthalt hat mich sowohl fachlich wie auch persönlich sehr geprägt. Ich danke Prof. Dr. Daniele Piomelli für die großartige Gelegenheit, in seinem internationalen Labor gearbeitet haben zu dürfen sowie Prof. Dr. Andrea Giuffrida, der mich während meiner Zeit in den USA und bis heute stets wissenschaftlich in besonderer Weise unterstützt hat. Zudem danke ich allen Mitarbeitern und Wissenschaftlern aus Prof. Piomellis Labor für die warme und herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und allen meinen Freunden, die ich während dieses Aufenthalts gewonnen habe, von Herzen für dieses unvergessliche „Great American Experience“. Nicht zuletzt möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie der Universität Bonn für die freundliche Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten danken. Ich danke Herrn PD Dr. M. Kathmann für die stets sehr hilfsbereite und kompetente Diskussion wissenschaftlicher Fragestellungen, Frau Petra Spitzlei für ihre molekularbiologischen Fertigkeiten und ihre Unterstützung sowie Herrn Prof. Dr. E. Schlicker für die Ermöglichung der Kooperation. Herrn Prof. Dr. U. Jaehde danke ich sehr für die freundliche Betreuung und Unterstützung sowie seine Stellungnahme zu dieser Arbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Freund Daniel, für die Kraft und Energie die er mir im letzten Jahr gegeben hat. Ich danke dir für deine Ermutigungen, dein Verständnis und das du mich so glücklich machst. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für Ihre stetige liebevolle Unterstützung und den emotionalen Rückhalt.