Analyse von Endocannabinoiden und verwandten Fettsäureethanolamiden bei translationalen Untersuchungen zu psychischen Erkrankungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

FRANZISKA PAHLISCH

aus

Halle (Saale)

Bonn, 2016

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

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Markus Leweke, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Medizinische Fakultät Mannheim, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde, Pharmazeutisches Institut, Klinische Pharmazie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der Promotion: 15.12.2015

Erscheinungsjahr: 2016

Erklärung:

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommene Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten sind von mir nicht bereits anderweitig an einer anderen Fakultät oder Universität als Dissertation eingereicht worden. Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen. Für die Erstellung der vorgelegten Arbeit und/oder die Gelegenheit zur Promotion wurde keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern/ -vermittlern oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht worden.

Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. Translational psychiatry. 2**,** e94.

Köln, 13.09.2015

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Phytocannabinoide 1

1.2 Endocannabinoidsystem 4

1.2.1 Cannabinoidrezeptoren 5

1.2.2 Endogene Liganden 7

1.2.3 Biosynthese und Degradierung der Endocannabinoide 9

1.2.4 Signaltransduktion im Endocannabinoidsystem 14

1.3 Das Endocannabinoidsystem unter pathophysiologischen Bedingungen 19

1.3.1 Schizophrenie 19

1.3.2 Bipolare Störung 21

1.3.3 Das Endocannabinoidsystem im Kontext der Schizophrenie 21

1.3.4 Cannabidiol - ein potentielles Antipsychotikum 25

1.4 Zwillingsstudien im Kontext der Schizophrenie 26

1.5 Tierexperimentelle Studien 27

1.6 Analytik der Endocannabinoide 28

2 Fragestellungen 35

3 Material und Methoden 36

3.1 Zwillingsstudie 36

3.1.1 Materialien 36

3.1.2 Experimentelles Design 39

3.1.3 Bestimmung der Endocannabinoide und verwandter Fettsäureethanolamide im Plasma 40

3.1.4 Datenauswertung 45

3.2 Methodenvalidierung 46

3.2.1 Materialien 46

3.2.2 Experimentelles Design 49

3.2.3 Bestimmung v. endog. und exog. Cannabinoiden im Gewebe 51

3.2.4 Bestimmung von endog. und exog. Cannabinoiden im Serum 66

3.2.5 Datenauswertung der Gewebs- und Serumproben 67

3.3 FAAH Enzymassay mit Cannabidiol 69
3.3.1 Materialien 69
3.3.2 FAAH-Enzym Aufbereitung 71
3.3.3 Herstellung der Ausgangslösungen 71
3.3.4 Inkubation 71

4 Ergebnisse Zwillingsstudie 73
4.1 Kalibriergeraden der Endocannabinoide 73
4.2 Messergebnisse der Konzentrationsbestimmung von Anandamid, OEA, PEA und 2-AG mittels LC-MS 74
4.3 Statistische Auswertung der Messergebnisse 75
4.3.1 Anandamid 75
4.3.2 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) 76
4.3.3 Oleoylethanolamid (OEA) 76
4.3.4 Palmitoylethanolamid (PEA) 77

5 Diskussion Zwillingsstudie 80

6 Ergebnisse Methodenvalidierung 86
6.1 Bestimmungsbereich und Linearität 86
6.2 Präzision und Richtigkeit 87
6.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze 88
6.4 Selektivität 89
6.5 Wiederfindung 91
6.6 Stabilität 92
6.6.1 Stabilität von Proben im Autosampler 92
6.6.2 Stabilität bei Raumtemperatur 92
6.6.3 Stabilität nach dreimaligen Einfrieren und Auftauen 93
6.6.4 Langzeitstabilität 94
6.7 Gesamtergebnis der Methodenvalidierung 94

7 Diskussion Methodenvalidierung 96

8 Ergebnisse FAAH Enzymassay mit Cannabidiol 100

9 Ergebnisse tierexperimentelle Endocannabinoidstudie 101

9.1 Ergebnisse Teilstudie „Wirkung von Cannabidiol und URB 597 auf das Endocannabinoidsystem" 101

9.1.1 Beeinflussung d. Eicosanoidkonz. d. Cannabidiol und URB 597 ... 102

9.1.2 Beeinflussung d. Eicosanoidkonz. n. URB 597-Gabe in verschiedenen Gehirnregionen 106

9.2 Ergebnisse Teilstudie „Wirkung von Δ^9-THC auf das Endocannabinoidsystem".....113

9.2.1 Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC 113

9.2.2 Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen durch Δ^9-THC 115

9.3 Korrelationsanalyse zwischen Serum-Eicosanoid-konzentrationen und Eicosanoidspiegeln im Gehirn 120

10 Diskussion FAAH Enzymassay/ Tierexperimentelle Endocannabinoidstudie 123

11 Abschließende allgemeine Diskussion 139

12 Zusammenfassung.....143

13 Literatur.....146

14 Abbildungsverzeichnis 163

15 Tabellenverzeichnis 166

16 Danksagung.....168

1 Einleitung

Im Mittelpunkt der Arbeit steht das Endocannabinoidsystem, ein wichtiges modulatorisches Transmittersystem. Dieses System scheint unter anderem eine entscheidende Rolle bei Schizophrenien zu spielen. Daher werden zunächst die exogenen Cannabinoide sowie das Endocannabinoidsystem beschrieben und im Kontext der Schizophrenie betrachtet.

Im Rahmen der Arbeit wurden die Endocannabinoidkonzentrationen im Plasma monozygoter Zwillinge mit Diskordanz für Schizophrenie untersucht. Deshalb wird die Zwillingsforschung als eine Methode zur Identifizierung neuer Phänotypen bei komplexen Erkrankungen wie Schizophrenie dargestellt. In anschließenden Tierversuchen, deren Vorteile ebenfalls in der Einleitung erläutert werden, wurden die grundlegenden Mechanismen des Endocannabinoidsystems genauer beleuchtet. Für alle Untersuchungen wurde eine spezielle Analytik angewendet und weiterentwickelt, die abschließend veranschaulicht wird.

1.1 Phytocannabinoide

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. der Gattung *Cannabis* zählt zur Familie der *Cannabaceae*, eine Familie der bedecktsamigen Pflanzen. Ursprünglich stammt *Cannabis sativa* L. aus Zentralasien, doch heute trifft man sie fast weltweit in gemäßigten bis tropischen Zonen an. Die einjährige, krautartige Pflanze bildet einen Stiel aus, der bis zu 5 m hoch werden kann. Charakteristisch sind ihre handförmig zusammengesetzten Blätter mit gesägtem Rand. Hanf ist eine diözische (zweihäusige) Pflanze. Die weibliche Pflanze (siehe Abbildung 1) ist dichter belaubt und ihre Blüten sind in kompakten Trauben entlang des Stängels an den Blattachsen jedes Blattes zu finden. Bei der männlichen Form hängen die Blütentriebe hingegen in losen Rispen entlang eines eher blattlosen Stängels (Grotenhermen, 2004).

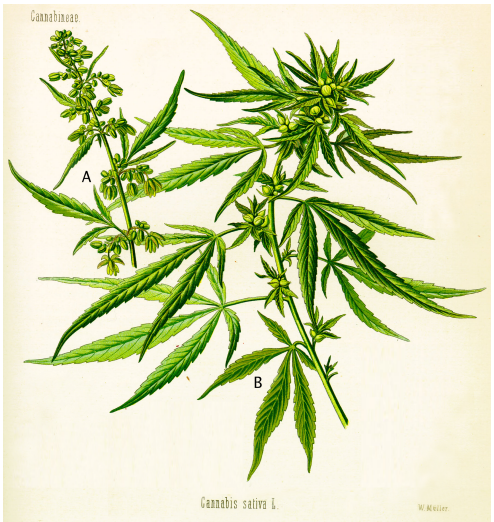


Abbildung 1: Cannabis sativa L. (modifiziert nach Köhler, 1887)

(A) blühende, männliche Pflanze, **(B)** fruchtende, weibliche Pflanze.

Cannabis sativa L. enthält mehr als 480 natürlich vorkommende Inhaltsstoffe verschiedener chemischer Klassen. Dabei bilden die Cannabinoide mit mehr als 70 Vertretern die wichtigste Wirkstoffgruppe der Hanfpflanze (Elsohly und Slade, 2005). Sie zählen

zu der Obergruppe der Terpene und besitzen das für diese Pflanzengattung charakteristische C_{21}-Grundgerüst. Insgesamt unterscheidet man 10 Hauptgruppen von Cannabinoiden sowie weitere Untergruppen (Elsohly und Slade, 2005), wobei im folgenden nur auf die beiden wichtigsten Hauptgruppen eingegangen werden soll.

Die klinisch relevanteste Gruppe der lipophilen Cannabinoide stellt die des Δ^9-*trans*-Tetrahydrocannabinol-Typs dar, dem das wichtigste, psychoaktive Cannabinoid Tetrahy-drocannabinol mit seinem aktivsten Isomer, dem (-)-trans-Δ^9-Tetra-hydrocannabinol (Δ^9-THC) angehört. Aufgrund seiner hohen Lipophilie war die Isolierung von Δ^9-THC aus *Cannabis sativa* L., die erstmals Adams (1940) durchführte, im Gegensatz zu anderen Naturstoffen, die ebenfalls zu den Alkaloiden zählen, erschwert. Die vollständige Strukturaufklärung und Synthese gelang erst 1964 mittels neuer Aufreinigungsmethoden (Gaoni und Mechoulam) und erlaubte erstmals die Durchführung gezielter pharmakologischer Forschung mit definierten Dosen des Wirkstoffes. Die pharmakologischen Effekte von Δ^9-THC sind eine Kombination aus Euphorie, Veränderungen der Wahrnehmung, Appetitstimulation, Analgesie und Sedierung (Iversen, 2000).

Cannabidiol (CBD), quantitativer Hauptbestandteil in Wildpflanzen der *Cannabis sativa* L., und seine strukturverwandten Vertreter bilden die Hauptgruppe der Cannabidiol-Typ Cannabinoide. Cannabidiol wurde ebenfalls 1940 erstmals aus der Hanfpflanze isoliert (Adams et al., 1940). Die vollständige Strukturaufklärung erfolgte 1963 mittels NMR-Spektroskopie (Mechoulam und Shvo) und 1977 mittels Röntgenstrukturanalyse (Jones et al.). Cannabidiol stellt einen, im Gegensatz zu Δ^9-THC, nicht-psychotropen Cannabiswirkstoff dar, der verschiedene Wirkungen in Tierexperimenten und Humanstudien aufweist. Cannabidiol besitzt beispielsweise antikonvulsive, neuroprotektive, anxiolytische, antiinflammatorische und antiemetische Eigenschaften (Mechoulam et al., 2002; Mechoulam et al., 2007). In klinischen Studien zeigte Cannabidiol zudem eine antipsychotische Wirksamkeit (siehe 1.3.31.3.4). Dabei reduzierte es bei schizophrenen Patienten Positiv- und Negativsymptome und wies ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil auf als herkömmliche Antipsychotika (Leweke et al., 2012b; Zuardi et al., 1995; Zuardi et al., 2006b).

Der größte Anteil der Cannabinoide findet sich im Harz der Pflanze. Es sind aber auch in anderen Teilen von *Cannabis sativa* L. größere Mengen der Substanzen vorhanden, wobei die Konzentration von den Blüten über die Blätter bis hin zum Stiel und den Wurzeln immer weiter abnimmt. Im Samen sind keine Cannabinoide enthalten (Ameri, 1999). Einzelne Pflanzen zeigen je nach Standort, Sorte, geographischer Herkunft und den herrschenden Wachstumsbedingungen starke Schwankungen in der Menge und

Zusammensetzung der einzelnen Cannabinoide (Grotenhermen, 2004). Während die traditionelle Cannabispflanze einen durchschnittlichen Δ^9-THC-Gehalt von 5-10 % und bis zu 5 % Cannabidiol aufweist, enthalten die modernen gezüchteten Drogenvarianten bis zu 25 % Δ^9-THC und nur unter 0,5 % Cannabidiol (De Meijer et al., 1992; Grotenhermen, 2004).

Diese natürlich vorkommenden Phytocannabinoide aus *Cannabis sativa* L. wurden zunächst als Cannabinoide bezeichnet. Aufgrund der Identifizierung der Cannabinoidrezeptoren (siehe 1.2.1) und der damit verbundenen Entwicklung von Rezeptorliganden werden nun synthetische Agonisten/Antagonisten an den Cannabinoidrezeptoren und Phytocannabinoide unter dem Begriff der exogenen Cannabinoide zusammengefasst, da sie exogen, das heißt von außen, in den Organismus gelangen und dort ihre Effekte über die Rezeptoren erzielen.

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. zählt vermutlich zu den ältesten Kulturpflanzen, die nicht wegen ihres Nahrungsgehaltes angebaut worden ist (Childers und Breivogel, 1998). Ihr Gebrauch als Nutz- und Heilpflanze, aber auch ihre Anwendung als Genussmittel aufgrund der euphorisierenden und entspannenden Wirkung, reicht Jahrtausende zurück (Hanus, 2009). Den ältesten, archäologischen Beweis liefert ein 12000 Jahre altes taiwanesisches Hanfseil aus Pflanzenstängelfasern. Der älteste dokumentierte medizinische Gebrauch ist die Verwendung von Zubereitungen aus *Cannabis* für zahlreiche Erkrankungen wie z.B. Malaria 2700 vor Christus in China. Die indischen Vedas (2000 v. Chr.) berichten von religiösen Riten, bei denen Cannabis eine Rolle spielte.

Zubereitungen aus *Cannabis* zählen heute weltweit zu den am häufigsten konsumierten illegalen Rauschdrogen. Schätzungsweise 2,8 – 5 % der Weltbevölkerung haben mindestens einmal *Cannabis* verwendet (United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC, 2013). Parallel nimmt das Interesse am therapeutischen Potential von Cannabiszubereitungen stetig zu. Während sich Cannabidiol bisher noch in der klinischen Prüfung (Phase II) befindet, sind Δ^9-THC-Präparate und synthetische Analoga in Deutschland bei verschiedenen Indikationen verschreibungsfähig. Dronabinol, das Stereoisomer (-)-trans-Δ^9-Tetra-hydrocannabinol (Δ^9-THC), darf seit dem 1. Februar 1998 als Rezepturarzneimittel in Kapsel- oder Tropfenform verordnet werden. Nabilon, synthetisches Analogon des Δ^9-THC, ist seit 1983 neben Dronabinol in der Anlage III des Betäubungsmittelgesetzes als verkehrs- und verschreibungsfähig aufgeführt. Im Mai 2011 wurde der Cannabisextrakt von Anlage I der nichtverkehrsfähigen Betäubungsmittel in Anlage III umgestuft (Betäubungsmittelgesetz 1981, Neufassung 1994, zuletzt geändert 2013).

Aufgrund dieser Änderung ist das Medikament Sativex®, bestehend aus Nabiximols (eine Cannabidiol-THC-Mischung aus *Cannabis sativa* L.), in Deutschland zur Behandlung der Spastik bei Multipler Sklerose verschreibungsfähig (Gensthaler und Siebenand, 2011).

Indikationen für eine Therapie mit Dronabinol, Nabilon oder Cannabisextrakt sind Übelkeit und Erbrechen im Rahmen einer Chemotherapie. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Behandlung von Anorexie und Gewichtsverlust bei AIDS-Patienten. Untersuchungen zeigten, dass sowohl Dronabinol als auch *Cannabis* appetitsteigernde, übelkeitsverringernde, stimmungsaufhellende sowie gewichtsstabilisierende Effekte erzielen (Beal et al., 1995; Haney et al., 2005). Zahlreiche Studien am Menschen weisen außerdem auf eine mögliche Anwendung bei Erkrankungen mit Bewegungsstörungen wie beispielsweise das Tourette-Syndrom hin (Muller-Vahl et al., 2003; Zajicek et al., 2005).

1.2 Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem, bestehend aus den Endocannabinoiden, ihren synthetisierenden und abbauenden Enzymen sowie den Cannabinoidrezeptoren, stellt ein höchst komplexes und wichtiges, physiologisches System im Körper dar, das aufgrund seiner Verteilung im gesamten Organismus in vielfältige Stoffwechselfunktionen eingreift. Dabei scheint es vor allem in die Aufrechterhaltung der Homöostase involviert zu sein (Schusdziarra, 2006). Aufgrund der Komplexität ist es nicht möglich alle Funktionen aufzuführen, aber im Folgenden werden einige zentrale Funktionen des Endocannabinoidsystems zusammengefasst erläutert. Im peripheren Nervensystem sind Endocannabinoide durch Neuromodulation an der Regulierung der Schmerzwahrnehmung beteiligt (Iversen und Chapman, 2002). Außerdem beeinflussen sie kardiovaskuläre und gastrointestinale Funktionen (Di Carlo und Izzo, 2003; Randall et al., 2002).

Das Endocannabinoidsystem kontrolliert zudem die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt des Körpers über mannigfaltige zentrale und periphere Mechanismen wie beispielsweise die Synthese von katabolischen (Corticotropin-releasing Hormon) und anabolischen (Neuropeptid Y) Proteinen im Hippocampus sowie die Fettsäure- und Triglyzeridbiosynthese in Adipozyten. Ein hyperaktives Endocannabinoidsystem steht in Zusammenhang mit Adipositas (vgl. Review: Maccarrone et al., 2010). Endocannabinoide sind außerdem in den Zellmetabolismus, -differenzierung, -proliferation und -tod involviert (Guzman et al., 2002).

Im Zentralnervensystem (ZNS) beeinflussen die Endocannabinoide z. B. die synaptische Plastizität. Diese Modulationen resultieren unter anderem in der Regulation

kognitiver Funktionen und Emotionen in neuronalen Netzwerken des Kortex, des Hippocampus und der Amygdala (Cachope, 2012).

1.2.1 Cannabinoidrezeptoren

Mit der Entdeckung des ersten metabotropen Cannabinoidrezeptors im ZNS, dem CB_1-Rezeptor (Devane et al., 1988), war erstmals die Zielstruktur der Cannabinoide wie Δ^9-THC (siehe 1.1) bekannt. Die Entschlüsselung dieser spezifischen Bindungsstelle gelang in kortikalen Hirnmembranen von Ratten mittels Bindungsstudien mit dem Tritiummarkierten, synthetischen CB_1-Rezeptoragonist CP-55,940.

Der CB_1-Rezeptor ist primär im Gehirn lokalisiert, wird aber in geringer Dichte auch in peripheren Gewebe wie z.B. Knochenmark, Herz, Lunge und Milz exprimiert (Galiegue et al., 1995). Außerdem kommen hohe CB_1-Rezeptor-Dichten im enterischen Nervensystem vor (Massa et al., 2005). Im Gehirn ist die CB_1-Rezeptordichte in den Basalganglien (*Substantia nigra*, *Globus pallidus*) und in der Molekularschicht des Kleinhirns am größten. Eine hohe Anzahl ist auch im Hippocampus und im Kortex vorhanden während die Dichte in der Amygdala etwas geringer ist. Im Mittelhirn und Thalamus sind ebenso weniger CB_1-Rezeptoren lokalisiert (Herkenham et al., 1990; Herkenham et al., 1991; Thomas et al., 1992; Tsou et al., 1998). Somit ist die CB_1-Rezeptordichte in Hirnarealen, die unter anderem die Koordination von Bewegungen, sensorische Wahrnehmung, Lernverhalten, Gedächtnis und Emotionen steuern, am höchsten. Diese Rezeptorverteilung stimmt mit dem neuropharmakologischen Profil der Cannabinoide überein (siehe 1.1).

1993 entdeckten Munro *et al.* einen zweiten Cannabinoidrezeptor, den CB_2-Rezeptor. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass CB_2-Rezeptoren vor allem peripher in Organen des Immunsystem lokalisiert sind (Childers und Breivogel, 1998; Munro et al., 1993). Die höchsten Rezeptordichten finden sich dabei in den Randzellen der Milz, auf den Mandeln und auf Immunzellen, vor allem auf B-Lymphozyten, Monozyten und T-Zellen (Galiegue et al., 1995). Die immunmodulatorischen Effekte der Cannabinoide wie z.B. die Regulierung der Immunzellmigration, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation lassen sich auf die Aktivierung des CB_2-Rezeptors zurückführen (Miller und Stella, 2008).

Peripher werden CB_2-Rezeptoren zusätzlich auf den Keratinozyten der Haut exprimiert (Casanova et al., 2003), wo sie vermutlich die Induktion der Apoptose beeinflussen und somit eine protektive Wirkung bei der Entstehung von Hautkrebs haben können. Allerdings zeigen aktuellere Studien, dass der CB_2-Rezeptor auch im Gehirn auf Neuronen und Gliazellen exprimiert wird (Ashton et al., 2006; Gong et al., 2006; Van

Sickle et al., 2005). Interessanterweise fanden Nunez *et al.* CB_2-Rezeptoren auf Mikrogliazellen, die als die einzigen Immunabwehrzellen im Gehirn fungieren (2004).

Die beiden Cannabinoidrezeptoren, CB_1 und CB_2, gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Diese Rezeptoren bestehen aus einer einzigen, stark gefalteten Polypeptidkette, die sich siebenfach in Form von α-Helices durch die Zellmembran windet. Sie leiten ankommende Signale über Guaninnukleotid-bindende (GTP-bindende) Proteine in das Zellinnere weiter und vermitteln eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen.

Der CB_1-Rezeptor, der zu den meist exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Gehirn zählt (Childers und Breivogel, 1998; Howlett et al., 2002), ist etwas größer als der CB_2-Rezeptor und besitzt 72 zusätzliche Aminosäurereste am N-terminalen Ende, 15 in der dritten extrazellulären Schleife und 13 zusätzliche Reste in der C-terminalen Region. Er weist insgesamt eine 44 %ige Sequenzhomologie (sogar bis zu 68 % in den helikalen Regionen) mit dem CB_2-Rezeptor auf (Felder und Glass, 1998). Evolutionär betrachtet ist der CB_1-Rezeptor stark konserviert. Man findet ihn bei Säugetieren, aber auch bei niederen Spezies.

Mittlerweile häufen sich Hinweise, dass neben den beiden beschriebenen CB-Rezeptoren weitere Nicht-CB_1/Nicht-CB_2-Rezeptoren existieren, an denen Cannabinoide ebenso binden (Howlett et al., 2002; Kreitzer und Stella, 2009). In doppelten CB_1-/CB_2-Rezeptor (-/-)/(-/-) Knockout-Mäusen kann Anandamid, ein endogener, partieller Agonist an CB_1- und CB_2-Rezeptoren (siehe 1.2.2), eine Vasodilatation von Mesenterialarterien hervorrufen, die nicht durch etablierte CB_1-/CB_2-Rezeptor Agonisten wie Δ^9-THC erzeugt, aber durch den CB_1-Antagonisten / inversen Agonisten SR141716A aufgehoben wird (Jarai et al., 1999). Kunos und Kollegen (2002) postulierten daher einen neuen SR141716A-sensitiven, non-CB_1, non-CB_2 Cannabinoidrezeptor. Des Weiteren zeigte sich, dass Anandamid und der synthetische Cannabinoid-Agonist WIN 55,212-2 im Gehirn von CB_1-Rezeptor (-/-) knock-out Mäusen über einen unbekannten, G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiv sind (Breivogel et al., 2001). Palmitoylethanolamid, neben Anandamid ein weiteres, endogenes, langkettiges Fettsäureethanolamid (vgl. 1.2.2), induziert in der Maus im Formalin-Pfoten Test antinozizeptive Effekte, die durch SR144528, einen selektiven CB_2-Rezeptor Antagonisten abgeschwächt werden (Calignano et al., 1998). Da Palmitoylethanolamid keine signifikante Affinität zum CB_1- und CB_2-Rezeptor besitzt (Showalter et al., 1996), wird die Existenz eines peripheren, SR144528-sensitiven, non-CB_2 Cannabinoidrezeptors angenommen, über den zusätzlich zu der bekannten analgetischen CB_1-/CB_2-Rezeptor vermittelten Wirkung, eine antinozizeptive Reaktion möglich wird. Solange diese eventuellen, neuen Rezeptorkandidaten nicht molekular

identifiziert und vollständig pharmakologisch getestet werden können, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob sie zur Familie der CB-Rezeptoren gehören. Es besteht die Möglichkeit, dass einige dieser Kandidaten nur neue, bisher unbekannte allosterische Bindungsstellen auf etablierten Rezeptoren, Ionenkanälen oder Enzymen darstellen, die in die Signaltransduktion etablierter Rezeptorsysteme involviert sind.

Der orphane, humane G-Protein gekoppelte Gastrin-releasing Peptid 55 Rezeptor (GPR55) stellt ein weiteres Beispiel für einen putativen Cannabinoidrezeptor dar, der sogar bereits geklont wurde und in Bindungsstudien durch etablierte CB_1-/CB_2-Rezeptor Agonisten wie Anandamid aktiviert wird (Ryberg et al., 2007). Allerdings fehlt ein komplettes, pharmakologisches Profil von GPR55 und seinen Liganden um zu entscheiden, ob es tatsächlich ein Cannabinoidrezeptor ist (Pertwee, 2007).

Phytocannabinoide agieren agonistisch, antagonistisch oder invers agonistisch an CB_1- und CB_2-Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten und erzielen hiermit den größten Teil der bekannten, pharmakologischen Effekte von *Cannabis sativa* L.. Während Δ^9-THC als partieller Agonist sowohl an CB_1- als auch an CB_2-Rezeptoren wirkt (Devane et al., 1988; Munro et al., 1993; Rinaldi-Carmona et al., 1994), bindet Cannabidiol an beiden Rezeptoren nur mit äußerst geringer Affinität (Bisogno et al., 2001; Mechoulam et al., 2007). Die Ergebnisse einer neueren Studie lassen hingegen vermuten, dass Cannabidiol den Effekten der CB_1- und CB_2-Rezeptoren-Agonisten CP-55,940 und WIN 55212-2 in Mausgehirnen und Membranpräparaten entgegenwirkt (siehe 1.3.4) (Thomas et al., 2007), was allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen von Breivogel *et al.* (2001) steht.

Die synthetischen, nichtklassischen Cannabinoide CP-55,940 und WIN 55212-2 wirken voll agonistisch an den CB-Rezeptoren. CP-55,940, das wie bereits erläutert die Entdeckung des CB_1-Rezeptors ermöglichte, wird oft als „Standardagonist“ für die Bestimmung der Rezeptoraffinität verwendet (Howlett et al., 2002; Melvin et al., 1993). Der erste Antagonist / inverse Agonist am CB_1-Rezeptor, SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994), auch bekannt als Rimonabant, war von 2006 bis Oktober 2008 als Appetitzügler zur Behandlung einer Adipositas in Deutschland als Arzneimittel zugelassen. Seitdem ruht die Zulassung aufgrund einer geringeren Wirksamkeit als erwartet und psychiatrischer Nebenwirkungen wie Depressionen und erhöhtem Suizidrisiko.

1.2.2 Endogene Liganden

Durch die Charakterisierung der Cannabinoidrezeptoren war es möglich, ihre körpereigenen Bindungspartner, die sogenannten Endocannabinoide, zu isolieren. Anfang der 90er Jahre wurde der erste, endogene Ligand am CB_1-Rezeptor im Gehirn

des Schweines entdeckt (Devane et al., 1992). Es handelt sich hierbei um das Arachidonsäurederivat Anandamid (Arachidonoylethanolamid, AEA), dessen Name sich von dem indischen Sanskritwort *Ananda* ableitet und sinngemäß „Überbringer von innerer Ruhe und Glückseligkeit" bedeutet.

Das Endocannabinoid Anandamid ist ein Amid aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure und Ethanolamin und zählt strukturell zu den Eicosanoiden, einer Gruppe von ubiquitären, bioaktiven Lipiden, zu denen auch die Prostaglandine gehören. Anandamid ist wie Δ^9-THC ein partieller Agonist an CB_1- und CB_2-Rezeptoren, wobei es eine höhere Affinität zu CB_1 aufweist (Howlett et al., 2002; Kreitzer und Stella, 2009). Es zeigte sich außerdem, dass Anandamid eine geringe Affinität zum ionotropen Vanilloid-Rezeptor Typ 1 (TRPV1) besitzt (Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 1999), der auch durch Capsaicin aktiviert wird und vor allem in inflammatorische Prozesse und Schmerzverarbeitung involviert ist.

1995 wurde ein weiteres Endocannabinoid gefunden, 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG), ein Ester aus Arachidonsäure und Glycerol. Das Eicosanoid 2-AG ist im Gegensatz zu Anandamid sowohl an CB_1- als auch an CB_2-Rezeptoren ein voller Agonist (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Es besitzt zwar eine geringere CB_1-Aktivität als Anandamid, aber liegt im Gehirn in 200 fach höheren Konzentrationen vor und wird daher als natürlicher intrinsischer Ligand an den CB-Rezeptoren postuliert (Childers und Breivogel, 1998; Sugiura und Waku, 2002).

Neben Anandamid und 2-AG existieren zudem noch andere biogenetisch verwandte Eicosanoide wie Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA), die man ebenfalls zu der neuen Klasse der Lipidbotenstoffe zählen kann (Axelrod und Felder, 1998). Diese beiden Ethanolamide rücken mittlerweile immer mehr in den Blickwinkel der Forschung. Sie unterliegen den selben Synthese- und Abbauwegen wie Anandamid (siehe 1.2.3.1; (Schmid und Berdyshev, 2002)). Beide teilen einige cannabimimetische Eigenschaften mit Δ^9-THC, Anandamid und 2-AG, zeigen aber nur sehr geringe bis keine Aktivität an beiden CB-Rezeptoren (Kreitzer und Stella, 2009). Daher sind sie streng genommen nicht als Endocannabinoide zu benennen. In der Literatur findet man daher auch die Bezeichnung Endocannabinoid-ähnliche Substanzen (Maccarrone et al., 2010). Trotz der fehlenden CB-Rezeptorbindung nehmen sie möglicherweise über den so genannten „entourage effect" Einfluss auf das Endocannabinoidsystem (Lambert und Di Marzo, 1999; Lo Verme et al., 2005b). Darunter versteht man die Hemmung des Anandamidabbaus durch PEA (vermutlich auch OEA) und somit die Erhöhung der Anandamidkonzentration im Gehirn. Außerdem werden OEA und PEA als Liganden für die nukleäre Rezeptorklasse Peroxisome-Proliferator-activated Rezeptor-α (PPAR-α) diskutiert (Fu et al., 2003; Fu et al., 2005;

Lo Verme et al., 2005a; Lo Verme et al., 2005b). Dieser Rezeptor wurde bisher vor allem mit dem Lipid- und Lipoproteinmetabolismus, der Oxidation von Fettsäuren in der Leber, der freien Fettsäureoxidation und Ketogenese im Gehirn sowie mit antiinflammatorischen Effekten (Senkung von Zytokin- und TNFα-Konzentrationen im Plasma) in Zusammenhang gebracht (Guerre-Millo et al., 2000; Knauf et al., 2006). PEA aktiviert die Transkription von PPARα-Rezeptoren und weist antiinflammatorische und analgetische Effekte *in vivo* auf, die bei PPARα-Rezeptor (-/-) knock-out Mäusen fehlen (Lo Verme et al., 2005a; LoVerme et al., 2006). OEA wirkt appetitunterdrückend und gewichtsreduzierend durch Bindung am PPARα-Rezeptor und gleichzeitiger Erhöhung der Transkription des Rezeptors (Fu et al., 2003). Zusätzlich fehlt in PPARα-Rezeptor (-/-) knock-out Mäusen der antiinflammatorische Effekt von OEA und seine neuroprotektive Wirkung nach zerebraler arterieller Okklusion, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierung von PPARα dafür verantwortlich ist (O'Sullivan, 2007; Sun et al., 2006).

Eine neuere Studie zeigte, dass Anandamid auch an PPARγ-Rezeptoren bindet (Bouaboula et al., 2005). Neben anderen Effekten (Fettzelldifferenzierung, Aufnahme von Fettsäuren ins Fettgewebe, Fettspeicherung, antiinflammatorische Wirkung) reguliert dieser Rezeptor den Glukosemetabolismus durch Modulation der Insulinsensitivität (Bordet et al., 2006). Es wird spekuliert, dass die PPARγ-Rezeptoren neben den zerebralen PPARα-Rezeptoren Schlüsselfaktoren in der Regulation der Glukosehomöostase darstellen (Knauf et al., 2006) und dass ihre Aktivierung zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität führt (Guerre-Millo et al., 2000; Ye et al., 2001).

Sowohl PEA als auch OEA stellen zudem Liganden des orphanen G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR55 dar (Ryberg et al., 2007), der als neuer, putativer CB-Rezeptor diskutiert wird (vgl. 1.2.1).

1.2.3 Biosynthese und Degradierung der Endocannabinoide

Bei den „klassischen“ Aminosäure-, Amid- oder Peptidbasierten Neurotransmittersystemen werden in der Regel die jeweiligen Transmitter im Zytosol der Neurone synthetisiert, in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei neuronaler Aktivierung in den synaptischen Spalt freigesetzt. Endocannabinoide dagegen können aufgrund ihrer Lipidstruktur nicht in Vesikeln gespeichert werden, sondern werden bei Bedarf aus membranständigen Vorstufen in der Postsynapse synthetisiert und in den synaptischen Spalt ausgeschüttet (Di Marzo et al., 1994; Di Tomaso et al., 1997). Da sie im Gehirn ihre Wirkung in erster Linie an den präsynaptischen CB_1-Rezeptoren entfalten, werden Endocannabinoide auch als retrograde Neurotransmitter bezeichnet (vgl. 1.2.4).

Zudem wirken Endocannabinoide im Gegensatz zu exogenen Cannabinoiden lokal in einem definierten Wirkspektrum und über einen definierten Zeitraum.

1.2.3.1 Anandamid (AEA)

Die postulierte Anandamidbiosynthese (siehe Abbildung 2) wird durch Zellstimulation induziert und erfolgt in zwei enzymatischen Schritten.

Zuerst wird das Vorläufermolekül N-Arachidonoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NAPE) gebildet. Dazu erfolgt ein Transfer der Arachidonsäure (AA) von der sn-2 zur sn-1 Position von Lysophosphatidylcholinen (PC). Es entsteht Diarachidonoyl-PC, das durch Transfer des sn-1 Arachidonoylrests zur freien Aminogruppe von Phosphatidyl-Ethanolamin (PE), in NAPE umgewandelt wird (Cadas et al., 1996; Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Schmid und Berdyshev, 2002). Die Enzyme, die für die Produktion von Diarachidonoyl-PC und NAPE verantwortlich sind, sind bisher noch nicht identifiziert (Ueda et al., 2013). Im zweiten Schritt wird die Synthese von Anandamid aus NAPE durch das Kalziumabhängige, N-Acyl-Phosphatidyl-Ethanolamin-selektive Enzym Phospholipase D (NAPE-PLD) katalysiert, das erstmals 2004 geklont und charakterisiert wurde (Okamoto et al., 2004).

Für die beiden weiteren Fettsäureethanolamide PEA und OEA gilt das gleiche Synthesemodell mit den entsprechenden Ausgangssubstanzen N-Palmitoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NPPE) sowie N-Oleoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (NOPE; Schmid und Berdyshev, 2002).

Es wird angenommen, dass der kontrollierende Schritt der Anandamidbiosynthese die NAPE-Synthese darstellt, da sowohl die Bildung von Diarachidonoyl-Phosphatidylcholin als auch die von NAPE Kalzium-abhängig ist (Piomelli, 2013). Da verschiedene Gewebe von NAPE-PLD (-/-) knock-out Mäusen keine reduzierten Konzentrationen von Anandamid aufweisen, wird davon ausgegangen, dass weitere Biosynthesewege existieren (Leung et al., 2006). Es wird postuliert, dass Anandamid aus Phospho-Anandamid, einem Hydrolyseprodukt von NAPE, entsteht, wobei vermutlich die Protein-Tyrosin-Phosphatase N 22 diese Reaktion katalysiert (siehe Abbildung 2; (Liu et al., 2006; Liu et al., 2008). Ein weiterer möglicher Syntheseweg stellt die, durch die α/β-Hydrolase 4 vermittelte, Abspaltung der *sn*-1 und *sn*-2 Acylgruppen von NAPE dar mit folgender Hydrolyse des Glyzerophospho-Anandamid zu Anandamid (siehe Abbildung 2; (Simon und Cravatt, 2006). Des Weiteren können Anandamid und andere langkettige N-Acyl-Ethanolamine in zellfreien Hirnhomogenaten in zwei Schritten durch Konversion der NAPE in 2-Lyso-NAPE mit Hilfe der Phospholipase A_2 und darauf folgender Reaktion mit der Lyso-Phospholipase D gebildet werden (Sun et al., 2004).

In der Zelle erfolgt der Abbau von Anandamid (Abbildung 2) primär durch die intrazelluläre Fettsäureamidhydrolase (fatty acid amide hydrolase, FAAH), die das Ethanolamid zu Arachidonsäure und Ethanolamin hydrolysiert (Cravatt et al., 1996; McKinney und Cravatt, 2005). Es scheint zwei Isoformen zu geben: FAAH-1 und FAAH-2. Die beiden bioaktiven Fettsäureamide Palmitoylethanolamid und Oleoylethanolamid werden ebenso durch dieses membranständige Enzym abgebaut. FAAH ist im Gehirn vor allem in Zellkörpern und Dendriten lokalisiert. Die Dendriten, die eine hohe Dichte von FAAH enthalten, liegen oft gegenüber von Axonterminalen die vermehrt CB_1-Rezeptoren exprimieren. Dieses komplementäre Verteilungsmuster unterstützt die Hypothese, dass die Endocannabinoide retrograd an den präsynaptischen CB_1-Rezeptoren wirken und anschließend postsynaptisch durch FAAH abgebaut werden (Egertova et al., 2003).

Des Weiteren wurden non-FAAH Amidasen wie das FAAH-Homolog FAAH-2 gefunden, die, außer Anandamid, sämtliche N-Acyl-Ethanolamine degradieren (Wei et al., 2006). Interessanterweise identifizierten Tsuboi *et al.* (2005) das Enzym N-Acylethanolaminsäure-Amidase (NAAA), ein Ceramidase Homolog, das neben FAAH ebenfalls N-Acyl-Ethanolamine hydrolysiert, mit der höchsten Affinität für Palmitoylethanolamid.

Da es allerdings durch genetische und pharmakologische Interventionen, die FAAH hemmen, zu einer hochgradigen Steigerung der Anandamid vermittelten Aktivierung der CB_1-Rezeptoren kommt, scheint FAAH die größte Rolle bei der Degradierung von Anandamid zu spielen (Cravatt et al., 2001; Kathuria et al., 2003).

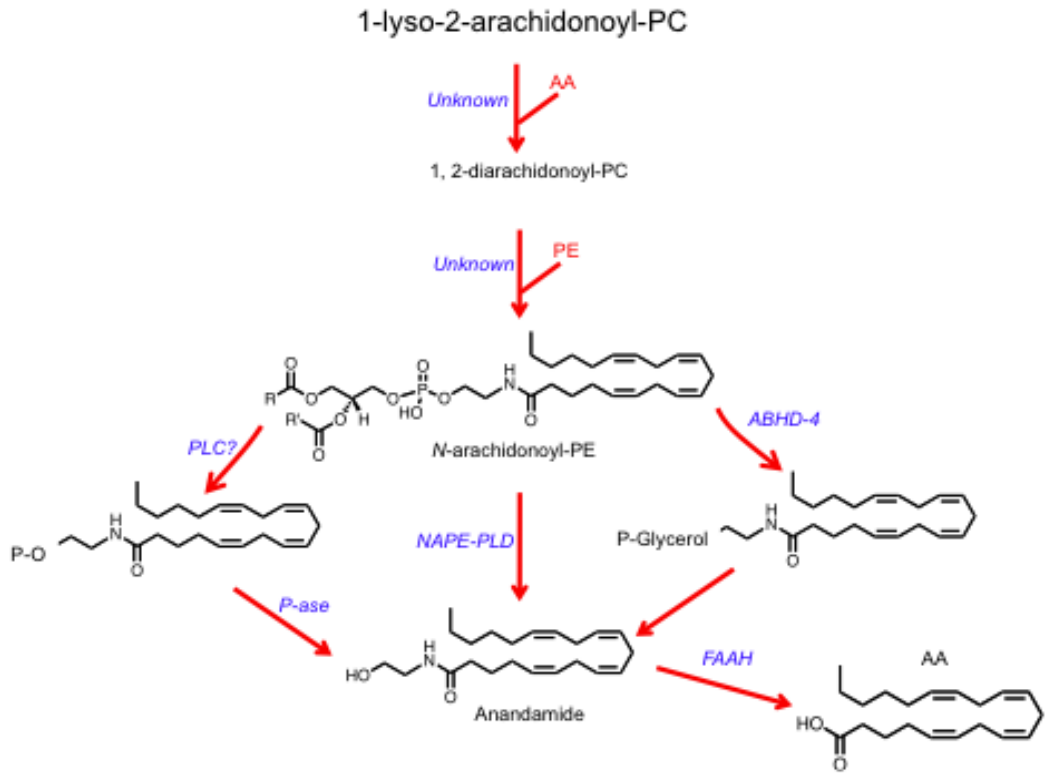


Abbildung 2:
Postulierte Synthese- und Abbauwege von Anandamid (Piomelli, 2013)

Die Synthese von *N*-arachidonoyl-PE (NAPE) verläuft dabei in zwei Schritten. Zuerst wird eine Arachidonsäuregruppe (AA), die in verschiedenen Phospholipiden der Zellmembran vorkommt, von der *sn*-2 Position an die *sn*-1 Position von lyso-Phosphatidylcholinen (PC) transferiert, die nur in geringer Menge in der Membran vorliegen. Es entsteht Di-arachidonoyl-Phosphatidylcholin, das wiederum die *sn*-1 Acylkette an die freie Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) abgibt und so Kalziumabhängig den membranständigen Phospholipidvorläufer NAPE generiert. Da Zellen eine zu geringe Menge an NAPE aufweisen, um bei länger andauernder Stimulation Anandamid bereitzustellen, muss dieses Vorläufermolekül bei Bedarf schnell produziert werden. Die Enzyme zur Bildung von NAPE sind noch nicht identifiziert. Die Synthese von Anandamid aus NAPE kann prinzipiell über die drei dargestellten Wege erfolgen, wobei der mittlere der allgemein anerkannte ist. Dabei wird NAPE an seiner Phosphodiesterbrücke, vermittelt durch die NAPE-PLD, in Phosphatidat und Anandamid, das dabei in den Extrazellulärraum gelangt, gespalten. Der Abbau von Anandamid erfolgt intrazellulär durch FAAH.

1.2.3.2 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG)

2-AG ist als Monoacylglycerol ein multifunktionelles Zwischenprodukt des Lipidstoffwechsels. Es kann sowohl Endprodukt einer Synthesekette sein, als auch Ausgangsprodukt für weitere Lipide. Daraus erklärt sich seine hohe Zellkonzentration im Vergleich zu Anandamid.

Im ersten Schritt der Synthese von 2-AG (siehe Abbildung 3), die ebenso wie die Anandamidsynthese Kalzium-abhängig ist, wandelt Phospholipase C β (PLC-β) Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in 1,2 Di-acyl-glycerol (DAG) um. DAG wird dann durch Diacylglycerol-Lipase DGL-α hydrolysiert, wobei 2-AG entsteht (Bisogno et al., 2003; Piomelli et al., 2000; Stella et al., 1997). 2-AG kann auch durch die Hydrolyse von Lysophospholipiden oder Triacylglycerolen synthetisiert werden (Piomelli et al., 1998).

Obwohl manche Ergebnisse darauf hinweisen, dass FAAH auch eine Rolle bei der Degradierung von 2-AG spielt (Goparaju et al., 1998), erfolgt der Abbau des intrazellulären 2-AG (siehe Abbildung 3) *in vivo* primär durch die Monoacylglycerol-Lipase (MGL), eine Serinhydrolase, die 2-AG zu Arachidonsäure und Glycerol hydrolysiert (Di Marzo, 2006; Dinh et al., 2002; Karlsson et al., 1997). MGL ist ebenfalls im Gehirn weit verbreitet, scheint jedoch im Gegensatz zu FAAH meist präsynaptisch lokalisiert zu sein. Das im Zytosol lokalisierte Enzym kann temporär an die Membran binden. Durch die Kolokalisation von MGL und den präsynaptischen CB_1-Rezeptoren, kann 2-AG effizient an seinem Hauptwirkort hydrolysiert werden und muss nicht wie Anandamid einen weiteren Weg zum Abbauort zurücklegen (siehe 1.2.4.1; (Gulyas et al., 2004)).

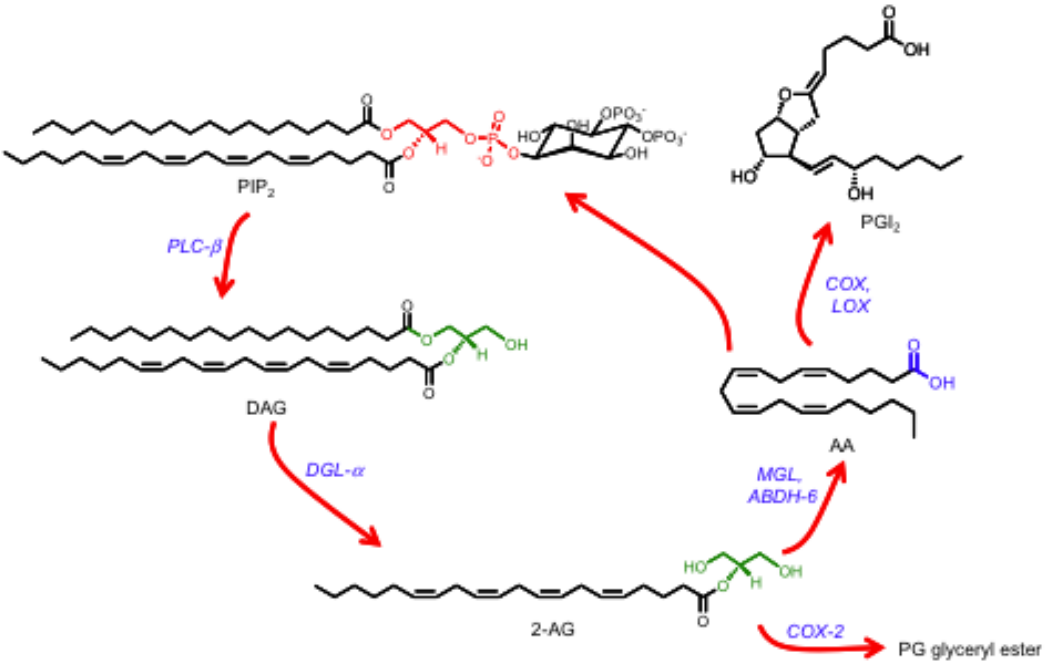


Abbildung 3:
Postulierte Synthese- und Abbauwege von 2-AG (Piomelli, 2013)

Die 2-AG-Biosynthese erfolgt aus Phosphatidylinositol (4,5)-Biphosphat (PIP2), einem Phospholipid der Plasmamembran, das unter Katalyse durch die Phospho-lipase Cβ (PLCβ) in die beiden sekundären Boten-stoffe 1,2-Diacyl-glycerol (DAG) und Inositol (1,4,5)-Trisphosphat (IP3) umgesetzt wird. DAG stellt dann das Substrat der sn-1-selektiven, postsynaptisch membran-gebundenen DAG-Lipase α (DGL-α) dar, die die Bildung von 2-AG katalysiert. Der Abbau von 2-AG erfolgt entweder durch Monoacylglycerol-Lipase (MGL) oder durch α,β-Serinhydrolase ABDH6. Zusätzlich kann es durch COX-2 deoxygeniert werden.

Kürzlich wurden zwei weitere Enzyme, sogenannte α,β-Serinhydrolasen, identifiziert, die 2-AG hydrolysieren: ABDH6 (siehe Abbildung 3) und ABDH12 (Blankman et al., 2007). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, ob ihnen auch *in vivo* eine Bedeutung bei der Degradierung zukommt (Piomelli, 2013). Dafür spricht, dass in Neuronen die 2-AG-Effekte durch Inhibition von ABDH6 verlängert wurden (Jung et al., 2012; Marrs et al., 2010). Alternativ kann 2-AG genau wie Anandamid wegen seiner chemischen Struktur zum Substrat der Enzyme werden, die an der Oxidation der

Arachidonsäure beteiligt sind, wie beispielsweise COX-2 (siehe 1.2.3.1; (Kozak und Marnett, 2002).

1.2.3.3 Pharmakologische Beeinflussung der Endocannabinoid-Synthese und Degradierung

Durch spezifische Hemmung der oben genannten Enzyme können die Endocannabinoidspiegel pharmakologisch moduliert werden.

Die wichtigste Gruppe stellt die der FAAH-Inhibitoren dar. Die meist verwendete Substanz ist das Carbamat-Derivat URB 597, das FAAH durch Carbamylierung des Serin-Restes Ser241 irreversibel inaktiviert (Kathuria et al., 2003). Im Gegensatz zur Vielzahl an FAAH-Inhibitoren existieren bis jetzt nur zwei NAAA-hemmende Substanzen, *N*-cyclohexancarbonylpentadecylamin und (S)-OOPP (Solorzano et al., 2009; Vandevoorde et al., 2003).

Die Hydrolyse von 2-AG durch MGL kann durch den kompetitiven Inhibitor OMDM169 gehemmt werden (Bisogno et al., 2009). Das Carbamat-Derviat JZL184 stellt einen weiteren hochpotenten und selektiveren MGL-Blocker dar (Long et al., 2009). Für die neu entdeckten, 2-AG hydrolysierenden Enzyme ABHD6 und ABDH12 wurden mittlerweile ebenfalls Inhibitoren entwickelt. WWL-70, ein Carbamat-Derivat, hemmt ABDH6 dosisabhängig, während ABDH12 durch den DGL-Inhibitor Tetrahydrolipstatin geblockt wird (Blankman et al., 2007; Li et al., 2007).

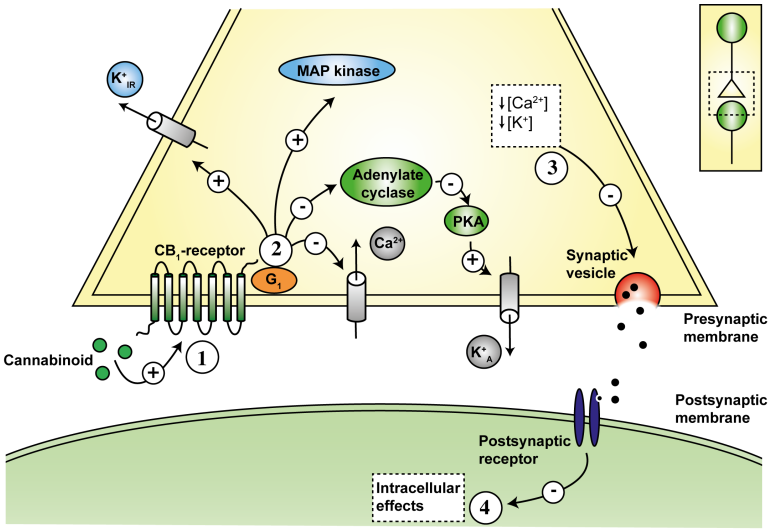
Eine Hemmung der Endocannabinoidsynthese ist nicht möglich, da bisher noch keine zuverlässigen Inhibitoren der verantwortlichen Enzyme entwickelt wurden. Während im Falle von 2-AG die Synthese-Enzyme zumindest schon strukturell identifiziert wurden, sind die Enzyme zur Anandamidbiosynthese noch nicht exakt genug charakterisiert, was eine Entwicklung von Inhibitoren erschwert bzw. unmöglich macht.

1.2.4 Signaltransduktion im Endocannabinoidsystem

Während klassische Neurotransmitter wie Dopamin oder Glutamat von der Präsynapse ausgeschüttet werden und über den synaptischen Spalt zur Postsynapse diffundieren, läuft der Vorgang der Signaltransmission im ZNS für Endocannabinoide genau umgekehrt ab. Endocannabinoide werden als retrograde Transmitter von der Postsynapse synthetisiert, gelangen in den synaptischen Spalt und bewegen sich dann „rückwärts“ zur Präsynapse, wo sie an CB_1-Rezeptoren binden (Freund et al., 2003; Wilson und Nicoll, 2001). Die Aktivierung der CB_1-Rezeptoren (siehe Abbildung 4) resultiert über verschiedene Mechanismen in einer Reduktion der Transmitterausschüttung (Howlett et al., 2002). Zum einen wird die Adenylylzyklase gehemmt, so das es zu einer

verminderten Produktion von cAMP kommt. Dies führt zu einer verminderten Phosphorylierung von K^+-Kanälen des A-Typs und über die damit verbundene Öffnung der Kanäle zu einer Verkürzung der Dauer präsynaptischer Aktionspotentiale. Ein weiterer Effekt der CB_1-Aktivierung ist die direkte G-Protein-vermittelte Aktivierung von einwärts gerichteten K^+_{ir}-Kanälen sowie die Inhibition von L-, N-, P- und Q-spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen. Beide Effekte bewirken eine Verminderung der

Abbildung 4:
Vereinfachte Darstellung der CB_1-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsmechanismen an einer präsynaptischen Nervenendigung (Wegener und Koch, 2009)



(1) Die Aktivierung der CB_1-Rezeptoren durch exogene und endogene Cannabinoide stimuliert die Kopplung mit einem G_i-Protein (2) Dies führt zur Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), zum Schließen von spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen und zum Öffnen von inwärts gerichteten K^+-Kanälen. Durch Hemmung der Adenylylzyklase wird weniger cAMP gebildet, was zu einer Inhibition von Proteinkinase A (PKA) führt. Dadurch wird die PKA abhängige Phosphorylierung von A-Typ K^+-Kanälen vermindert, was in einem erhöhten K^+Ausstrom resultiert. (3) Durch Modulation der zel-lulären Ionenkonzentrationen wird die Neurotransmitterfreisetzung aus den synaptischen Vesikeln gehemmt (4) Durch Beeinflussung der Neurotransmitterfreisetzung wird ebenso die postsynaptische Aktivität moduliert.

neuronalen Erregbarkeit. Außerdem werden verschiedene Kinasen und Phosphatasen stimuliert, wie z.B. mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die zu Veränderungen verschiedener Stoffwechselaktivitäten der Zelle führen können. All diese Mechanismen haben insbesondere eine Reduktion der Glutamat-, Dopamin-, Acetylcholin- und Noradrenalin-Freisetzung zur Folge (Di Marzo et al., 1998; Schlicker und Kathmann, 2001). Endocannabinoide hemmen somit die Ausschüttung exzitatorischer und inhibitorischer Botenstoffe und kontrollieren dadurch neuronale Regelkreise, was zur Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts im Gehirn beiträgt.

Aufgrund der hohen CB_1-Rezeptordichte an synaptischen Verbindungen vieler Gehirnbereiche stellt die Reduktion der Neurotransmitterfreisetzung durch Endocannabinoide einen wichtigen modulatorischen Mechanismus der neuronalen Transmission dar.

Entsprechend der CB_1-Rezeptor-Aktivierung bewirkt auch die Aktivierung des CB_2-Rezeptors die Beeinflussung von Ionenkanälen und somit die Hemmung der Neurotransmission. Es kommt auch zu der für G-Protein gekoppelte Rezeptoren typi-

schen Inhibition der Adenylylzyklase und der damit verbundenen Reduktion von cAMP. Auch eine G-Protein induzierte Aktivierung der MAP-Kinase sowie die Hemmung der Ca^{2+}-Kanäle und Aktivierung der einwärts gerichteten K^{+}_{ir}-Kanäle konnte gezeigt werden (Atwood et al., 2012; Felder et al., 1995; Howlett et al., 2002).

Kürzlich wurde von Jung *et al.* (2012) ein 2-AG Signalosom (siehe Abbildung 5) an exzitatorischen Synapsen des ventralen Striatum und des präfrontalen Kortex, genauer an dem Teil der dendritischen Dornen, der an die postsynaptische Dichte grenzt, identifiziert. Dieser Signalkomplex besteht aus metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR5) sowie den Enzymen PLCβ und DGL-α. Sobald Glutamat aus den exzitatorischen Axonendigungen ausgeschüttet wird und an mGluR5 bindet, erfolgt durch die Nähe zu PLCβ und DGL-α eine schnelle Akkumulation von 2-AG. 2-AG wandert entlang des Konzentrationsgefälles durch den synaptischen Spalt und aktiviert präsynpatische CB_1-Rezeptoren. Dadurch wird die Glutamatausschüttung reduziert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass 2-AG, in der schnellen, retrograden Signalübertragung als Neurotransmitter agiert (Piomelli, 2013).

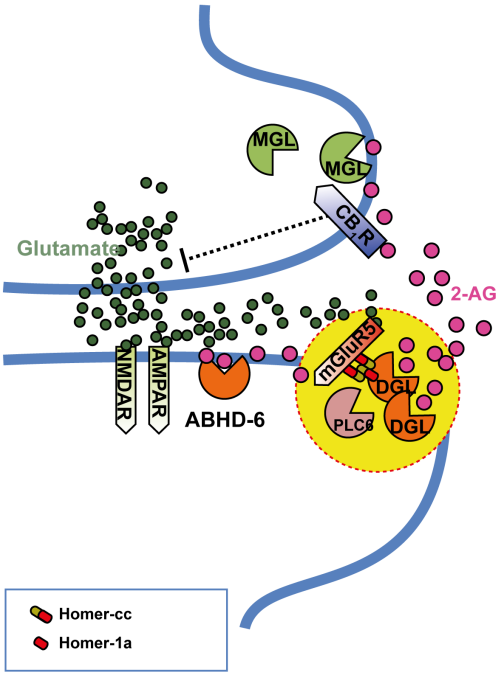


Abbildung 5:
Schematische Darstellung des 2-AG Signalosoms (Piomelli, 2013)
Dieser Komplex an exzitatorischen Synapsen bestehend aus den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR5), den Enzymen Phospholipase C β (PLC-β) und Diacylglycerol-Lipase (DGL-α), die durch Homer Proteine zusammengehalten werden, scheint die schnelle Akkumulation von 2-AG zu regulieren. Dabei wird 2-AG, das den synaptischen Spalt erreicht durch die Monoacylglycerol-Lipase (MGL) abgebaut, während das restliche 2-AG durch die α,β-Serinhydrolase ABDH6 hydrolysiert wird.

Die Aktivierung der CB_1-Rezeptoren durch Endocannabinoide kann sowohl zu kurzzeitigen als auch zu langfristigen Veränderungen synaptischer Aktivität führen. Kurzfristige Veränderungen werden durch verschiedene Formen der sogenannten Kurzzeit-Depression (Depolarisationinduzierte Supression der Inhibition (DSI), Depolarisationinduzierte Supression der Exzitation (DSE)) vermittelt. Eine über Stunden andauernde Veränderung der synaptischen Aktivität ist durch Langzeit-Hemmung (engl. long term depression, LTD) oder durch Langzeit-Potenzierung (engl. long term potentiation, LTP) möglich (Freund et al., 2003; Wilson und Nicoll, 2002). So wird beispielsweise im Striatum LTD durch Aktivierung der präsynaptischen CB_1-Rezeptoren induziert, wobei laut Gerdeman *et al.* (2002) Anandamid wahrscheinlich das verantwortliche Endocannabinoid ist, während in einer neueren Studie 2-AG die entscheidende Rolle

zu spielen scheint (Puente et al., 2011). 2-AG vermittelt außerdem DSE im *Nucleus striae terminalis* durch retrograde Aktivierung der CB_1-Rezeptoren (Puente et al., 2011) sowie DSI im präfrontalen Kortex (Yoshino et al., 2011).

Neben der erwähnten retrograden Signalübertragung der Endocannabinoide im ZNS wurde kürzlich ein autokriner Mechanismus der Signaltransduktion experimentell bestätigt. Endocannabinoide induzieren lokal einen selbsthemmenden Effekt auf die neuronale Aktivität in GABAergen Interneuronen des zerebralen Kortex (Bacci et al., 2004). Auch eine parakrine Signalvermittlung wurde für Endocannabinoide beschrieben, bei der die freigesetzten Endocannabinoide auf die Nachbarzellen wirken (Batkai et al., 2001). Endocannabinoide sind somit sehr vielseitige Signalmoleküle, die in ein großes Spektrum an physiologisch regulatorischen Prozessen involviert sind.

Im Gegensatz zu den Endocannabinoiden können exogene Cannabinoide wie Δ^9-THC diese physiologischen Wirkungen nicht imitieren. Sie verursachen eine langanhaltende Aktivierung sämtlicher CB_1-Rezeptoren in allen Hirnregionen und hemmen die Neurotransmitterausschüttung von allen Nervenendigungen, die CB_1-positiv sind. Die lokal und zeitlich fein abgestimmten Effekte der Endocannabinoide werden so außer Kraft gesetzt. Neuere Studien zeigen außerdem, dass Agonisten an den CB-Rezeptoren funktionell selektiv sein können, indem sie unterschiedliche Signalkaskaden auslösen bzw. unter-schiedlich stark aktivieren können (Bosier et al., 2010). Daher scheint eine selektive Hemmung der Enzyme, die für die Synthese und Degradation der Endocannabinoide verantwortlich sind, eine vielversprechende Alternative zu der bekannten Aktivierung bzw. Deaktivierung der CB-Rezeptoren mittels Agonisten und Antagonisten zu sein, um das System pharmakologisch zu beeinflussen (siehe 1.2.3.3).

1.2.4.1 Endocannabinoidtransporter

Aufgrund der Lipidstruktur stellt sich die Frage, wie Anandamid und 2-AG nach ihrer Synthese in den wässrigen Extrazellulärraum gelangen, wie sie ihn überwinden, um ihren präsynaptischen Wirkort, die CB_1-Rezeptoren zu erreichen und wie sie anschließend wieder in die Zelle zur Degradation aufgenommen werden.

Es ist bekannt, dass sich Phospholipide, die als Vorstufen von Anandamid und 2-AG dienen, in der Zellmembran sehr schnell seitwärts bewegen können. So könnte es möglich sein, dass die Endocannabinoidsynthese nicht im Bereich der Synapse sondern an einem beliebigen Ort in der Zellmembran von Neuronen erfolgt. In diesem Falle müssten die Endocannabinoide den wässrigen Extrazellulärraum nicht überwinden, um als diffusionsfähige autokrine oder parakrine Botenstoffe zu agieren. Sie könnten sich seitlich im Plasmalemma bewegen bis sie auf einen CB_1-Rezeptor

treffen (Piomelli, 2003; Piomelli, 2013). Für diesen Mechanismus spricht der langsame Zeitverlauf der Anandamidproduktion. Allerdings wurden Anandamid und 2-AG auch in der wässrigen Extrazellulärflüssigkeit gefunden, so dass sie die Zelle offensichtlich auch verlassen können (Piomelli, 2003). Die Frage, ob es einen Transportmechanismus für 2-AG und Anandamid gibt, um nach Synthese die Zelle zu verlassen oder ob die Endocannabinoide mit dem letzten Syntheseschritt aus der Membran freigesetzt werden, ist noch nicht beantwortet. Es wird diskutiert, ob bestimmte Lipid-bindende Proteine bei der Freisetzung und beim Transport zum Wirkort mitwirken (Piomelli, 2003).

Beim Abbau durch die verantwortlichen Enzyme stellt sich wieder die Frage wie Anandamid bzw. 2-AG vom Wirkort zum Abbauort gelangen. FAAH, das Hauptdegradierungsenzym von Anandamid, ist postsynaptisch in Dendriten membrangebunden lokalisiert, so dass Anandamid die Strecke vom präsynaptischen Wirkort zum postsynaptischen Abbauort überwinden muss. Nach gegenwärtigem wissenschaftlichen Stand wird angenommen, dass Anandamid nach der Freisetzung im synaptischen Spalt durch einen Protein-vermittelten Transport wieder in die Zelle aufgenommen wird (Beltramo und Piomelli, 2000; Hillard und Jarrahian, 2000). Die Rückaufnahme kann durch eine pharmakologische Blockade des postulierten Anandamidtransporters durch N-(4-hydroxyphenyl)-Arachidonylamide (AM404), aber auch durch das Phytocannabinoid Cannabidiol gehemmt werden (Beltramo et al., 1997; Bisogno et al., 2001; Di Marzo et al., 1994). Diese selektive Inhibition des Anandamidtransports sowie die Sättigungskinetik und Substratspezifität verschiedener Neuronen und Zellen für Anandamid sprechen für einen aktiven Transport und gegen die kontroverse Hypothese einer passiven Diffusion der lipophilen Endocannabinoide durch die Zellmembran. Da allerdings der genaue Mechanismus bisher noch nicht molekular identifiziert wurde, gibt es Autoren, die an seiner Existenz zweifeln (Glaser et al., 2003). Kürzlich wurden zwei Fettsäure-bindende Proteine, FABP 5 und 7, identifiziert, die nach Wiederaufnahme des Anandamid in die Zelle den intrazellulären Transport von der Plasmamembran zum FAAH Enzym ermöglichen können (Kaczocha et al., 2009). Fu *et al*. (2012) fanden zudem eine teilweise zytosolische Variante des FAAH-1 Enzyms, den sogenannten FAAH-like anandamide transporter (FLAT), der Anandamid zwar bindet, aber im Gegensatz zu FAAH nicht degradieren kann, sondern dessen Aufnahme in die Zelle erleichtert. Es ist jedoch immer noch umstritten, ob diese genannten Proteine zur Terminierung des Anandamidsignalwegs beitragen (Piomelli, 2013).

Im Gegensatz zu FAAH ist MGL, das Enzym, das 2-AG abbaut, präsynaptisch lokalisiert, so dass es die 2-AG-Hydrolyse direkt am Wirkort katalysieren kann und 2-AG nicht wie Anandamid zurück zur Postsynapse gelangen muss (Piomelli, 2013).

1.3 Das Endocannabinoidsystem unter pathophysiologischen Bedingungen

Durch seine regulatorische Beteiligung bei vielen, verschiedenen Prozessen im Körper, wird das Endocannabinoidsystem immer mehr zum Ziel von neuen, pharmakologischen Entwicklungen, um verschiedene Krankheiten zu heilen (Di Marzo, 2009). Zahlreiche Tier- und Humanstudien beschreiben die günstigen Auswirkungen von Cannabinoiden bei akuten und chronischen Schmerzen (Pacher et al., 2006). Die bekannte palliative Wirkung der Cannabinoide bei Krebspatienten beruht auf Appetitstimulation, Hemmung des Erbrechens in Folge der Chemo-/Radiotherapie, Schmerzlinderung, Stimmungsaufhellung und Verminderung der Schlaflosigkeit (siehe 1.1; (Walsh et al., 2003)). Eine wichtige Rolle spielt das Endocannabinoidsystem bei vielen Erkrankungen des ZNS, was aufgrund der CB_1-Rezeptorverteilung nicht verwundert und sich auch durch die klassischen Effekte von Δ^9-THC andeutet. Es ist beispielsweise in die Neuroprotektion involviert und zwar sowohl bei akuten, neuronalen Schäden wie Schlaganfall und Epilepsie als auch bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Chorea Huntington und Morbus Parkinson (Glass, 2001). Da Endocannabinoide an der zentralen Regulation von motorischen Funktionen beteiligt sind, können sie bei Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson einen Ansatz für neue Therapien darstellen (Pacher et al., 2006). Die bekannten psychotropen Cannabinoidwirkungen und die Verteilung der CB-Rezeptoren im limbischen System suggerieren zudem die Beteiligung des Endocannabinoidsystem an verschiedenen, psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression und Angststörungen (van der Stelt und Di Marzo, 2003).

1.3.1 Schizophrenie

Schizophrenie gehört zu den häufigsten psychischen Erkrankungen und ist sehr heterogen sowie multimodal. Sie beginnt gewöhnlich im frühen Erwachsenenalter oder in der späten Pubertät (Ban, 2004). Charakteristisch sind neben den so genannten Positivsymptomen wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Denkstörungen die sogenannten Negativsymptome wie Antriebslosigkeit, sozialer Rückzug und Affektverflachung sowie die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen (z. B. Aufmerksamkeits- und Gedächtnisdefizite). Die beiden letztgenannten Bereiche sind in den vergangenen Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da sie

die Prognose der Erkrankung maßgeblich beeinflussen und für das berufliche und soziale Schicksal der Kranken wesentlich folgenschwerer sind als die Positivsymptome (Haefner, 2005). Während die Positivsymptome in der Regel die akute schizophrene Episode definieren, können die auch in dieser Phase bei vielen Patienten erkennbaren aber nicht dominanten Negativsymptome gerade über die Remission der Positivsymptomatik hinaus persistieren. Es können erste Prodromalsymptome der Erkrankung bereits einige Jahre vor der ersten manifesten psychotischen Symptomatik auftreten, bei der initialen Episode durchschnittlich 4,8 Jahre vor Manifestation des Vollbildes der Psychose (Haefner, 2005).

Die Lebenszeit-Prävalenz beträgt etwa 1 %. Das heißt, statistisch gesehen durchlebt jeder Hundertste mindestens einmal im Leben eine psychotische Episode aus dem schizophrenen Formenkreis (Freedman, 2003). Trotz einer günstigeren Prognose seit der Einführung der klassischen und atypischen Antipsychotika sowie psychotherapeutischen und psychosozialen Interventionsmöglichkeiten bleibt die Schizophrenie eine der schwersten psychischen und gesundsheitsökonomisch relevantesten Erkrankungen. Etwa 30 % der Patienten in psychiatrischen Einrichtungen sind Schizophreniepatienten (Gaebel und Müller-Spahn, 2002). Einmalige Erkrankungen sind in 20 – 25 % der Fälle zu beobachten. In der relativen Mehrzahl der Fälle verläuft die Erkrankung episodisch und in etwa einem Viertel der Fälle wird ein schwerer chronischer Endzustand erreicht (Bleuler, 1972; Huber et al., 1980; Watt et al., 1983). Unbehandelt liegt die Rückfallrate innerhalb des ersten Jahres nach Erstmanifestation bei etwa 65 – 70 % (Gaebel und Müller-Spahn, 2002). Mit Einführung der Antipsychotika der zweiten Generation sind diskrete Fortschritte in der Behandlung der Negativsymptomatik und der kognitiven Beeinträchtigungen erzielt worden. Allerdings stellen unerwünschte Wirkungen wie z.B. Sedierung, Gewichtszunahme, Diabetes mellitus Typ II und sexuelle Dysfunktionen, wie sie auch bei Erstgenerationspräparaten häufig zu beobachten sind, noch immer eine große Herausforderung dar. Darüber hinaus sind bis zu 25 % der Patienten als behandlungsresistent anzusehen, so dass ein dringender Bedarf an alternativen psychopharmakologischen Behandlungsansätzen besteht (Leweke et al., 2012a). Die sogenannten typischen Antipsychotika der ersten Generation wirken hauptsächlich durch Blockade dopaminerger D_2-Rezeptoren und zeigen daher die typischen, extrapyramidalen Nebenwirkungen. Die Wirkweise der pharmakologisch heterogenen, zweiten Generation beruht auf der Blockade dopaminerger, serotonerger, cholinerger, adrenerger und histaminerger Rezeptoren, wobei die Substanzen unterschiedliche Rezeptorbindungsprofile und damit sehr verschiedene Wirk- und Nebenwirkungsprofile aufweisen (Frauenknecht et al., 2008). Eine mögliche Verbesserung der

Negativsymptomatik wird vor allem auf die antagonistische Wirkung an den serotonergen ($5HT_2$)-Rezeptoren zurückgeführt (Meltzer und Huang, 2008). Da sich im Wesentlichen die klassischen Neuroleptika in ihrer Wirksamkeit nicht von den atypischen Neuroleptika unterscheiden, hängt die Wahl des Medikaments zur Therapie einer akuten, schizophrenen Episode beim individuellen Patienten unter anderem stark von seinem Nebenwirkungsprofil ab (Lieb, 2008b).

1.3.2 Bipolare Störung

Die bipolaren Störungen zählen zu den häufigen psychiatrischen Erkrankungen und sind unter anderem durch phasenweise Schwankungen der Stimmungslage, des Gefühls und des Antriebs gekennzeichnet. Sie gehen in der Regel mit depressiven oder manischen Phasen einher, auch Mischzustände sind möglich. In der Regel kommt es im Intervall zu vollständiger Remission (Lieb, 2008a). Die strikte Trennung schizophrener von bipolar affektiven Störungen im Sinne von Kraepelin wird in psychiatrischen Fachkreisen gegenwärtig zunehmend in Frage gestellt, da es eine große genetische und symptomatische Überlappung zwischen beiden Krankheitsbildern gibt. Einige Autoren differenzieren zudem schizoaffektive Erkrankungen, die eine Mischung aus gleichzeitig auftretender gestörter Affektivität und schizophrener Symptome bilden sollen (Ashton und Moore, 2011). Hierbei handelt es sich jedoch häufig um ungenaue diagnostische Zuordnungen, da schizoaffektive Störungen gemäß den Forschungskriterien des ICD-10 als seltene Erkrankungen anzusehen sind. Die aktuelle Diskussion tendiert im Gegensatz dazu, die Dichotomie zwischen affektiven und schizophrenen Psychosen aufzugeben, ein Konzept, das bereits lange mit dem Begriff der „Einheitspsychose“ in der Psychiatrie diskutiert wird (Guislain, 1833). Dies wird durch die bereits erwähnten genetischen Studien gestützt, die zeigen, dass bestimmte Dispositionsgene, die das jeweilige Krankheitsrisiko modulieren, für Schizophrenie und Bipolare Störungen überlappen. Diese Überschneidung könnte ein Grund für die ähnliche Pathophysiologie beider Erkrankungen sowie für die klinisch überlappenden Symptome sein (Demjaha et al., 2012). Außerdem beginnen beide Erkrankungen meist in der Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter und zeigen hohe Komorbiditätsraten mit Substanzmissbrauch.

1.3.3 Das Endocannabinoidsystem im Kontext der Schizophrenie

Neben verschiedenen anderen Theorien zur Ätiologie der Schizophrenie wie beispielsweise Umweltfaktoren, Störungen verschiedener Neurotransmitter-systeme wie des Dopamin- und Glutamat-Systems, infektiösen oder autoimmunen Prozessen (Thaker

und Carpenter, 2001), wird auch die Cannabinoid-Hypothese diskutiert (Emrich et al., 1997). Es wird angenommen, dass eine Dysregulation der Liganden des zentralen Endocannabinoidsystems zu einer produktiven schizophrenen Psychose führen kann. Die Hypothese wird durch folgende Befunde gestützt:

(1) Der Konsum einer größeren Menge Cannabis bzw. Δ^9-THC führt bei gesunden Probanden zu einem Zustand, der einer schizophrenen Psychose in Bezug auf Symptome wie beispielsweise positive (Halluzinationen, Wahnvorstellung) und kognitive Störungen ähnelt (D'Souza et al., 2004; Leweke et al., 1999b; Leweke et al., 2000; Spencer, 1971).

(2) Bei Schizophreniepatienten verstärken Cannabiskonsum und Δ^9-THC die psychotischen Symptome (D'Souza et al., 2005).

(3) Die chronische Behandlung pubertärer Ratten mit dem synthetischen CB-Rezeptor-Agonisten WIN 55212-2 führt zu langanhaltenden Defiziten u. a. in der sensomotorischen Filterung, des Arbeitsgedächtnisses und des Sozialverhaltens sowie die Entwicklung einer Anhedonie (Leweke und Schneider, 2011; Schneider und Koch, 2003; Schneider et al., 2008). Diese Defizite werden auch bei Schizophreniepatienten diagnostiziert.

(4) Das Antipsychotikum Haloperidol konnte die in Ratten durch WIN 55212-2 verursachte Störung der sensomotorischen Filterung wieder aufheben (Schneider und Koch, 2003). Ein weiteres Antipsychotikum der 2. Generation, Quetiapin, konnte ebenso die Defizite im Sozialverhalten von Ratten, die pubertär chronisch mit WIN 55212-2 behandelt wurden, wieder normalisieren (Leweke und Schneider, 2011).

Momentan geht man davon aus, dass früher und regelmäßiger Cannabiskonsum bei Personen, die im Sinne des Vulnerabilitäts/Stress-Modells anfällig für die Entwicklung einer Psychose sind, als „biologischer Stressfaktor“ wirkt und die Entwicklung einer Schizophrenie begünstigt (Leweke et al., 2004a). In diesem Modell wird postuliert, dass eine gewisse Prädisposition beim Individuum gegeben sein muss und dann Faktoren wie Stress oder Drogen die Erkrankung auslösen können. Andreasson und Kollegen (1987) stellten dazu in ihrer epidemiologischen Studie fest, dass jugendlicher Cannabiskonsum mit einem 2,4 fach erhöhtem Risiko für Schizophrenie im Erwachsenenalter assoziiert ist, wobei bei Konsumenten, die zuvor mehr als 50 Mal Cannabis konsumiert hatten, sogar ein 6,6 faches Risiko gefunden wurde. Weitere Studien und Metaanalysen bestätigen diese Ergebnisse (Arseneault et al., 2002; Moore et al., 2007; van Os et al., 2002).

Auf Rezeptorebene wurde in Radioliganden-Bindungsstudien eine Veränderung der CB_1-Rezeptordichte in *post mortem* Gehirnen Schizophrener gefunden. Neben einer

erhöhten CB_1-Rezeptorbindung im dorsolateralen präfrontalen Kortex (Dean et al., 2001) wurde eine erhöhte CB_1-Rezeptor-Expression im anterioren zingulären Kortex festgestellt (Zavitsanou et al., 2004). Beide Gehirnregionen spielen eine wichtige Rolle in der Pathologie von Schizophrenie. Im Widerspruch dazu steht eine immunhistochemische Studie, bei der keine Unterschiede in der CB_1-Rezeptordichte im anterioren zingulärem Kortex beim Vergleich schizophrener und gesunder Gehirne gefunden wurde (Koethe et al., 2007). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in der Verwendung von *post mortem* Gehirnen liegen, die keine Unterscheidung in Bezug auf Krankheitszeitpunkt, -dauer, -behandlung zulassen. Hier bieten neuere Positronen-Emissions-Tomographische (PET) Studien den Vorteil, die Patienten in unterschiedlichen Phasen der Krankheit und Therapie zu untersuchen. Mittels CB_1-Rezeptor-Radioliganden wurde ebenfalls eine erhöhte CB_1-Rezeptor-Verfügbarkeit in spezifischen Gehirnregionen festgestellt, die mit Schizophrenie assoziiert sind (Ceccarini et al., 2013a; Wong et al., 2010). Diese Veränderung zeigte sich sowohl bei mit Antipsychotika behandelten als auch bei unbehandelten Patienten versus gesunde Kontrollen, wobei bei den Unbehandelten die höchsten Werte gemessen wurden. Darüber hinaus korrelierte bei erstmanifesten, unbehandelten Schizophreniepatienten die erhöhte CB_1-Rezeptor-Verfügbarkeit negativ mit den Negativsymptomen und Depression (Ceccarini et al., 2013a).

In einer PET-Studie mit Normalprobanden konnte zudem gezeigt werden, dass chronischer Cannabiskonsum in einer reversiblen und regional selektiven Herunterregulierung der kortikalen CB_1-Rezeptorverfügbarkeit resultiert (Hirvonen et al., 2012). Ceccarini *et al*. (2013b), die in einer weiteren PET-Studie mit chronischen Cannabiskonsumenten einen anderen CB_1-Rezeptor Liganden verwendeten, fanden ebenso in verschiedenen Hirnregionen eine Herabregulierung der CB_1-Rezeptorverfügbarkeit. Dies weist auf eine Erniedrigung der CB_1-Rezeptordichte hin, die eine Art Toleranzentwicklung reflektieren könnte. Resultat einer verringerten CB_1-Rezeptordichte ist allerdings nicht nur eine Toleranz gegenüber exogenen Cannabinoiden, sondern auch, dass das Endocannabinoidsystem auf Rezeptorebene nicht mehr regulierend eingreifen kann. Im *Liquor cerebrospinalis* (CSF) konnte folglich nachgewiesen werden, dass Cannabisgebrauch auch die Anandamidkonzentrationen in CSF beeinflusst. Bei Schizophreniepatienten, die sehr wenig Cannabis in ihrem Leben konsumiert haben, war Anandamid 10 fach erhöht gegenüber Schizophreniepatienten mit höher frequentem Cannabiskonsum sowie gegenüber gesunden Probanden mit niedrigem oder hohem Cannabiskonsum (Leweke et al., 2007). Es scheint, dass durch Cannabisgebrauch das bei Schizophreniepatienten normalerweise adaptiv hochregulierte Anandamidsignalsystem herabreguliert wird,

während es bei gesunden Probanden mit hohem Cannabiskonsum unbeeinflusst bleibt.

Neben der Rezeptordichte scheint wie erwähnt auch die Konzentration des Endocannabinoids Anandamid bei Schizophrenen verändert zu sein. Bei unbehandelten, erstmanifesten paranoiden Schizophrenen waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen die Anandamidspiegel in CSF erhöht und korrelierten negativ mit den psychotischen Symptomen der Patienten (Giuffrida et al., 2004; Leweke et al., 1999a). Die zentralnervöse Anandamidfreisetzung scheint ein adaptiver Mechanismus zu sein, der bei akuten Psychosen Neurotransmitterveränderungen entgegenwirkt. Je nach Art der medikamentösen Behandlung kann diese körpereigene Reaktion beeinflusst werden. Während Patienten, die mit atypischen Antipsychotika behandelt wurden, die zusätzlich zu den D_2-Rezeptoren vorwiegend den $5HT_{2A}$-Serotoninrezeptor antagonisieren, ebenfalls erhöhte Anandamidspiegel aufwiesen, scheinen die typischen D_2-Dopaminrezeptor-antagonisierenden Antipsychotika den Anandamidspiegel herunterzuregulieren, da man bei dieser Patientengruppe keine Erhöhung feststellen konnte und sie sich nicht von den gesunden Kontrollen unterschied. Eine der bereits genannten PET-Studien (Ceccarini et al., 2013a) zeigte allerdings auch, dass die Behandlung mit atypischen Antipsychotika, neben ihrer bekannten Wirkung auf Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren, die CB_1-Rezeptorverfügbarkeit in verschiedenen Hirnregionen moduliert. Zum einen veränderte die Therapie die CB_1-Rezeptorverfügbarkeit im mesokortikalen-mesolimbischen System. Zum anderen war wie erwähnt nur bei unbehandelten Schizophrenen die CB_1-Rezeptorverfügbarkeit mit der Negativsymptomatik korreliert.

Interessanterweise konnte bei Patienten im initialen Prodromal-Stadium (IPS) ebenso eine Erhöhung der Anandamidspiegel in CSF nachgewiesen werden (Koethe et al., 2009a). Dabei gingen IPS-Patienten mit einer geringeren Anandamidkonzentration häufiger und früher in eine akute Schizophrenie über. Eine Veränderung der Synthese bzw. des Abbaus von Anandamid scheint also schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung vorzuliegen.

Die genannten klinischen Befunde in CSF werden durch tierexperimentelle Arbeiten gestützt. So stimulierte neurale Aktivität die Freisetzung von Anandamid im dorsalen Striatum von Ratten, die durch einen lokal applizierten D_2-Rezeptoragonisten noch verstärkt wurde (Giuffrida et al., 1999). Außerdem wurde nach einer Vorbehandlung mit einem CB_1-Antagonisten die motorische Aktivität der Ratten, ausgelöst durch systemische Gabe des D_2-Rezeptoragonisten, verstärkt. Eine Hemmung des Anandamidtransports mittels AM 404 erzielte hingegen den umgekehrten Effekt, eine Abnahme der motorischen Aktivität (Beltramo et al., 2000).

Nimmt man die verschiedenen Befunde zusammen, so scheint das Endocannabinoidsystem ein inhibitorischer Feedback-Mechanismus zu sein, der der dopaminergen Aktivierung entgegenwirkt.

1.3.4 Cannabidiol - ein potentielles Antipsychotikum

Während das psychotrope Δ^9-THC wie bereits in 1.3.3 erläutert psychiatrische Störungen bei vulnerablen Personen hervorrufen kann, scheint das ebenfalls in der Cannabispflanze vorkommende Cannabidiol antipsychotisch zu wirken. Aufgrund dessen wird diese nicht-psychotrope Cannabiskomponente als vielversprechende Substanz für eine alternative Schizophreniebehandlung angesehen (Leweke et al., 2012b; Zuardi et al., 2006a; Zuardi et al., 2006b).

Hinweise auf die antipsychotischen Wirkungen lieferten zunächst einige Heilversuche (Zuardi et al., 1982; Zuardi et al., 1995; Zuardi et al., 2006b). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Cannabidiol sowohl Positiv- als auch Negativsymptome, kognitive Einschränkungen und allgemeine Symptome wie z. B. Angst reduziert. Da diese Befunde nur anhand einer geringen Probanden-/ Patientenzahl gewonnen wurden, wurde von Leweke und Kollegen (2012b) die erste doppelblinde, randomisierte Studie mit 42 Schizophrenen durchgeführt. Cannabidiol reduzierte die psychotischen Symptome im gleichen Maße wie die Kontrollsubstanz Amisulprid (Goldstandard). Allerdings traten bei der Cannabidiol-Behandlung signifikant weniger Nebenwirkungen auf. Die Patienten zeigten keine relevante Gewichtszunahme, keine Erhöhung des Prolaktinspiegels und keine extrapyramidale Symptome.

Der Wirkmechanismus von Cannabidiol ist noch nicht genauer bekannt. Wie in 1.2.1 beschrieben, scheint es nur mit geringer Affinität an die beiden CB-Rezeptoren zu binden. In Zellkulturen und Membranpräparationen scheint Cannabidiol zum einen mit gleicher Effizienz wie Capsaicin an den humanen TRPV1 zu binden und zum anderen sowohl die zelluläre Wiederaufnahme als auch die Anandamidhydrolyse zu inhibieren (Bisogno et al., 2001).

Zudem konnte gezeigt werden, dass in hippokampalen Zellkulturen von Ratten eine Cannabidiol-Gabe zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führt und dass dieser Anstieg in Anwesenheit von Anandamid oder 2-AG reduziert ist (Ryan et al., 2007). Daher wird postuliert, dass durch den intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg die Synthese von Anandamid und 2-AG erhöht wird und sich die erhöhten Endocannabinoidkonzentrationen schließlich negativ modulierend auf den Cannabidiol-Effekt im Sinne der Reduktion der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auswirken.

Die antipsychotische Wirkung von Cannabidiol entsteht wahrscheinlich durch Hochregulation des Endocannabinoidssytems via FAAH-Hemmung. Dafür sprechen

die Befunde der letztgenannten, ersten kontrollierten, doppelblind durchgeführten randomisierten klinischen Studie, bei der es unter Cannabidiolgabe zum Anstieg des Anandamidspiegels im Serum kam (Leweke et al., 2012b). Die erhöhten Anandamidkonzentrationen waren signifikant mit einer ebenfalls signifikanten Reduktion der psychotischen Symptomatik assoziiert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben der FAAH-Blockade auch andere Wirkmechanismen zur Reduktion der psychotischen Symptome beitragen.

1.4 Zwillingsstudien im Kontext der Schizophrenie

Der Vergleich von eineiigen (monozygoten) und zweieiigen (dizygoten) Zwillingen in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal kann Aufschluss darüber geben, ob dieses eher von der Umwelt oder genetisch beeinflusst wird. Wenn monozygote Zwillinge dabei verglichen mit dizygoten eine hohe Konkordanz aufzeigen, spricht das für einen genetischen Einfluss in Bezug auf das Merkmal. Neben dieser systematischen Analyse von mono- und dizygoten Zwillingspaaren stellt der Vergleich diskordanter, monozygoter Zwillinge ein wichtiges Studiendesign dar, um krankheitsbedingte, biologische Veränderungen zu identifizieren. Der einzigartige Vorteil dieser Ko-Zwilling Kontrollstudien ist die Möglichkeit, biologische Diskordanz vor dem äquivalenten genetischen Hintergrund zu untersuchen (van Dongen et al., 2012). Ein weiterer Nutzen besteht in der Unterscheidung von Risikofaktoren, die mit bestimmten generellen Merkmalen einhergehen und den Faktoren, die direkt mit dem Krankheitsstadium zusammenhängen (Boomsma et al., 2002). Die Kombination von klassischen Zwillingsstudien und neuen Technologien stellt einen wichtigen Ansatz dar, um neue molekulare Signalwege komplexer Krankheiten und Phänotypen zu identifizieren und zu verstehen.

Trotz der Heterogenität zahlreicher Zwillingsstudien zeigen meta-analytische Daten eine Übereinstimmung der Studien im Hinblick auf Schizophrenie als komplexe Erkrankung, die sowohl aus genetischen als auch aus Umwelteinflüssen resultiert (Sullivan et al., 2003). Die Metaanalyse von 12 Zwillingsstudien kommt zu dem Schluss, dass Schizophrenie im Mittel zu 81 % durch erbliche Faktoren bedingt wird (95 %-Konfidenzintervall: 73-90 %), während Umweltfaktoren im Mittel nur zu 11 % (95 %-Konfidenzintervall: 3-19 %) die Entstehung der Erkrankung beeinflussen. Wenn eine gegebene Messgröße vor allem mit einem erblichen Risiko und nicht mit dem Krankheitsstadium verbunden ist, sollte sie bei beiden diskordanten Zwillingen nachweisbar sein.

Unterteilt man die komplexe multifaktorielle Erkrankung Schizophrenie in kleinere Einzelkomponenten, sog. intermediäre Phänotypen (siehe 1.5), fällt auf, dass sowohl

beim kranken als auch beim gesunden monozygoten Zwilling in zahlreichen Studien ähnliche Veränderungen auftreten. So wiesen an Schizophrenie erkrankte sowie ihre gesunden monozygoten Zwillinge verglichen mit gesunden Kontrollzwillingen ein vermindertes Volumen des Gesamtgehirnes sowie der Frontal- und Temporallappen auf (Brans et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde eine Verminderung des Hypothalamusvolumen bei diskordanten Zwillingen gezeigt (Koolschijn et al., 2008). Dabei ähnelten sich die Befunde der monozygoten Zwillingspaare stärker als die der dizygoten Zwillinge, was auf einen genetischen Einfluss hindeutet. Des Weiteren wurde eine erhöhte Dopamin (D_2)-Rezeptorverfügbarkeit im *Nucleus caudatus* bei nicht erkrankten monozygoten Ko-Zwillingen im Vergleich zu nicht erkrankten dizygoten Ko-Zwillingen und gesunden Kontrollzwillingen festgestellt (Hirvonen et al., 2005). Dabei war eine höhere D_2-Rezeptorverfügbarkeit auch mit einem schlechteren Abschneiden bei kognitiven Tests assoziiert.

Im Gegensatz dazu sollte eine Messgröße, die sich nur auf das Krankheitsstadium bezieht, Unterschiede zwischen den monozygoten diskordanten Zwillingen aufzeigen. So wurde beispielsweise kein Beweis für eine Beziehung zwischen einem erhöhtem genetischen Risiko für Schizophrenie und einem veränderten D_1/D_2-Rezeptor-Gleichgewicht im Striatum gefunden, da die nicht erkrankten Ko-Zwillinge keinerlei diesbezügliche Veränderungen aufwiesen (Hirvonen et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden Endocannabinoide und verwandte Fettsäureethanolamide im Plasma bei monozygoten diskordanten Zwillingen analysiert (siehe 4 und 5). Eine Ähnlichkeit der Lipidkonzentrationen beider diskordanter Zwillinge kann Aufschluss geben, ob diese Messgröße genetisch beeinflusst wird oder im Wesentlichen auf das Krankheitsstadium bezogen ist.

1.5 Tierexperimentelle Studien

Tierexperimentelle Untersuchungen bieten gegenüber klinischen Studien am Menschen einige Vorteile, die teilweise auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden. Um die biologischen Grundlagen einer Krankheit zu erforschen, sind oftmals invasive Methoden notwendig, die in humanen Versuchen nicht möglich wären. So können beispielsweise Gehirnmembranpräparationen der Ratte verwendet werden, um die Wirkweisen neuer potentieller Medikamente wie Cannabidiol detaillierter zu erforschen (siehe 8 und 9). Vergleichbare Bedingungen für alle Versuchstiere minimieren den Einfluss der Umwelt. Außerdem können longitudinale Studien vor und nach einer Krankheit erfolgen.

Komplexe Krankheiten wie Schizophrenie können aufgrund humanspezifischer Symptome nur in einzelnen Aspekten, sogenannten Endophänotypen, tierexperi-

mentell abgebildet werden (Koch, 2006). Neben den Endophänotypen, die sich gegebenenfalls auf einzelne Gene zurückführen lassen, existieren intermediäre Phänotypen, die einen multifaktoriellen Ursprung haben können und durch Umwelt, Epigenetik etc. beeinflusst werden (Gould und Gottesman, 2006). Das Konzept der Endophänotypen erleichtert nicht nur die Entwicklung von adäquaten Tiermodellen, sondern kann auch bei der Suche nach Biomarkern zu Diagnosezwecken herangezogen werden. So könnten beispielweise veränderte Endocannabinoidkonzentrationen einen neuen, intermediären Phänotyp für Schizophrenie beschreiben (siehe 1.4).

1.6 Analytik der Endocannabinoide

Um das Endocannabinoidsystem besser zu verstehen, ist eine Quantifizierung der Endocannabinoide sowie strukturverwandter Substanzen in biologischen Matrices von essentieller Bedeutung. Die meisten Methoden beschränken sich hierbei auf die Bestimmung von Anandamid und 2-AG (Zoerner et al., 2011). Diese Fettsäurederivate sind lipophile Verbindungen und aufgrund der Amid- bzw. Glycerolgruppe in Wasser schwer löslich.

Im Rattengehirn liegen die Konzentrationen von Anandamid zwischen 1 und 100 pmol/g während die 2-AG-Konzentrationen 100-1000 fach höher sind (Bisogno et al., 1999; Richardson et al., 2007). Deutlich niedriger sind die Konzentrationen hingegen im Rattenplasma sowie im humanen Plasma gesunder Probanden. Sie liegen für Anandamid < 5 nM und für 2-AG zwischen 1 nM und 20 nM (siehe Review: Zoerner et al., 2011). Die OEA-und PEA-Konzentrationen sind mit denen von 2-AG vergleichbar: im Plasma werden OEA-Werte zwischen 1 und 10 nM und PEA-Spiegel zwischen 5 und 70 nM beobachtet (Balvers et al., 2009; Giuffrida und Piomelli, 1998a; Schreiber et al., 2007). Im Gewebe sind die OEA- und PEA-Konzentrationen ebenfalls deutlich höher, wobei für OEA Werte zwischen 10 und 500 pmol/g und für PEA Werte zwischen 50 und 1000 pmol/g gemessen werden (Koga et al., 1997; Williams et al., 2007). Die extrem niedrigen Konzentrationen in biologischen Flüssigkeiten und Geweben erschweren die Quantifizierung und bedingen standardisierte Abläufe zur Probenhandhabung.

Voraussetzung für die Bestimmung der Analyte ist ihre Extraktion aus der Matrix. Grundlage bildet die klassische Lipidextraktion mit internen Standards nach Folch und Kollegen (1957) sowie nach Bligh und Dyer (1959), bei der die Proben mit organischen Lösungsmitteln versetzt werden, um die Lipide zu eluieren. Für die Endocannabinoidanalytik wurde die Methode in Bezug auf die verwendeten Eluenten vielfach modifiziert (Richardson et al., 2007; Tan et al., 2009). Vorteil dieser Methode

ist, neben Beseitigung hydrophiler Substanzen, die Aufkonzentrierung der Fettsäurederivate. Nachteilig ist der Analytverlust der ohnehin schon niedrig konzentrierten Endocannabinoide bedingt durch viele verschiedene Extraktionsschritte und der damit verbundene Zeitaufwand.

Eine alternative Methode zur Isolierung der Substanzen aus Matrices ist die Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE), die komplett automatisiert werden kann und somit für Hochdurchsatz-Analysen (engl. high-throughput analysis) geeignet ist. Dabei werden die Endocannabinoide in der biologischen Matrix entweder in polaren Lösungsmitteln gelöst, auf eine lipophile Säule (z. B. C18-Säule) geladen und nach dem Waschen der Säule mit einem polarem Lösungsmittel eluiert (Umkehrphasen-SPE; Hardison et al., 2006; Marczylo et al., 2009) oder sie werden in lipophilen Lösungsmitteln auf eine polare Säule geladen (Silicagel-Säule), gewaschen und mit lipophilen Eluenten gelöst (Normalphasen-SPE; Fontana et al., 1995; Richardson et al., 2007). Ein Vorteil der SPE-Technik ist die Zeitersparnis bedingt durch wenige, einfache Extraktionsschritte. Der Nachteil ist die teilweise geringe Ausbeute der Analyte in Abhängigkeit vom SPE-Material.

Die der Extraktion nachfolgende Bestimmung der Substanzen setzt immer eine möglichst effiziente Aufreinigung der Proben voraus, da die hohe Anzahl anderer, endogener Lipide und niedermolekularer Verbindungen die sensitive Messung stören kann.

Sowohl die gewählten Parameter für die Lipid- /Festphasenextraktion und Aufreinigung als auch die Bedingungen bei der Probengewinnung und Lagerung haben einen großen Einfluss auf die Ausbeute der Analyte und erklären die hohe Variabilität der absoluten Endocannabinoidkonzentrationen in verschiedenen Studien (Buczynski und Parsons, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Extraktion der Endocannabinoide und verwandter Fettsäureethanolamide aus Plasma eine Methode verwendet, die an die bereits genannte Lipidextraktion von Folch *et al.* angelehnt ist (Giuffrida und Piomelli, 1998a). Für die Analyse der Endocannabinoide im Gewebe wurden die Proben zusätzlich nach erfolgter Lipidextraktion mittels Normalphasen-SPE weiter aufgereinigt, da es aufgrund der höheren Dichte viel größere Mengen an Störsubstanzen enthält als Flüssigkeiten wie Plasma (Fegley et al., 2005).

Zur Quantifizierung endogener Cannabinoide in biologischen Proben wurden über die Jahre verschiedene Analysenmethoden entwickelt. Die meisten Ansätze basieren auf der Kopplung von massenspektrometrischer Detektion mit Gaschromatographie (GC-MS) oder Flüssigkeitschromatographie (LC-MS), da diese Techniken eine hohe Sensitivität und Selektivität im pM/ nM Messbereich besitzen. Vorteil einer

gaschromatographischen Methode ist die schnellere und bessere Trennung wobei die Analyten allerdings chemisch derivatisiert werden müssen. In der Literatur werden in Bezug auf Endocannabinoidmessungen überwiegend flüssigkeitschromatographische Auftrennungen beschrieben, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, da hier keine Derivatisierung nötig und die Methoden aufgrund der Simplizität auch für high-throughput Analysen geeignet sind (Buczynski und Parsons, 2010).

Die angewandte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatographie, HPLC) ist eine Methode zur Stofftrennung, bei der die mobile Phase (Laufmittel) eine Flüssigkeit ist und die stationäre Phase sich in einer Trennsäule befindet. Die Probenflüssigkeit wird nach der Injektion mittels der mobilen Phase über die stationäre Phase gepumpt. Dabei werden die Probenkomponenten in der Flüssigkeit gelöst und gehen aufgrund unterschiedlicher Polaritäten, Löslichkeiten oder Molekülgrößen Wechselwirkungen mit der Trennsäule ein. Somit kommt es je nach Substanz zu einer unterschiedlichen Verzögerung der Bewegung auf der stationären Phase und damit zu unterschiedlichen Elutions- bzw. Retentionszeiten (Dominik and Steinhilber, 1996).

Die Trennleistung einer Säule hängt von ihrer Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind, desto höher ist die Trennleistung. Meist liegen Partikelgrößen von 3 µm vor. Aufgrund der resultierenden hohen Packungsdichte der Säulenfüllung muss die mobile Phase mit einer Hochdruckpumpe durch die Säule gepresst werden.

Es können zwei Elutionsmethoden eingesetzt werden. Bei isokratischer Elution bleibt die Zusammensetzung des Laufmittels über die gesamte Zeit konstant. Bei der Gradientenelution wird die Polarität des Laufmittels kontinuierlich durch Änderung der Laufmittelzusammensetzung modifiziert (Dominik und Steinhilber, 1996). Da Substanzen unterschiedlicher Polarität mit der Gradientenelution schneller und besser von der stationären Phase getrennt werden, wurde dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die zwei häufigsten HPLC-Trennverfahren sind die Normalphasen- und die Umkehrphasen (reversed phase, RP)-HPLC (Dominik und Steinhilber, 1996). In dieser Arbeit wurde RP-HPLC angewendet, die gebräuchlichste Methode zur Endocannabinoidanalytik, die die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Komponenten in der mobilen und stationären Phase nutzt. Als mobile Phase dienen Mischungen polarer Lösungsmittel wie beispielsweise die in der vorliegenden Arbeit verwendete Wasser/Methanol Mischung. Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Lösungsmittel mit höchster Reinheitsstufe (LC-MS grade) verwendet werden. Die stationäre Phase besteht aus einer polaren Kieselgelmatrix, die mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen mit Kettenlängen von 4 bis 18 Kohlenstoff-Atomen überzogen

wird. Die Polarität der Trennsäule wird durch diese Alkylierungsreaktion umgekehrt. Je hydrophober eine Substanz ist, umso schwerer kann sie Wasserstoffbrückenbindungen zu den Molekülen der mobilen Phase ausbilden und verweilt länger auf der stationären Phase. Die Retentionszeit erhöht sich daher mit steigender Hydrophobie (Dominik und Steinhilber, 1996).

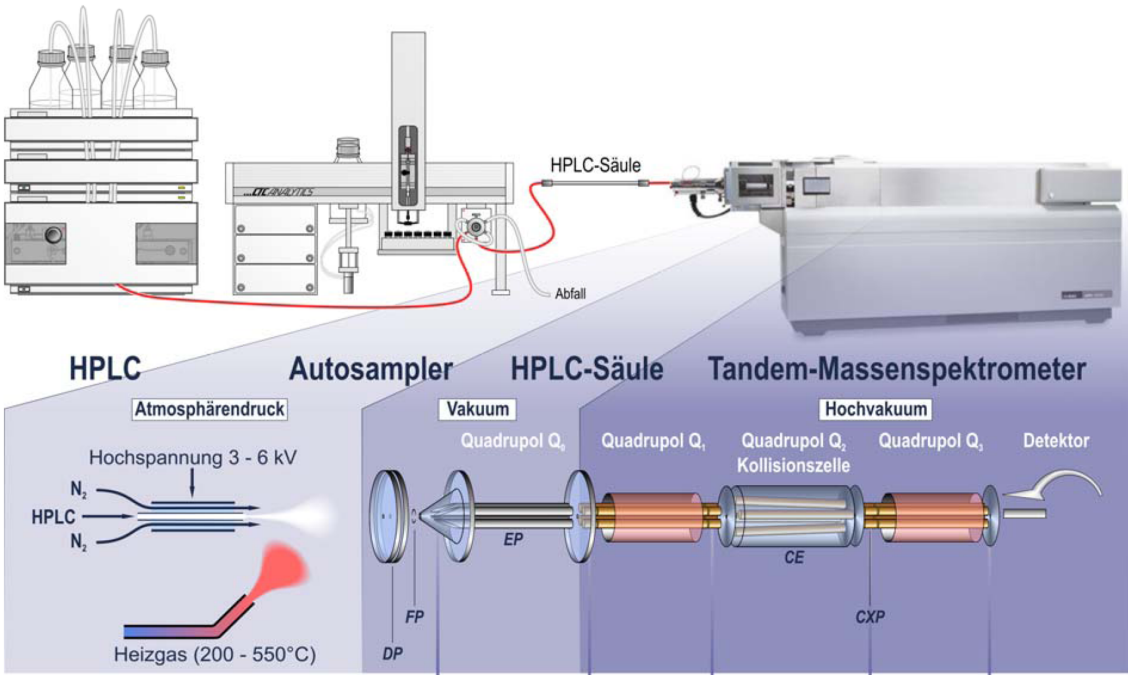


Abbildung 6:
Aufbau und Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems (modifiziert nach Schmidt, 2006)
Das System besteht aus vier Teilen: Autosampler, HPLC, HPLC-Säule, Massenspektrometer. Zudem wird das Massenspektrometer in verschiedene Teilbereiche untergliedert: Der Analyt wird im Elektrospray-Interface unter Atmosphärendruck ionisiert, wobei das HPLC-Lösungsmittel verdampft. Anschließend wird der ionisierte Analyt von verschiedenen Linsensystemen fokussiert und in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers gebracht, wo Quadrupole den Analyten aufgrund seines Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) auftrennen. (DP: declustering potential, FP: focusing potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: cell exit potential).

Nach chromatographischer Auftrennung der Probe mittels HPLC erfolgt die Detektion der Analyten im Massenspektrometer (siehe Abbildung 6). Dabei werden Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z-Werte) der jeweiligen Analyten gemessen. Das Grundprinzip eines Massenspektrometers (siehe Abbildung 7) ist die Erzeugung, Trennung und anschließende Detektion von Ionen (Hesse et al., 2011).

Zur Ionisierung der Probe finden verschiedene Methoden wie beispielsweise chemische Ionisation oder Photoionisation bei Atmosphärendruck und Elektrospray-Ionisation Verwendung (Hesse et al., 2011). Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Elektrospray-Ionisation (siehe Abbildung 8) wird durch Anlegen einer Hochspannung (engl. sprayvol voltage) das Laufmittel zerstäubt und die Analytenmoleküle ionisiert. Durch Verdampfen des Lösungsmittels gehen sie in die Gasphase über. Je nach Polarität der Hochspannung ist es möglich, positive oder negative Ionen zu erzeugen.

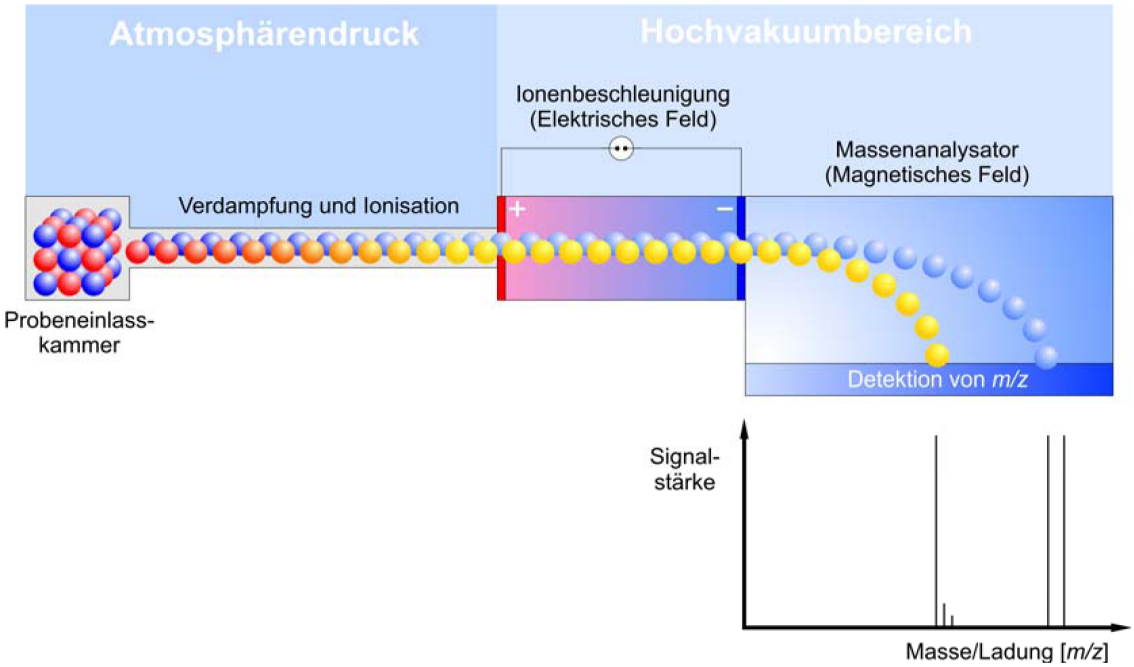


Abbildung 7:
Funktionsweise eines Massenspektrometers (Schmidt, 2006)
Die Probe wird zunächst über die Probeneinlasskammer in das System eingespritzt und in der Ionenquelle in gasförmige Ionen umgewandelt. Diese werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und im Massenanalysator entsprechend ihres m/z-Wertes aufgetrennt. Dabei können die Moleküle fragmentiert werden. Durch das angelegte Hochvakuum im Massenspektrometer wird die Kollision von erzeugten Ionen mit Luftmolekülen verhindert und ihre Flugbahn stabilisiert. Im Detektor wird die Anzahl der Ionen registriert und in ein Massenspektrum umgewandelt. In diesem Massenspektrum werden die gemessenen Intensitäten gegen ihren m/z-Wert aufgetragen (Hesse et al., 2011).

Wie auch bei der überwiegenden Anzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Endocannabinoidbestimmung (Zoerner et al., 2011), wurde in dieser Arbeit im positiven Modus gemessen. Im Massenanalysator werden die generierten Ionen wie bereits erwähnt anhand ihres m/z-Wertes separiert. Um diese Massentrennung zu erreichen, können verschiedene Methoden angewendet werden wie beispielsweise Quadrupol-Massenspektrometer, Flugzeitmassenspektrometer (TOFMS) oder Ionenfallen-Massenspektrometer (Hesse et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde in einer Studie ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer, in einer weiteren ein Tandem-Massen-spektrometer (Triple-Quadrupol-Massenspektrometer) verwendet. Bei beiden Techniken werden die erzeugten Ionen durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und durchfliegen zentral vier parallel liegende Stabelektroden (Quadrupolstäbe), die im Quadrat angeordnet sind. Durch das Übereinanderlagern von Gleich- und Wechselspannung zwischen den Stäben findet die Masse-zu-Ladung Auftrennung statt. In Abhängigkeit von den Spannungsverhältnissen besitzen nur Moleküle mit einem bestimmten m/z-Wert eine stabile oszillierende Flugbahn durch das Quadrupol-System, während alle anderen Teilchen abgelenkt werden und sich an den Stäben entladen

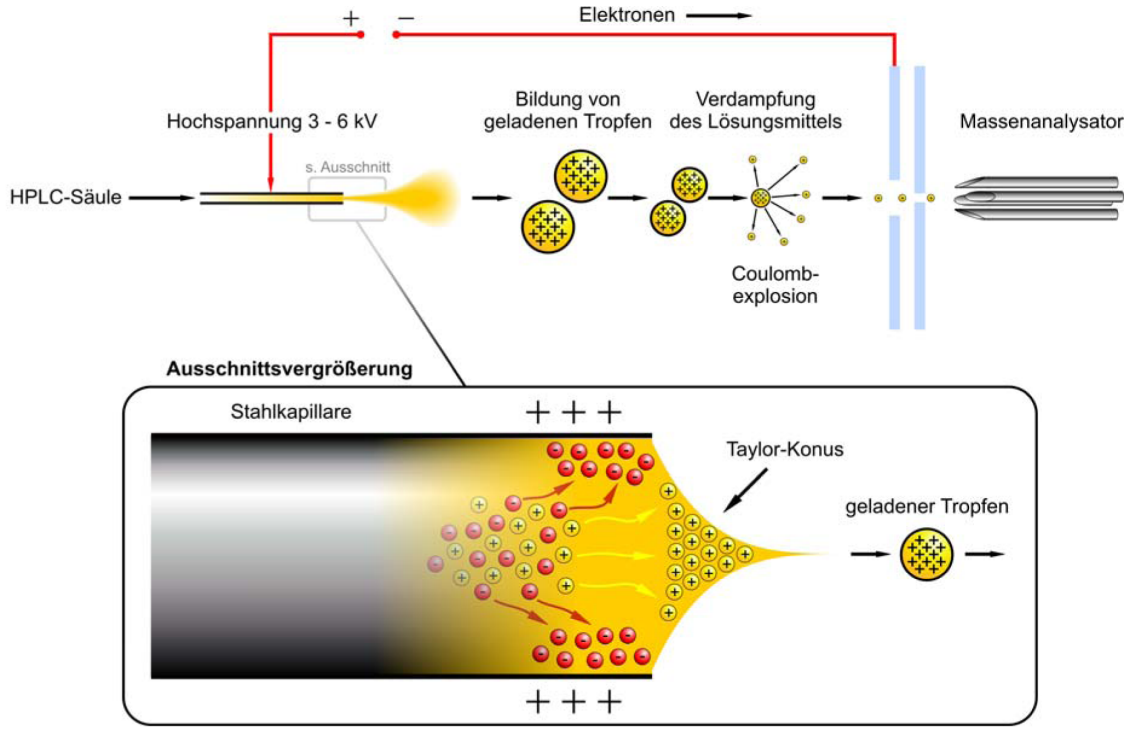


Abbildung 8:
Der Elektrospray-Prozess (Schmidt, 2006)
An der zum Elektrospray Interface gehörenden Stahlkapillare wird eine Hochspannung angelegt. Im Beispiel wird im positiven Ionenmodus detektiert, so dass die Kapillare zur Anode wird. Während die Anionen an die Stahlwandung fließen, sammeln sich die Kationen am Ende der Kapillare. Durch den elektrischen Sog entsteht ein Taylor-Konus, aus dem sich positiv geladene Flüssigkeitstropfen abtrennen. Da der Flüssigkeitstropfen eine größere Oberfläche besitzt, werden die Lösungsmitteltropfen verdampft und die Tröpfchengröße wird kleiner. Da die Ionen aus der flüssigen Phase nicht entweichen können, steigt die Ladungsdichte. Wird eine bestimmte Tröpfchengröße unterschritten, stoßen sich die gleichen Ladungen der Ionen untereinander ab und es kommt zur Coulomb-Explosion. Der Tropfen wird auseinander gerissen und die entstehenden kleineren Tröpfchen werden weiter verdampft bis freie gasförmige Ionen entstehen, die im Massenanalysator detektiert werden können.

(Hesse et al., 2011). Eine Weiterentwicklung des Single-Quadrupol-Massenspektrometers (MS) ist das Tandemmassenspektrometer (MS/MS).

Dieses besitzt zusätzlich zwei weitere Quadrupole. An das beschriebene Quadrupol schließt sich ein weiteres Quadrupol-System, die so genannte Kollisionszelle, an. In der Kollisionszelle können die Analyten durch Kollision mit einem Stoßgas (Argon, Helium, Stickstoff) und durch Zuführen kinetischer Energie mittels Potentialdifferenzen fragmentiert werden. Das entstehende Fragmentmuster ist dabei für die jeweilige Substanz spezifisch. Hinter der Kollisionszelle befindet sich der dritte Quadrupol, in dem die Moleküle erneut nach ihrem m/z-Wert aufgetrennt werden. Auf diese Weise kann beispielsweise ein Produktionenspektrum aufgezeichnet oder selektiv nur ein bekanntes Fragment-Ion beobachtet werden (Hesse et al., 2011). Beim Single-Quadrupol-Massenspektrometer sind zwei Messtechniken möglich, der Q_1-Scan und das Single-Ion-Monitoring (SIM). Beim Q_1-Scan wird ein Massenbereich untersucht, der eine Start- und eine Endmasse umfasst. Dieser Modus wird hauptsächlich für qualitative Fragestellungen verwendet, da sich für alle gebildeten Moleküle und

Fragment-Ionen Informationen gewinnen lassen. Bei der SIM-Methode können nur ein bzw. wenige Ionen selektiv den Quadrupol passieren. Diese Messmethode wird daher, wie auch in dieser Arbeit, zur quantitativen Analyse verwendet. Das Tandemmassenspektrometer bietet durch die Kollisionszelle und einem weiteren analytischen Quadrupol eine höhere Selektivität als das Single-Quadrupol-Massenspektrometer. Es können verschiedene Messtechniken durchgeführt werden. Beim Produkt-Ionen Scan wird in Quadrupol Q_1 die gesuchte Muttersubstanz mit einem bestimmten m/z-Verhältnis herausgefiltert, in der Kollisionszelle fragmentiert und die entstandenen Fragment-Ionen im Quadrupol Q_3 gescannt. Mit dieser Technik können über die Masse der Fragment-Ionen Rückschlüsse auf die Struktur der Muttersubstanz gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen das Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) eingesetzt. Dieses Verfahren baut auf den Ergebnissen des Produkt-Ionen Scans auf und wird hauptsächlich in der quantitativen Analytik angewendet. Auch hier wird der Quadrupol Q_1 so eingestellt, dass nur das gesuchte Molekül mit bestimmtem m/z-Verhältnis die Kollisionszelle erreicht. Der Quadrupol Q_3 selektiert wiederum nur das intensivste Fragment der Muttersubstanz. Im Chromatogramm erscheint dann nur ein Signal wenn der spezielle Massenübergang $Q_1 \rightarrow Q_3$ auftritt. Dieses ausgewählte Fragment dient als sogenannter Quantifier, jedes weitere Fragment der Substanz als Qualifier, der zeigt, dass es sich bei dem detektierten Signal auch tatsächlich um die gesuchte Muttersubstanz handelt. Es gibt verschiedene Arten von Detektoren wie beispielsweise Fotoplatten, Array-Detektoren, Faraday-Auffänger oder Sekundärelektronenvervielfacher, die die separierten Ionen erfassen können (Hesse et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sekundärelektronenvervielfacher verwendet, in dem die Elektronenströme, erzeugt aus den austretenden Ionen, mittels hoch angelegter Spannung um ein Vielfaches verstärkt werden und elektrische Signale erzeugen. Aus diesen Signalen entsteht das gewünschte Massenspektrum des Analyten.

2 Fragestellungen

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht das Endocannabinoidsystem im Kontext schizophrener Erkrankungen sowie der Einfluss der exogenen Cannabinoide Δ^9-THC und Cannabidiol auf dessen endogene Liganden. Um mögliche Wirkmechanismen näher zu beleuchten, wurde neben humanem Plasma auch Serum, Gehirn- und Lebergewebe der Ratte analysiert. Dabei stand die Entwicklung einer selektiven LC-MS/MS-Methode zur validen Simultanbestimmung endogener und exogener Cannabinoide im Gewebe im Mittelpunkt.

Das Ziel der Arbeit ist die Klärung folgender Fragen:

- Unterscheiden sich die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid und 2-AG sowie der strukturell verwandten Fettsäureethanolamide OEA und PEA im Plasma monozygoter Zwillinge mit Diskordanz für Schizophrenie bzw. für eine bipolare Erkrankung und differieren sie zudem von gesunden Kontrollzwillingspaaren?
- In welcher Konzentration hemmt Cannabidiol das FAAH Enzym *in vitro*? Zeigt Cannabidiol seine *in vitro* inhibitorische Wirkung auf das FAAH-Enzym auch *in vivo* und ist somit vergleichbar mit URB 597?
- Wie wirkt sich eine peritoneale Δ^9-THC-Injektion akut auf die Endocannabinoide sowie auf OEA und PEA in verschiedenen Körperkompartimenten der Ratte aus?
- Beeinflusst die Wahl des Lösungsmittels die Wirkung von URB 597, Δ^9-THC und Cannabidiol auf die Endocannabinoide sowie auf die verwandten Eicosanoide OEA und PEA? Zeigen sich Unterschiede zwischen den Kompartimenten Serum, Gehirn und Leber? Hat das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC?
- Wie ist die Verteilung der einzelnen Lipide in den jeweiligen Gehirnarealen? Sind die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid und 2-AG in den Gehirnarealen vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen CB_1-Rezeptorverteilung? Zeigen OEA und PEA ähnliche Verteilungsmuster?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen den Serum- und Gehirnkonzentrationen der Endocannabinoide und strukturell verwandten Fettsäureethanolamide in den einzelnen Behandlungsgruppen?

3 Material und Methoden

Da die Bestimmung der Endocannabinoide und verwandter Eicosanoide im humanen Plasma im Rahmen der Zwillingsstudie sowie der FAAH Enzymassay mit Cannabidiol im Department of Pharmacology, Irvine, USA durchgeführt wurde und die Methodenvalidierung im Gewebe bzw. die Messung der Rattenseren sowie -gewebsproben im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln, werden im Folgenden die zugehörigen Materialien und Methoden jeweils getrennt aufgeführt.

3.1 Zwillingsstudie

3.1.1 Materialien

3.1.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton, > 99,5 %	Mallinckrodt Baker, Inc. Phillipsburg, NJ, USA
Acylchloride, > 99 % (zur Synthese von Anandamid, OEA, PEA sowie von [$^2H_4$]-Anandamid, [$^2H_4$]-OEA, [$^2H_4$]-PEA)	Nu-Check Prep, Elysian, MN, USA
Ameisensäure, p.a.	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
2-AG, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
[$^2H_8$]-2-AG, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
Chloroform HPLC grade, ≥ 99,8 %	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Dichlormethan, HPLC Gradient Grade	Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA
Ethanolamid, > 98 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
[$^2H_4$]-Ethanolamid, > 98 %	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
Methanol HPLC grade, ≥ 99,9 %	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Wasser HPLC grade	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA

3.1.1.2 Geräte

Eismaschine	Hoshizaki Ice Maker, Model F-300BAF, Hoshizaki America, Inc, Peachtree City, GA, USA
Kühlschrank (-20°C)	VWR™, VWR, Radnor, PA, USA
LC-MS System	Automatic Liquid Sampler G1313A HPLC Agilent 1100 Serie Binäre Pumpe G1312A, Massenspektrometer-Detektor G1946A, Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA
Pipetten	Gilson Pipetman Classic™1- 10 µl Gilson Pipetman Classic™2- 20 µl Gilson Pipetman Classic™20- 100 µl Gilson Pipetman Classic™50- 200 µl Gilson Pipetman Classic™200- 1000 µl Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhelfer	Pipet Aid portable, Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA
Vortex- Mixer	Vortex Genie 2®, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Stickstoffverdampfer	Reacti Therm III™ Heating/ Stirring Module, Pierce, Rockford, IL, USA
Tiefkühlschrank (-80°C)	Ultima II ,Thermo Electron Corporation, Rockford, IL, USA
Zentrifuge	Allegra™ 6R, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA

3.1.1.3 Verbrauchsmaterialien

Probenaufbereitung:

Fisherbrand® Glaspipetten aus Borosilikatglas, steril (1, 5, 10 & 25 ml)	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Fisherbrand® Pasteurpipetten 5$^{3/4"}$	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Gewindeflaschen, 8 ml, Borosilikatglas, mit Schraubdeckel	National Scientific, Rockwood, TN, USA
Gewindeflaschen, 22 ml, Borosilikatglas, mit Schraubdeckel	National Scientific, Rockwood, TN, USA
Gewindeflaschen, 40 ml, Borosilikatglas, mit Schraubdeckel	National Scientific, Rockwood, TN, USA
Pipettenspitzen (10, 250, 1000 µl)	Rainin Instrument LLC, Oakland, CA
Standard-Synthese-Phiolen 3 & 30 ml	Supelco, Bellefonte, PA, USA

Chromatographie:

Autosampler-Phiolen, 2 ml, braun mit Insert und Schraubdeckel	Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA
HPLC Säule Zorbax Eclipse XDB C18, 50 x 4,6 mm, Partikelgröße 1,8 µm, Porengröße 80Å	Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA

3.1.1.4 Software

LC/MSD ChemStation Rev. B.03.02-SR2[341], 2001- 2008	Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA
Microsoft Excel® 2011 für Mac®	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Prism 5 für Mac® OS X, Version 5.0a	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
IBM® SPSS® Statistics 19 software	IBM Corporation, Armonk, NY, USA
software R (http://www.r-project.org/)	
Incscape (http://inkscape.org/).	

3.1.2 Experimentelles Design

3.1.2.1 Studienpopulation

Für die Untersuchung wurde der Arbeitsgruppe durch Herrn Professor E. Fuller Torrey, MD, Bethesda, USA Zugang zu einem weltweit anerkannten und vom National Institute of Mental Health, USA etablierten Kollektiv von 40 monozygoten Zwillingspaaren gewährt (Torrey et al., 1994). Bei 25 Paaren der Studienpopulation war ein Zwilling an Schizophrenie erkrankt, während der andere zum Zeitpunkt der Studie gesund war (diskordant in Bezug auf Schizophrenie). Fünf der gesunden Zwillinge erkrankten allerdings nach Abschluss der Studie zu einem späteren Zeitpunkt an einer psychiatrischen Erkrankung (Transit Zwillinge, siehe Tabelle 1). Sieben Zwillingspaare waren diskordant bzgl. einer bipolaren Erkrankung und bildeten das nosologisch differente Kontrollkollektiv. Acht Zwillingspaare bildeten die passenden, gesunden Kontrollen zu den erkrankten Paaren. Beide Zwillinge wurden vorher im selben Hotel untergebracht und erhielten ähnliche Kost (Torrey et al., 1994).

Tabelle 1: Transit Zwillinge

Probanden-Nr.	Psychiatrische Erkrankung
21 A	Schizophrenie
22 A	Bipolare Störung
23 A	Schizoaffektive Erkrankung
24 A	Schizophrenie
25 A	Unklare psychiatrische Erkrankung

Bei allen Probanden wurde die Diagnose mit Hilfe des Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-III-R, Achse II (Persönlichkeitsstörungen; SKID-II) gestellt, das aus einem zweistufigen Verfahren mit Fragebogen und standardisiertem Interview besteht. Des Weiteren wurde das allgemeine Funktionsniveau der Probanden in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn anhand der Global-Assessment of Functioning (GAF) Skala, die auf Achse V des DMS-III-R Anwendung findet, beurteilt (siehe Tabelle 2). Das Endergebnis ergab sich aus dem Konsens zweier Psychiater (Torrey et al., 1994).

Alle Studienteilnehmer gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme ab und die Studie wurde von der zuständigen amerikanischen Ethikkommission (Institutional Review Board) begutachtet und genehmigt.

Eine Zusammenfassung der demographischen Daten und klinischen Parameter der Studienteilnehmer finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Demographische Daten und klinische Parameter des Studienkollektivs

				GAF (DMS-III-R axis V)**		
	N	**Beginn der Erkrankung (Jahre)**	**Alter bei Testung (Jahre)**	**kranker Zwilling**	**gesunder Zwilling**	**weibl.: männl.**
diskordant für Schizophrenie	25	**21** (11, 19; 24, 30)*	**30** (17, 26; 35, 40)*	**38** (15, 32; 50, 70)*	**84** (75, 78; 87, 90)*	11:14
diskordant für bipolare Erkrankung	7	**24** (12, 18; 32, 38)*	**33** (24, 27; 42, 52)*	**55** (43, 48; 72, 82)*	**87** (76, 80; 88, 90)*	6:1
Kontrollen	8		**31** (19, 26; 35, 44)*			5:3

*** Median (Minimum, 25th und 75th Perzentile, Maximum)**

**** Die GAF Werte (Global Assessment of Functioning) beschreiben das psychische, soziale und berufliche Funktionsniveau des Probanden auf einer psychologischen Skala von 0 (unfähig) bis 100 (optimal).**

3.1.2.2 Blutabnahme

Die Plasmaproben der Studienteilnehmer wurden jeweils vormittags mit Hilfe eines standardisierten Aphereseverfahrens von Herrn Professor E. Fuller Torrey gesammelt (Torrey et al., 1994). Anschließend wurden sie aliquotiert und in Glasphiolen bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.1.3 Bestimmung der Endocannabinoide und verwandter Fettsäureethanolamide im Plasma

3.1.3.1 Synthese der [$^2H_4$]-markierten und nicht-markierten Standardreferenzsubstanzen

Die Synthese der nicht-deuterierten sowie deuterierten Fettsäureethanolamide Anandamid, OEA und PEA sowie [$^2H_4$]-Anandamid, [$^2H_4$]-OEA und [$^2H_4$]-PEA basiert auf der Methode von Giuffrida und Piomelli (1998b). Als Ausgangsstoffe dienten Acylchloride (Arachidonylchlorid, Oleoylchlorid bzw. Palmitoylchlorid), die zunächst in Dichlormethan (10 mg/ml) gelöst und anschließend mit einem Äquivalent nicht-deuteriertem bzw. deuteriertem Ethanolamin bei 0-4°C 15 min einer nukleophilen Substitution unterzogen wurden. Durch Zugabe von gereinigtem Wasser wurde die Reaktion, die in einer quantitativen Umsetzung resultiert (Ausbeute ≥ 95 %), gestoppt. Nach vorsichtigem Rühren und Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase verworfen. Die untere, organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen, um überschüssiges, nicht abreagiertes Ethanolamin zu entfernen (Giuffrida und Piomelli, 1998b). Anschließend erfolgte die Aufkonzentrierung der entstandenen Acylethanolamide unter Schutzgasatmosphäre (N_2) und Lösen des Rückstandes in Chloroform mit einer Konzentration von 0,2 mM für OEA/ [$^2H_4$]-OEA und PEA/ [$^2H_4$]-

PEA sowie von 0,02 mM für Anandamid/ [$^2H_4$]- Anandamid. Die Stammlösungen der Acylethanolamide wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Identität und Reinheit wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC bestimmt.

Während die Fettsäureethanolamide wie oben beschrieben synthetisiert wurden, wurde das nicht deuterierte bzw. deuterierte 2-AG von Cayman Chemicals, USA bezogen.

3.1.3.2 Isotopenverdünnungsmethode

Das hier angewandte Verfahren der Isotopenverdünnung wird häufig in der Massenspektrometrie zur qualitativen und quantitativen Identifizierung eingesetzt. Dabei werden zu Beginn der Aufbereitung (siehe 3.1.3.4) zu jeder Probe die den zu quantifizierenden Analyten entsprechenden, deuterierten Fettsäureethanolamide/ Fettsäureglycerolester ([$^2H_4$]-Anandamid, [$^2H_4$]-OEA, [$^2H_4$]-PEA und [$^2H_8$]-2-AG) in bekannter Konzentration als interne Standards gegeben.

Vorteil dieser Methode ist, dass eventuelle Verluste während der Probenaufbereitung die Quantifizierung nicht beeinträchtigen, da Isotopenverhältnisse gemessen werden und man davon ausgeht, dass sich interne Standards und die entsprechenden Analyten bezüglich etwaiger Verluste gleich verhalten.

Nach erfolgter Analyse wird das Ergebnis des internen Standards als Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) mit der Fläche unter der Kurve des entsprechenden Analyten in Beziehung gesetzt, um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Proben zu ermöglichen.

3.1.3.3 Herstellung der Kalibrierproben

Kalibrierproben dienen der Erstellung von Kalibriergeraden. Diese beschreiben die Beziehung zwischen der bekannten Konzentration des Analyten und dem erhaltenen Signal des Messinstruments.

Zur Erstellung der Kalibrierlösungen wurden von den Stammlösungen (siehe 3.1.3.1) folgende Verdünnungsreihen hergestellt (Tabelle 3):

Tabelle 3: Konzentrationen [pmol] der Substanzen in den Kalibrierproben (AEA= Anandamid)

Eichprobe	AEA	OEA/PEA	2-AG
EP1	30	150	500
EP2	15	75	250
EP3	7,5	37,5	125
EP4	3,75	18,75	62,5
EP5	1,88	9,38	31,25
EP6	0,94	4,69	15,63
EP7	0,47	2,34	7,81
EP8	0,23	1,17	3,91
EP9	0,12	0,59	1,95
EP10	0,06	–	0,98

Jede Kalibrierprobe enthielt außerdem 10 pmol [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol [$^2H_4$]-OEA und [$^2H_4$]-PEA sowie 500 pmol [$^2H_8$]-2-AG als interne Standards.

Die höchste Konzentration der Kalibrierproben sollte über der höchsten zu erwartenden Konzentration der Analyten in der Matrix liegen sowie die niedrigste Konzentration unterhalb der niedrigsten zu erwartenden.

Je ein vollständiger Satz an Kalibrierproben wurde am Anfang und am Ende der Messreihe gemessen.

3.1.3.4 Lipidextraktion

Die Extraktion der hydrophoben Fettsäureamide erfolgte mit Methanol und Chloroform nach Giuffrida und Piomelli (Giuffrida und Piomelli, 1998a; Giuffrida et al., 2000). Aufgrund der hohen Lipophilie adsorbieren die Analyten eher an Plastikoberflächen (Oddi et al., 2010). Für eine optimale Analytextraktion wurde daher zur Probenaufbereitung nur Glas verwendet (Giuffrida und Piomelli, 1998b) und die Kontaktzeit mit Labormaterial möglichst gering gehalten. Da erhöhte Temperaturen die Endocannabinoidkonzentrationen künstlich beeinflussen können (Zoerner et al., 2011), wurden die Proben bis zur Aufbereitung unverzüglich bei -80°C gelagert und die gesamte Extraktion eisgekühlt durchgeführt.

Folgendes Aufbereitungsschema galt für alle Plasmaproben:

Nach Auftauen der Proben auf Eis wurden 300 µl-Aliquote mit dem gleichen Volumen an kaltem Aceton (-20°C), der den internen Standard enthielt, versehen, um so die Plasmaproteine zu fällen. Die Konzentrationen der deuterierten, internen Standards pro Probe betrugen 10 pmol für [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol für [$^2H_4$]-OEA und [$^2H_4$]-PEA sowie 500 pmol für [$^2H_8$]-2-AG. Nach kurzem Mischen auf dem Vortex-Mixer verweilten die Proben für 2 min auf Eis. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in

der Kühlzentrifuge für 10 Minuten bei 1000 x g. Der Überstand wurde in eine neue 8 ml-Glasphiole überführt und unter Stickstoff eingedampft, bis das restliche Aceton verdampft war. Dann erfolgte die Zugabe von 300 µl Methanol mit anschließendem Vortex-Mischen für 2 min. Danach wurden 600 µl Chloroform hinzugegeben und erneut für 2 min geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Proben im Anschluss in der Kühlzentrifuge bei 1000 x g 10 min zentrifugiert und die Chloroformphase mittels Pasteurpipette in eine neue Glasphiole überführt. Die Chloroformphase wurde mit Stickstoff eingedampft und anschließend mit 60 µl der hergestellten Lösung Chloroform/Methanol im Verhältnis 1:3 wiederaufgenommen. Die Lösung wurde kurz geschüttelt, mit einer Pasteurpipette in eine Autosampler-Phiole mit Microinsert überführt und sofort bei -20°C bis zur baldigen LC-MS-Analyse gelagert.

3.1.3.5 LC-MS Analytik

Zur quantitativen Bestimmung der Analyten Anandamid, OEA, PEA und 2-AG im Plasma der Zwillingsproben wurde eine Methode verwendet, die in Prof. Piomellis Labor etabliert wurde. Mittels der binären Pumpe G1312A der HPLC Agilent 1100 Serie wurden die Substanzen chromatographisch unter folgenden Bedingungen aufgetrennt.

Analytische Trennsäule	Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 x 4,6 mm, Partikelgröße 1,8 µm, Porengröße 80 Å
Autosampler	
Probeninjektionsvolumen	10 µl
Spülflüssigkeit nach jeder Injektion	Methanol
Spülvolumen	100 µl
HPLC-Pumpe	
Flussrate	1 ml/min
Laufzeit	12 min
Säulenofentemperatur	40°C
Laufmittel A	Wasser
Laufmittel B	Methanol

Laufmittelgradient

Zeit (min)	Fluss (ml/min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B(%)
0,0	1	25	75
2,5	1	20	80
7,5	1	10	90
8,0	1	0	100
9,0	1	0	100
10,0	1	25	75
12,0	1	25	75

Die Retentionszeiten betrugen für Anandamid 5,2 min, für 2-AG 5,7 min, für PEA 5,7 min und für OEA 6,3 min.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte am Single-Quadrupol-Massenspektrometer-Detektor G1946A (Agilent Technologies) mit Elektrospray-Ionisation im positiven Ionisierungsmodus. Es wurde eine Spannung von 4000 V an der Elektrospray-Kapillare angelegt und die Fragmentorspannung variierte von 120 bis 140 V. Der Stickstoffgasfluss, der den Sprayvorgang pneumatisch unterstützt, betrug 13 L/min bei 350°C mit einem eingestellten Druck von 60 psi. Zur Quantifizierung der Analyten wurde das Single-Ion-Monitoring (SIM) gewählt, bei dem nur ausgewählte Substanzen selektiv durch den Quadrupol gelassen und alle anderen Teilchen ausgeblendet werden. Bei der beschriebenen Messmethode stellten die Natrium-Addukte der jeweiligen Analyte $[M+ Na]^+$ die am besten detektierbaren Signale dar, so dass sie zur Quantifizierung herangezogen wurden. In Tabelle 4 sind die quantifizierten Ionen aufgeführt:

Tabelle 4: Natrium-Addukte der Analyten (AEA= Anandamid)

Analyt	m/z-Verhältnis
AEA + Na^+	370
$[^2H_4]$-AEA + Na^+	374
OEA+ Na^+	348
$[^2H_4]$-OEA+ Na^+	352
PEA+ Na^+	322
$[^2H_4]$-PEA+ Na^+	326
2-AG + Na^+	401
$[^2H_8]$-2-AG+ Na^+	409

Die Scanzeit betrug 0,5 s/ Zyklus. Die Spektren wurden mit der Agilent ChemStation Software gesammelt.

3.1.4 Datenauswertung

Alle LC-MS-Peaks wurden mit der Software LC/MSD ChemStation (Version Rev. B.03.02-SR2[341], Agilent Technologies 2001-2008) ausgewertet. Die Integration sämtlicher Signale wurde manuell durchgeführt. Die erhaltenen Flächenwerte wurden in Microsoft Excel 2011 übertragen und das Verhältnis AUC Analyt/ AUC Interner Standard bestimmt. Anschließend folgte mit Hilfe der Kalibriergeraden die Berechnung der Analytkonzentrationen in den Plasmaproben.

Die linearen Kalibriergeraden wurden mittels Prism 5 (Version 5.0a) erstellt und basierten auf dem Quotienten der Peakflächen von Analyt und internem Standard, aufgetragen gegen die Konzentration.

3.1.4.1 Statistische Auswertung der Zwillingsstudie

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von IBM® SPSS® Statistics19 software. Abbildungen wurde mit den frei verfügbaren Software-Programmen R und Incscape erstellt. Aufgrund der empirisch zu erwartenden schiefen Verteilung der stetigen Variablen wurde diese mittels Median, Minimum, Interquartilsabstand und Maximum beschrieben. Proben von unabhängigen Gruppen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest verglichen, während gepaarte Proben mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests analysiert wurden. Da 40 Hypothesentests durchgeführt werden mussten, wird erst bei einem angepassten Signifikanzniveau von 0,001 nur bei einem dieser Tests die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen (versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit $\approx 40*0{,}001 = 0{,}04$). Die sogenannte Bonferroni-Korrektur, eine formellere Anpassungsmethode, ergibt ein reduziertes Signifikanzniveau von $0{,}00125 = 0{,}05/40$, das auf alle Hypothesentestergebnisse angewendet wurde. Die Werte der gesunden Kontrollproben wurden gemittelt, d.h. pro Zwillingspaar wurde ein Wert verwendet.

3.2 Methodenvalidierung im Gewebe mit anschließender Messung von Gewebeproben sowie Messung der Rattenseren im Rahmen der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie

3.2.1 Materialien

3.2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton, B&J Brand, für LC, > 99,9 %	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D
Ameisensäure, 98-100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
2-Arachidonoylglycerol, > 95 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
[$^2H_8$]-2-Arachidonoylglycerol, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
N-Arachidonoylethanolamid, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
[$^2H_4$]-N-Arachidonoylethanolamid, 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
Cannabidiol, API (active pharmaceutical ingredient) Grade for *in vivo* applications	THC –Pharm GmbH, Frankfurt/ Main, D
[$^2H_3$]-Cannabidiol, > 99,5 %	THC –Pharm GmbH, Frankfurt/ Main, D
Chloroform B&J Brand, für LC, stabilisiert, > 99,9 %	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D
Ethanol Absolut zur Analyse Emsure® ACS, ISO, REAG. PH EUR (Vehikel)	VWR, Langenfeld, D
Ethanol Rotisolv® HPLC Gradient Grade, ≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Glaswolle, unbehandelt	Grace Davison Discovery Sciences Deerfield, IL, USA
Kieselgel 60 (0,040- 0,063 mm) für die Säulenchromatographie	Merck KgaA, Darmstadt, D
Methanol Rotisolv® LC-MS-Grade, ≥ 99,95 %	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Methanol Super Gradient Grade B&J Brand, für LC, > 99,95 %	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D
Methylbutan	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Oleoylethanolamid, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
[$^2H_2$]-Oleoylethanolamid, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA

Palmitoylethanolamid, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
[$^2H_4$]-Palmitoylethanolamid, > 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
Polysorbat 80 (Tween80), PH EUR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Sesamöl	The Specials Laboratory Ltd, Northumberland, GB
Stickstoff, flüssig, -196°C	Messer Griesheim, Krefeld, D
(-)- Δ 9-Tetrahydrocannabinol, > 97 %	Lipomed AG, Arlesheim, CH
[2H3]-(-)- Δ 9-Tetrahydrocannabinol, > 97 %	Lipomed AG, Arlesheim, CH
Trockeneis	Linde Gas Deutschland, Pullach, D
URB 597	AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach, D
Wasser, Chromasolv, LC-MS	Riedel-de Haen, Seelze, D
Wasser aus MilliQ-Anlage	Millipore, Eschborn, D
Wasser, Super Gradient Grade B&J Brand, für LC	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D

3.2.1.2 Geräte

Analysenwaagen	Ohaus Discovery DV215CDM, Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA Kern & Sohn 770-14, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
Eismaschine	ZBE 110-35, Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen, D
Mikroliterspritzen	Hamilton-Mikroliterspritze 1701N, 10 µl, Hamilton-Mikroliterspritze 1705N, 50 µl, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Homogenisator	Fisher scientific Power Gen 500, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Kühlschrank (-24°C)	Modell GSL 351/GS 35 K O, Siemens, Essen, D
LC-MS/MS System	Autosampler HTC PAL, CTC Analytics, Zwingen, CH HPLC Agilent 1200 Serie Binäre Pumpe SL, Agilent Technologies, Inc. Headquarters, Santa Clara, CA, USA Massenspektrometer-Detektor API5000™, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Pipetten	Eppendorf Research 1- 10 µl Eppendorf Research 2- 20 µl Eppendorf Research 10- 100 µl Eppendorf Research 20- 200 µl Eppendorf Research 100- 1000 µl Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhelfer	Pipetboy ACU, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2®, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Stickstoffverdampfer	Reacti Therm III™ Heating/Stirring Module, Pierce, Rockford, IL, USA
Tiefkühlschrank (-80°C)	Freezer HFU 686 Basis, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q® plus Water, Millipore, Eschborn, D
Zentrifuge	Labofuge 400, Heraeus, Hanau, D

3.2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Probenaufbereitung:

Falcon Röhrchen, 50 ml	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Fisherbrand® Glaspipetten aus Borosilikatglas, steril (1, 2, 5, 10 und 25 ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Gewindeflaschen, Borosilikatglas, mit Schraubdeckel (2, 8, 20 und 40 ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Glasphiolen, 2 ml	Renner GmbH, Dannstadt, D
Pasteurpipetten, Glas, 150 mm	VWR International GmbH, Bruchsal, D
Petrischalen, steril, 90 mm Durchmesser	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (10, 250, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
S-Monovette® Serum-Gel, 4,7 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Chromatographie:

Autosampler-Phiolen (1,5 ml), braun mit Insert und Schraubdeckel	Brown Chromatography Supplies GmbH, Wertheim, D

HPLC-Säule Synergi Hydro-RP, 150 x 2,0 mm, Partikelgröße 4 µm, Porengröße 80Å	Phenomenex LTD, Aschaffenburg, D
Security Guard mit Aqua-C18-Vorsäule, 4x 2 mm Partikelgröße 10 µm, Porengröße 125Å	Phenomenex LTD, Aschaffenburg, D

3.2.1.4 Software

Analyst 1.4.2	P Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Excel® für Mac 2011	Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA
Sigma-Plot 11.0	Systat Software, San José, CA, USA

3.2.2 Experimentelles Design

3.2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 69 gesunde, männliche, adulte Black hooded Ratten (Janvier). Sie wurden paarweise in Typ4-Makrolon-Käfigen in einem inversen Tag-Nacht-Rhythmus (12 h/12 h, Licht an um 20:00 Uhr) gehalten. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser, wurden aber restriktiv gefüttert.

3.2.2.2 Injektionsplan der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie

Die Tiere wurden in 11 Versuchsgruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 5). Es wurden zum Vergleich Injektionslösungen von Δ^9-THC (5 mg/kg), Cannabidiol (12 mg/kg) und URB 597 (0,3 mg/kg) in zwei verschiedenen Lösungsmitteln (Vehikel) angefertigt. Als wässriges Solvens wurde Ethanol:Tween80:Saline im Verhältnis 1:1:18 verwendet, öliges Solvens war Sesamöl.

Zusätzlich wurde in den Δ^9-THC Versuchsgruppen zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten der Blutabnahme nach Injektion unterschieden (15 min und 2 h).

Tabelle 5: Versuchsgruppen der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie.
Da bei 2 Tieren nach Cannabidiol (CBD) ölig Injektion sowie bei 3 Tieren nach Δ^9-THC wässrig Injektion kein CBD bzw. Δ^9-THC im Gewebe/Blut nachgewiesen werden konnte, wurden diese Tiere von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das für die Analyse verwendete n ist in Klammern angegeben.

Versuchsgruppe	Kurzbezeichnung	Anzahl der Tiere	Start der Blutabnahme nach Injektion
Saline	"SAL"	5	nach 2 h
Vehikel wässrig	"VEH-wässrig"	2	nach 2 h
Vehikel ölig	"VEH-ölig"	4	nach 2 h
Δ^9-THC wässrig 2h	"THC-wässrig/b"	11 (8)	nach 2 h
CBD wässrig	"CBD-wässrig"	7	nach 2 h
URB wässrig	"URB-wässrig"	5	nach 2 h
Δ^9-THC ölig 2h	"THC-ölig/b"	6	nach 2 h
CBD ölig	"CBD-ölig"	8 (6)	nach 2 h
URB ölig	"URB-ölig"	5	nach 2 h
Δ^9-THC wässrig 15min	"THC-wässrig/a"	9	nach 15 min
Δ^9-THC ölig 15min	"THC-ölig/a"	7	nach 15 min

3.2.2.3 Gewebeprobenaufbereitung/Blutabnahme

15 min bzw. 2 h nach intraperitonealer (i.p.) Injektion der verschiedenen Lösungen (siehe Tabelle 5) wurde den Tieren unter Narkose (2-3 % Isofluran in 30 % O_2 und 70 % N_2O) insgesamt etwa 5 ml Blut aus der Beinarterie *(Arteria femoralis)* entnommen und über einen Katheter direkt in S-Monovetten® Serum-Gel überführt. Anschließend erfolgte die Dekapitation und sofortige Entnahme des Gehirnes und der Leber. Von einer Hirnhemisphäre (links:rechts = 50:50) wurden folgende Areale auf Eis präpariert und in 0,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt: Kleinhirn, Mittelhirn, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, präfrontaler Kortex (siehe Abbildung 9). Die Hirnregionen sowie die entnommene Leber wurden sofort in -40°C Methylbutan gefroren und im -80°C Kühlschrank bis zur weiteren Analyse gelagert.

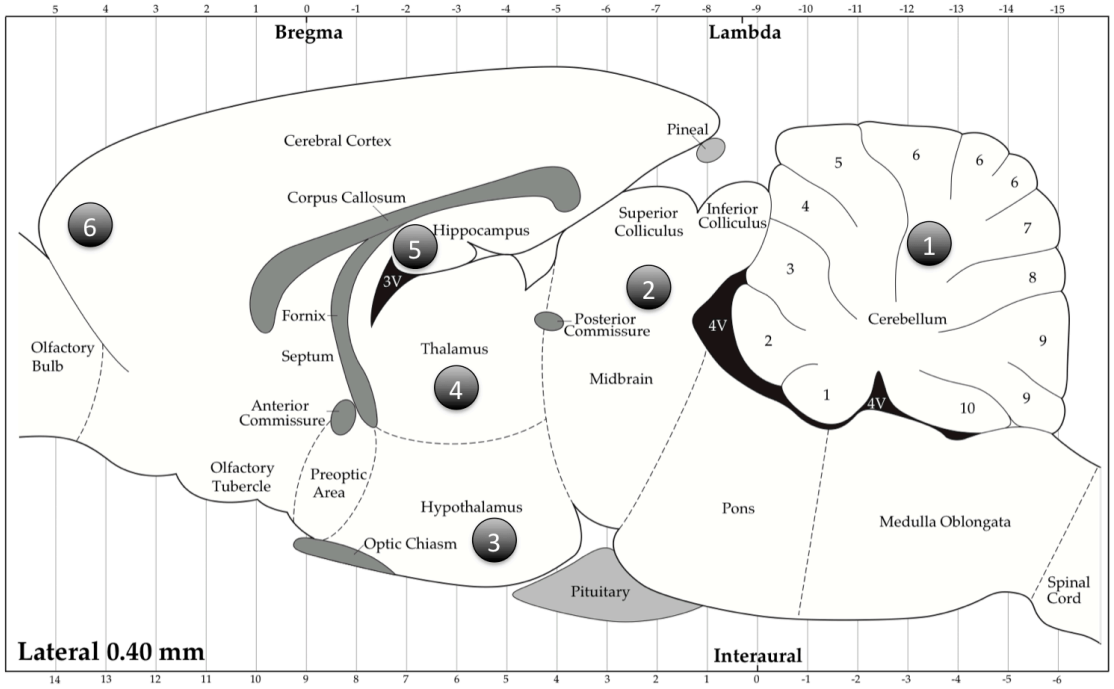


Abbildung 9:
Schematische Darstellung eines Sagittalschnitts der rechten Hemisphäre eines Rattengehirns (Schnitt 0,4 mm rechts der Längsfurche) (Rohleder, 2012)
(1) Kleinhirn, (2) Mittelhirn, (3) Hypothalamus, (4) Thalamus, (5) Hippocampus und (6) präfrontaler Kortex

Für die Gewinnung der Rattenhirnproben ist ein wichtiger Aspekt die Veränderung der Analytanteile im Gehirn *post mortem* (Buczynski und Parsons, 2010). In der Zeitspanne zwischen Töten des Tieres und Einfrieren des Gewebes können sich die Konzentrationen der Endocannabinoide verändern. Daher sollte die gesamte Prozedur standardisiert und schnell ablaufen.

Zur Gewinnung der Serumproben wurden die S-Monovetten® nach Entnahme bei 4°C und 3500 rpm für 30 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Serum in 2 ml Glasphiolen dekantiert und wie die Gewebeproben bei -80°C gelagert.

3.2.3 Bestimmung von endogenen und exogenen Cannabinoiden im Gewebe

3.2.3.1 Herstellung der Kalibrierproben

Es wurden zunächst Stammlösungen von Anandamid, OEA, PEA, 2-AG, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC sowie von den dazugehörigen internen, deuterierten Standards in Methanol hergestellt. Anschließend wurden Eichreihen in Methanol mit folgenden Konzentrationen erstellt (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Konzentrationen [pmol/ml] der Substanzen in den Kalibrierproben (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Eichprobe	AEA/ Δ^9-THC	OEA/PEA	2-AG	CBD
EP1	250	1000	10000	2000
EP2	125	500	5000	1000
EP3	62,5	250	2500	500
EP4	31,25	125	1250	250
EP5	15,63	62,5	625	125
EP6	7,81	31,25	312,5	62,5
EP7	3,91	15,63	156,25	31,25
EP8	1,95	7,81	78,13	15,63
EP9	0,98	3,91	39,06	7,81

Jede Kalibrierprobe wurde mit 25 pmol/ml [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol/ml [$^2H_2$]-OEA/ [$^2H_4$]-PEA/ [$^2H_3$]- Δ^9-THC, 500 pmol/ml [$^2H_8$]-2-AG und 250 pmol/ml [$^2H_3$]-Cannabidiol als interne Standards versehen.

Die Kalibrierproben dienten der Erstellung von Kalibriergeraden. Dabei sollte die höchste Konzentration der Kalibrierproben über der höchsten zu erwartenden Konzentration der Analyte in den Proben liegen und die niedrigste unterhalb der niedrigsten zu erwartenden Konzentration. Zur Quantifizierung wurde der Quotient aus der Fläche des Analyten und der Fläche des internen Standards gebildet und graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Bei direkter Proportionalität erhält man eine Gerade (Kalibriergerade). Diese wurde als geeignet angesehen, wenn zumindest bei zwei Drittel der Datenpunkte die Abweichung vom Sollwert nicht über 20 % bei Konzentrationen nahe der Quantifizierungsgrenze sowie nicht über 15 % für alle anderen Konzentrationen lag.

Je ein vollständiger Satz Kalibrierproben wurde am Anfang und am Ende jeder Messreihe gemessen.

3.2.3.2 Herstellung der Qualitätskontrollproben

Es wurden 4 Qualitätskontrollproben aus separat hergestellten Stammlösungen der Analyte verwendet (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Konzentrationen [pmol/ml] der Analyten in den Qualitätskontrollproben (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Qualitätskontrollprobe	AEA	OEA/PEA	2-AG	CBD	Δ^9-THC
QC1	125	500	5000	1000	125
QC2	31,25	125	1250	250	31,25
QC3	7,81	31,25	312,5	62,5	7,81
QC4	3,91	15,63	156,25	15,63	1,95

Jede Qualitätskontrollprobe wurde mit 25 pmol/ml [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol/ml [$^2H_2$]-OEA/ [$^2H_4$]-PEA/ [$^2H_3$]- Δ^9-THC, 500 pmol/ml [$^2H_8$]-2-AG und 250 pmol/ml [$^2H_3$]-Cannabidiol als interne Standards versehen.

Qualitätskontrollproben sollen zeigen, dass die Messbedingungen innerhalb einer Messreihe konstant sind und somit die Proben zu jedem Zeitpunkt unter gleichen Bedingungen gemessen werden. Die ausgewählten Konzentrationen sollen den gesamten Quantifizierungsbereich abdecken. Dafür wurden Konzentrationen der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) gewählt und hergestellt, sowie im mittleren Quantifizierungsbereich und an der oberen Quantifizierungsgrenze.

Zur Herstellung der Kalibrier- und Qualitätskontrolllösungen wurden Reinsubstanzen verwendet und in geeignetem Lösungsmittel gelöst. Die benötigten Stammlösungen und Verdünnungsreihen wurden gemäß SOP2001 des Geltungsbereichs “Klinische Pharmakologie, AG Prof. Fuhr” hergestellt. Die Kalibrierlösungen und Qualitätskontrolllösungen wurden aus unterschiedlichen Wägungen hergestellt und getrennt voneinander verwendet.

3.2.3.3 Herstellung der Matrixproben

Die Matrixproben werden benötigt, um die Bestimmungsmethode in der Matrix, hier im Rattengewebe, zu validieren. Dafür wurde das gesamte Gehirn einer unbehandelten, männlichen Black hooded Ratte wie beschrieben aufbereitet (siehe 3.2.3.4). Allerdings wurde es im Ganzen homogenisiert und anschließend in Aliquote aufgeteilt. Da die Analyte als endogene Substanzen natürlicherweise im Gewebe enthalten sind, musste zunächst eine Nullwertbestimmung erfolgen. Dazu wurden drei unbehandelte Gewebeproben unter Zugabe des internen Standards gemessen. Anschließend wurden Gewebealiquote mit drei verschiedenen Konzentrationen sowie den entsprechenden internen Standards einmal vor und einmal nach der Lipidextraktion (siehe 3.2.3.4) versehen. Das Ganze erfolgte in drei Ansätzen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrationen [pmol/ml] der Substanzen in den Matrixproben (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Matrixprobe	AEA	OEA/PEA	2-AG	CBD	Δ^9-THC
MP1 (Hohes Niveau)	25	50	600	100	125
MP2 (Mittleres Niveau)	12,5	25	300	50	31,25
MP3 (Niedriges Niveau)	6,25	12,5	150	25	7,81

Jede Matrixprobe wurde mit 25 pmol/ml [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol/ml [$^2H_2$]-OEA/ [$^2H_4$]-PEA/ [$^2H_3$]-Δ^9-THC, 500 pmol/ml [$^2H_8$]-2-AG und 250 pmol/ml [$^2H_3$]-Cannabidiol als interne Standards versehen.

3.2.3.4 Lipidextraktion

Die Probenaufbereitung erfolgte in Anlehnung an das von Fegley *et al*. (2005) entwickelte Verfahren zur Bestimmung von endogenen Cannabinoiden in Rattengewebe mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode (siehe 3.1.3.2). Wie bereits oben beschrieben (3.1.3.4) wurde die gesamte Extraktion eisgekühlt und unter Verwendung von Glasmaterialen durchgeführt. Folgende Prozedur galt für alle Gewebeproben:

Zum Abwiegen wurden die Areale der Rattenhirne sowie die Leber auf Trockeneis gelagert. Die einzelnen Hirnregionen wurden eingewogen, möglichst ohne aufzutauen, und direkt in auf Eis stehende Glasphiolen gegeben. Jede Phiole enthielt 1 ml Methanol mit folgender Konzentration an internem Standard: 25 pmol/ml [$^2H_4$]-Anandamid, 100 pmol/ml [$^2H_2$]-OEA/ [$^2H_4$]-PEA/ [$^2H_3$]-THC, 500 mol/ml [$^2H_8$]-2-AG und 250 pmol/ml [$^2H_3$]-Cannabidiol. Auf einer mit Trockeneis gekühlten Petrischale wurde ein ca. 50-100 mg schweres Stück Leber abgeschnitten, und in eine ebenfalls gekühlte Glasphiole überführt.

Nach der Homogenisierung der verschiedenen Gewebeproben erfolgte die Lipidextraktion. Dazu wurde zuerst 2 ml Chloroform hinzugegeben. Nach ausreichender Durchmischung wurde 1 ml Wasser hinzugefügt und alles erneut 1 min geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Proben 10 Minuten bei 1000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und die Chloroformphase mit einer Pasteurpipette in eine neue Glasphiole überführt. Die Chloroformphase wurde unter Stickstoff eingedampft und anschließend erneut in Chloroform aufgenommen. Zur Aufreinigung der organischen Phase wurden Silicagel-Säulen verwendet, bestehend aus mit Glaswolle gefüllten Pasteurpipetten, die mit einer Mischung aus Chloroform und Silica Gel (1:1, V/V) versehen wurden. Nach dem Waschen der Säulen mit Chloroform, wurde die organische Phase der Proben auf die Säulen geladen und anschließend mit einer Chloroform/ Methanol-Mischung (9:1, V/V) eluiert. Die resultierende organische Phase wurde erneut unter Stickstoff eingedampft und schließlich in Methanol aufgenommen. Nach kurzer Durchmischung wurde die Lösung in eine Autosamplerphiole mit Insert für die LC-MS/MS überführt und sofort bei -20°C bis zur Messung gelagert.

3.2.3.5 LC-MS/MS Analytik

3.2.3.5.1 Methodenentwicklung

Die Analytik der endogenen Cannabinoide und verwandter Lipide wurde an einem LC-MS/MS-System im positiven Ionenmodus durchgeführt. Das System bestand aus einem HTC PAL Autosampler (CTC Analytics) mit temperaturkontrollierter Probenlagerung, einem Säulenofen und einer binären Pumpe (Agilent Technologies) sowie einem API 5000 Triple Quadrupol-Massenspektrometer (Applied Biosystems; siehe Abbildung 10).

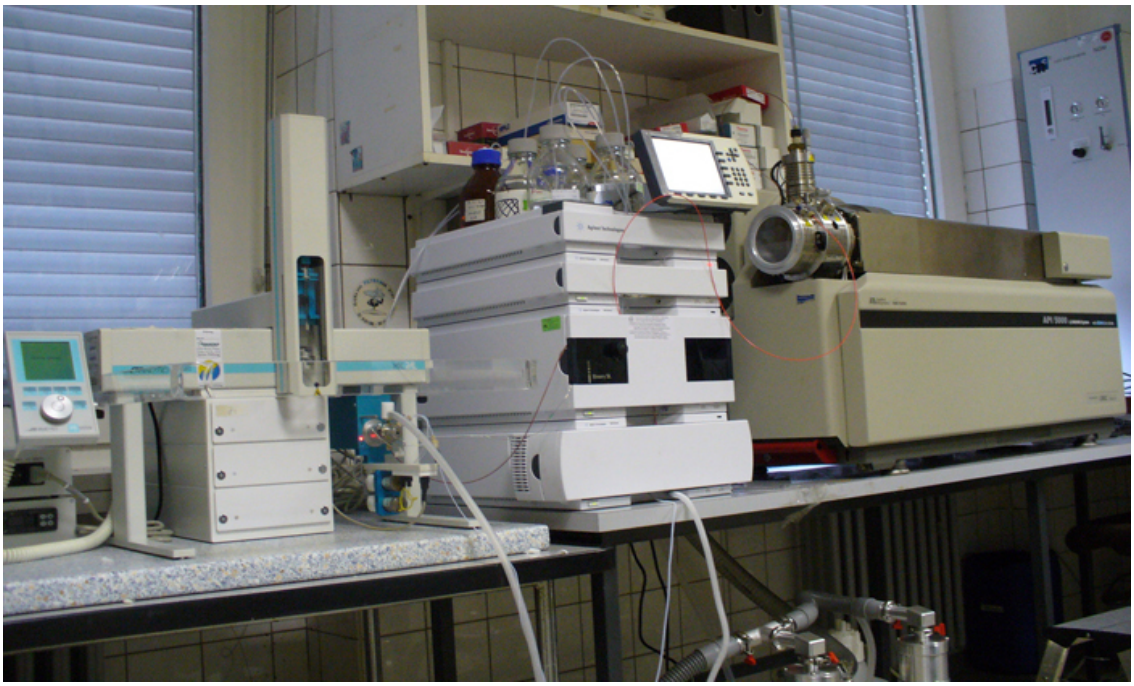


Abbildung 10:
Aufbau des LC-MS/MS Systems

Die chromatographische Methode zur Auftrennung der Analyten wurde durch Injektion von methanolhaltigen Stammlösungen der Analyte sowie von extrahierten Gewebeproben entwickelt. Durch Variation der Laufmittelzusammensetzung, der Flussgeschwindigkeit des Laufmittels, der Temperatur des Säulenofens sowie verschiedener Säulenmaterialien wurde das Verfahren optimiert (siehe Abbildung 11 ff).

Unter folgenden Bedingungen wurden die Substanzen aufgetrennt:

Analytische Trennsäule	Synergi Hydro-RP, 150x 2,0 mm, Partikelgröße 4 µm, Porengröße 80Å
Vorsäule	Security Guard mit Aqua-C_{18}-Vorsäule, 4x 2 mm Partikelgröße 10 µm, Porengröße 125Å
Autosampler	
Probeninjektionsvolumen	20 µl
Spülflüssigkeit nach jeder Injektion	Wasser, Acetonitril
Spülvolumen	100 µl
HPLC-Pumpe	
Flussrate	0,5 ml/min
Laufzeit	18 min
Säulenofentemperatur	40°C
Laufmittel A	Wasser
Laufmittel B	Methanol

Laufmittelgradient

Zeit (min)	Fluss (ml/min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
0,0	0,5	25	75
2,5	0,5	20	80
7,5	0,5	10	90
8,0	0,5	0	100
10,0	0,5	25	75
18,0	0,5	25	75

Die Retentionszeiten betrugen für Anandamid 7,14 min, für 2-AG 7,35 min, für PEA 7,79 min, für OEA 8,27 min, für Δ^9-THC 6,87 min und für Cannabidiol 4,73 min.

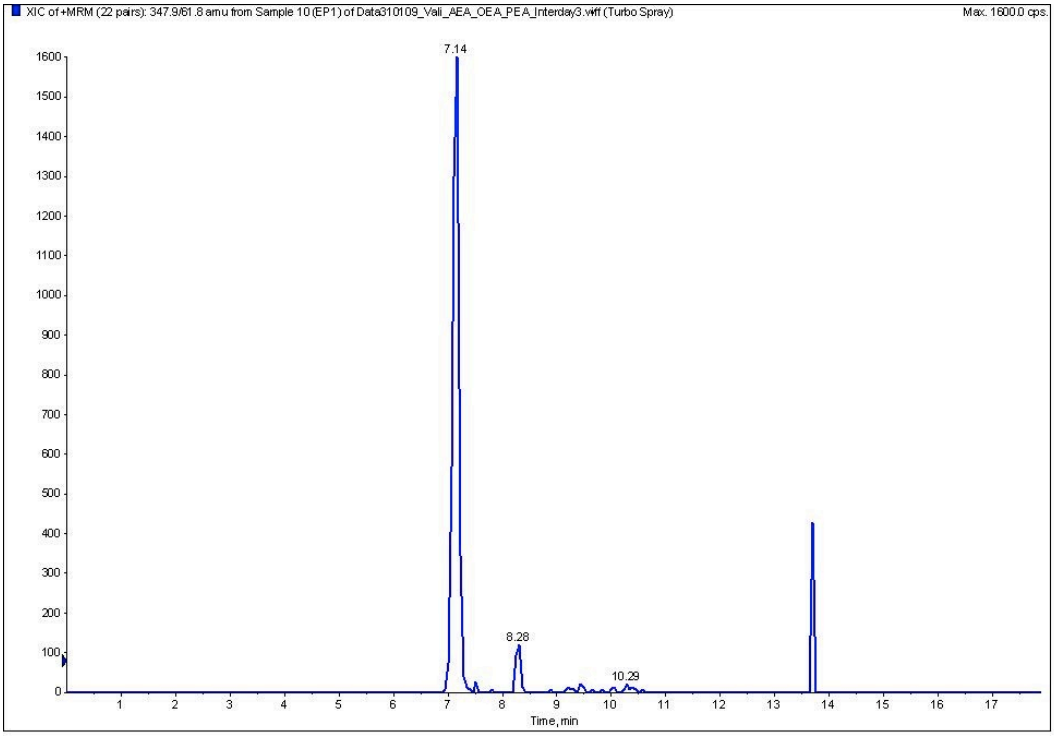


Abbildung 11: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 250 pmol/ml Anandamid (AEA)

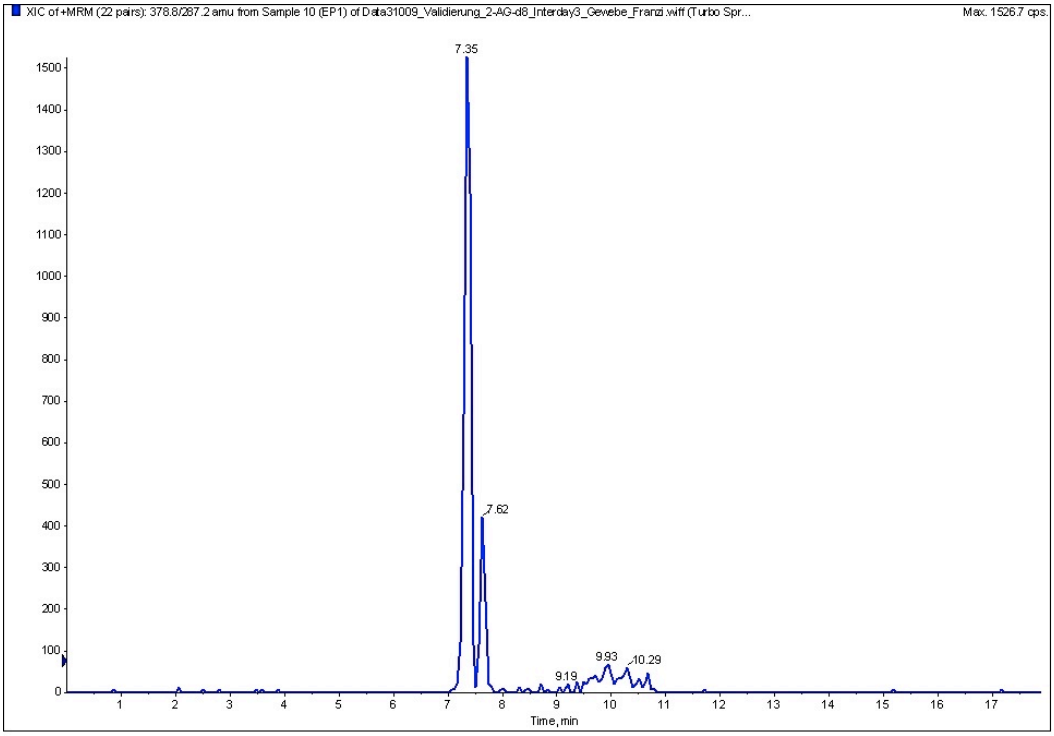


Abbildung 12: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 10000 pmol/ml 2-AG

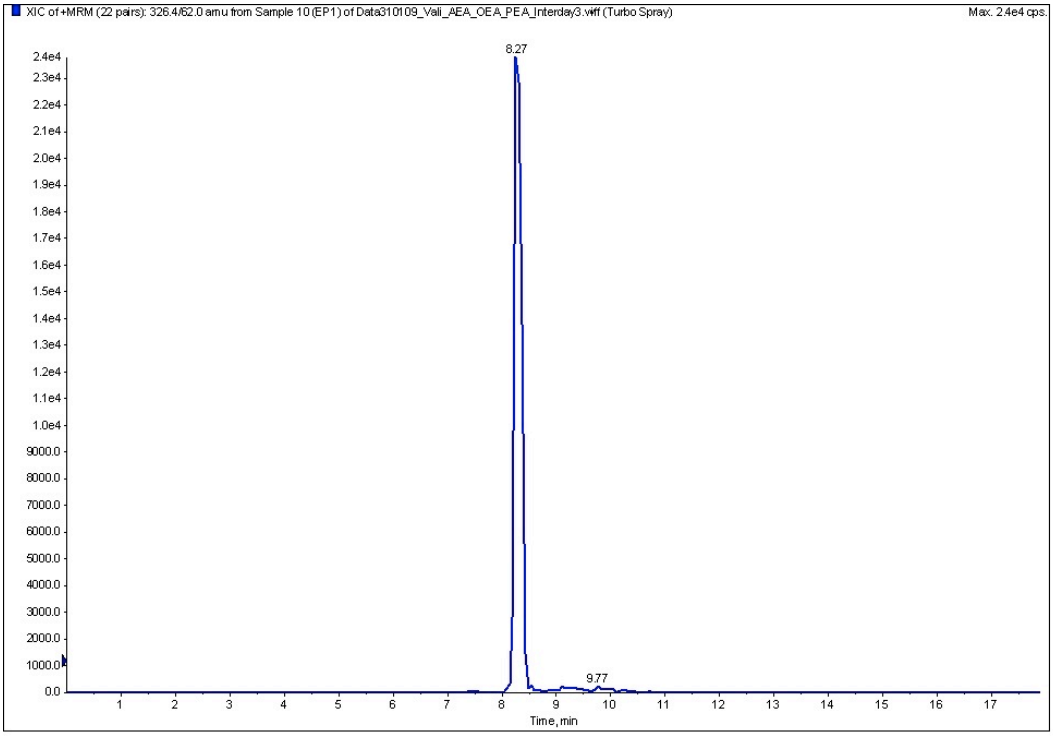


Abbildung 13: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 1000 pmol/ml OEA

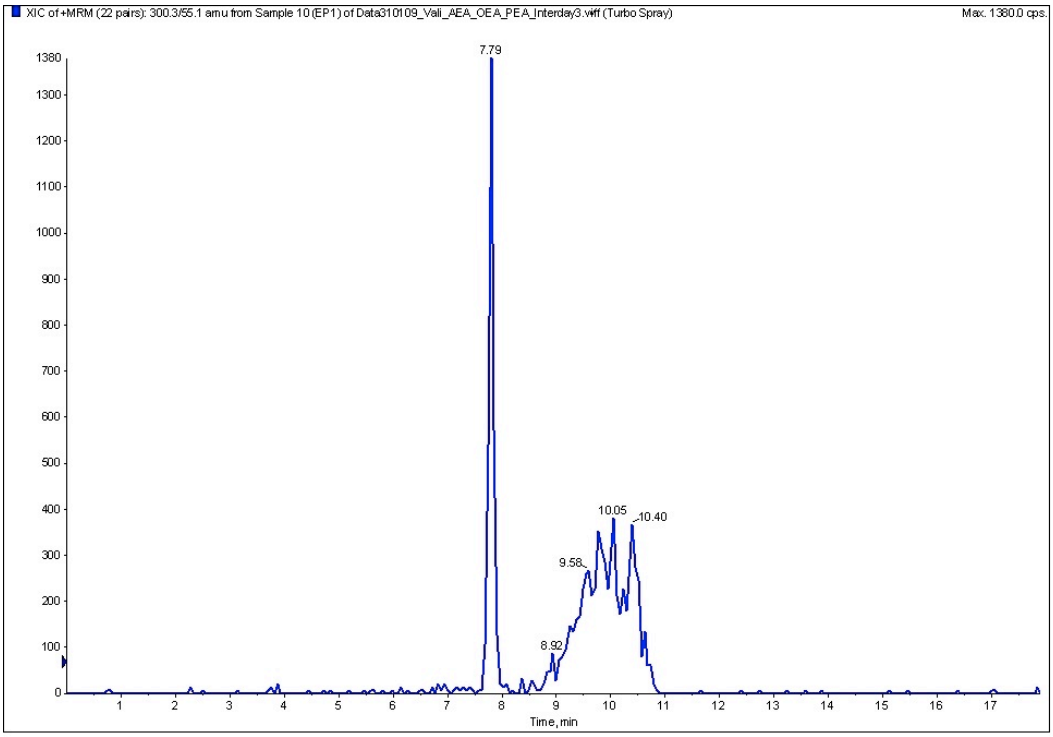


Abbildung 14: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 1000 pmol/ml PEA

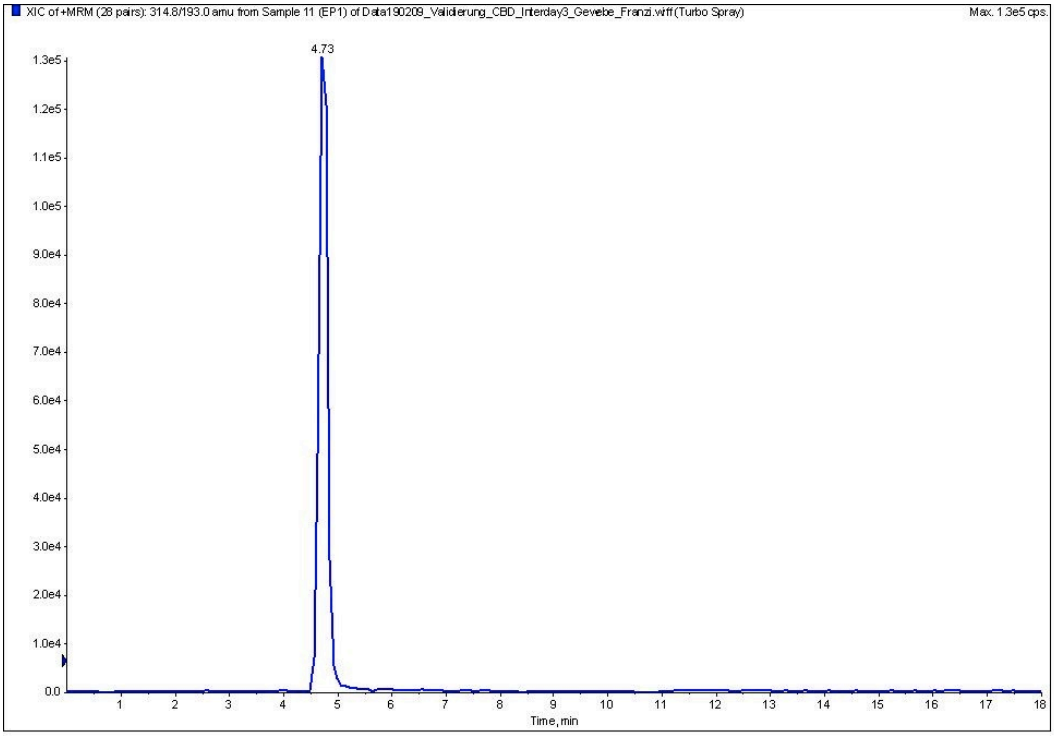


Abbildung 15: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 2000 pmol/ml Cannabidiol (CBD)

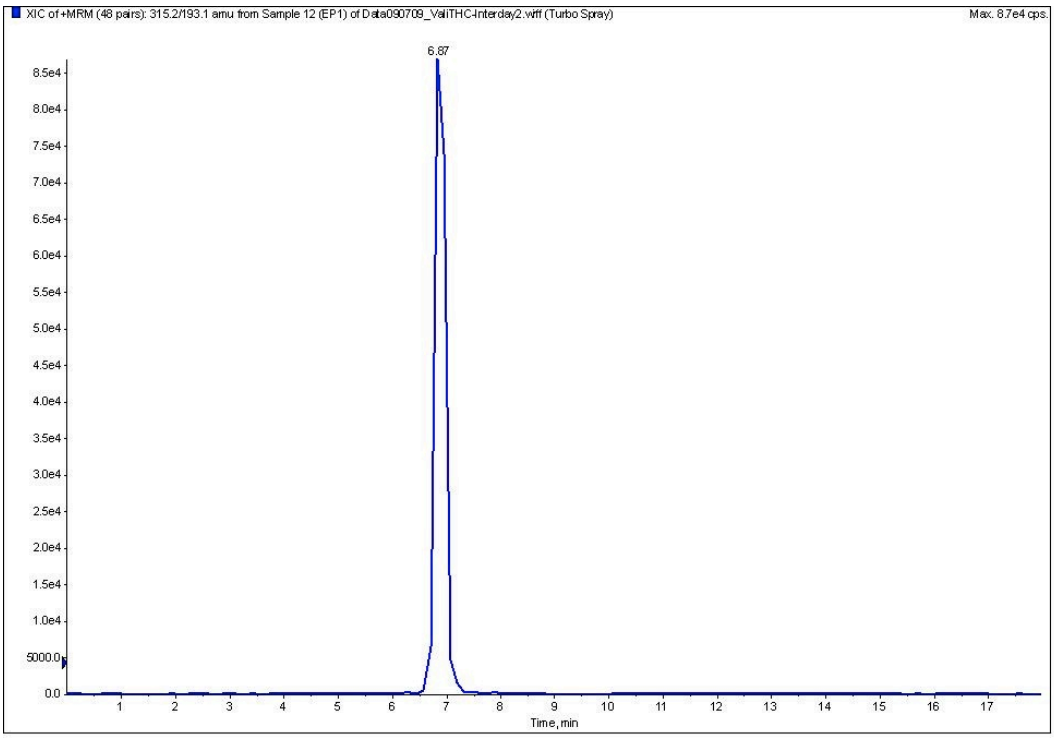
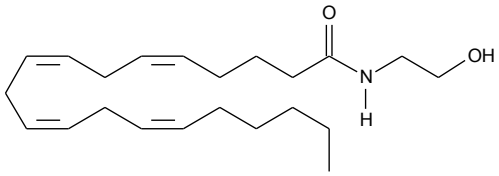
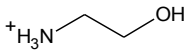
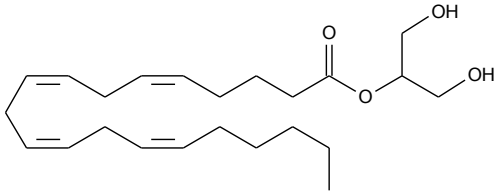
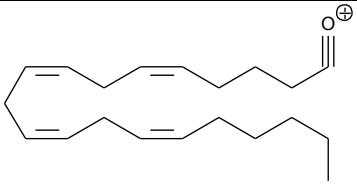
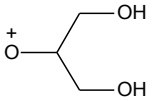
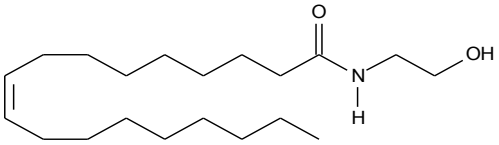
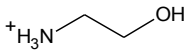
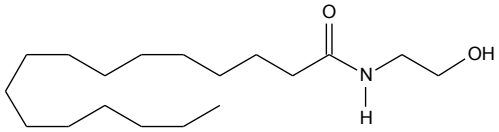
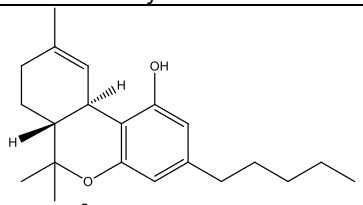
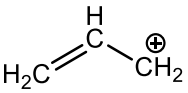
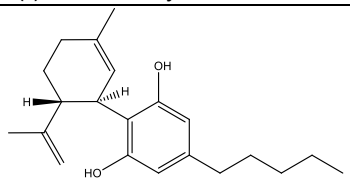
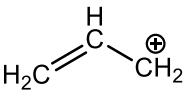


Abbildung 16: Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 250 pmol/ml Δ^9-THC

Um geeignete MS/MS-Parameter zu finden, wurden Stammlösungen in Methanol von Anandamid, OEA, PEA, 2-AG und den exogenen Cannabinoiden Cannabidiol und Δ^9-THC sowie den jeweiligen deuterierten internen Standards in Konzentrationen von 200 ng/ml hergestellt. Für jeden Analyten wurden im Tune Modus durch Direktinfusion der hergestellten Lösung die Fragmente bestimmt. Das intensivste Fragment-Ion des

Analyten aus dem Produkt-Ionen-Scan wurde zur quantitativen Analyse im MRM-Modus verwendet (Quantifier). Das zweitintensivste Fragment, als Qualifier bezeichnet, diente zur qualitativen Analyse.

Tabelle 9: Verwendete Masse-Fragmente zur Identifizierung und Quantifizierung der Analyten

Substanz	Quantifier	Qualifier
		Struktur unbekannt
N-Arachidonoylethanolamid (Anandamid)	m/z: 61,8	m/z: 44,0
		
2-Arachidonoylglycerol	m/z: 287,2	m/z: 91,1
		Struktur unbekannt
Oleoylethanolamid	m/z: 62,0	m/z: 44,0
	Struktur unbekannt	$[C_4H_7]^+$
Palmitoylethanolamid	m/z: 81,0	m/z: 55,1
	Struktur unbekannt	
(-)- Δ^9-Tetrahydrocannabinol	m/z: 193,1	m/z: 41
	Struktur unbekannt	
Cannabidiol	m/z: 193,0	m/z: 41,1

Durch das gleichzeitige Auftreten von Qualifier und Quantifier (siehe Tabelle 9) wurde bestätigt, dass es sich um die ausgewählte Substanz handelt. Störsignale konnten so ausgeschlossen werden. Die zur Quantifizierung der Analyte gewählte Messtechnik, Multiple-Reaction-Monitoring (MRM), wurde durch Variation verschiedener Parameter der Ionenquelle sowie der Potentiale optimiert, um möglichst eine maximale Signalintensität der jeweiligen Fragmente zu erreichen:

(1) Declustering Potential (DP), (2) Kollisionszellenenergie (CE), (3) Kollisionszellen-Exit Potential (CXP), (4) Curtain-Gas, (5) Kollisions-Gas, (6) Ionisierungsenergie und (7) Temperatur an der Kapillare der Ionenquelle

Tabelle 10 zeigt die MRM-Übergänge und die optimierten Werte für DP, CE und CXP:

Tabelle 10: MRM-Übergänge und Werte für DP, CE und CXP der Analyten und ihrer jeweiligen internen Standards (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Substanz	Ionen-Übergänge	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
AEA	347,9 → 61,8	126	23	14
	347,9 → 44,0	126	69	10
$[^2H_4]$ -AEA	351,92 → 66,0	96	23	14
	351,92 → 48,1	96	67	10
OEA	326,39 → 62,0	211	27	12
	326,39 → 44,0	211	61	20
$[^2H_2]$ -OEA	328,43 → 44,1	136	71	10
	328,43 → 41,0	136	89	18
PEA	300,28 → 81,0	116	47	18
	300,28 → 55,1	116	77	12
$[^2H_4]$ -PEA	304,37 → 61,9	86	23	14
	304,37 → 44,0	86	63	18
2-AG	378,8 → 287,2	146	23	30
	378,8 → 91,1	146	81	20
$[^2H_8]$ -2-AG	386,8 → 94,0	161	67	20
	386,8 → 92,9	161	81	20
CBD	314,84 → 193,0	136	37	28
	314,84 → 41,1	136	79	8
$[^2H_3]$ -CBD	318,27 → 196,1	101	31	20
	318,27 → 123,0	101	45	18
Δ^9-THC	315,25 → 193,1	41	29	28
	315,25 → 41,0	41	31	18
$[^2H_3]$ - Δ^9-THC	318,23 → 196,2	116	31	20
	318,23 → 41,0	116	93	18

Als Curtain- und Kollisions-Gas wurde Stickstoff mit einem Druck von 15 bzw. 5 Hilfseinheiten (arbitrary units) verwendet. Die Ionisierungsenergie der ESI-Kapillare wurde auf 5500 V festgelegt. Die Temperatur an der Kapillare betrug 350°C. Die Scanzeit für die MRM-Experimente betrug 4,34 s/Zyklus.

3.2.3.5.2 Methodenvalidierung

Eine Methodenvalidierung ist notwendig, um zu zeigen, dass eine analytische Methode zur Quantifizierung eines Analyten geeignet ist. Ziel der Validierung ist die Überprüfung und Bewertung der Qualität bzw. Ermittlung von Fehlern einer Analysenmethode.

Wichtige Qualitätsmerkmale, die bei einer Validierung ermittelt werden sollten, sind:

(1) Präzision, (2) Richtigkeit, (3) Bestimmungsgrenze, (4) Nachweisgrenze (5) Selektivität, (6) Wiederfindung, (7) Stabilität

Die Methodenvalidierung zur Analyse der endogenen und exogenen Cannabinoide im Gewebe orientierte sich an den zum Zeitpunkt der Validierung gültigen internationalen Richtlinien (CPMP/ICH/281/95, 1996; CPMP/ICH/381/95, 1994; FDA, 2001; Shah et al., 1991).

(1) Präzision und (2) Richtigkeit

Die Präzision (engl. *precision*) ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau gleichen Bedingungen. Das Maß wird angegeben als relative Standardabweichung RSD (engl. *relative standard deviation*).

Zur Berechnung gilt folgende Formel:

$$RSD\ [\%] = \frac{Standardabweichung\ der\ IST\ Konzentrationen}{Mittlere\ IST\ Konzentration} \times 100$$

Unter Richtigkeit (engl. *accuracy*) wird die Übereinstimmung des Messergebnisses mit dem “wahren” Wert verstanden. Da der wahre Wert oft nicht bekannt ist, wird ein durch Abschätzung ermittelter Näherungswert zur Berechnung der Richtigkeit herangezogen, der sogenannte “richtige” Wert. Die Richtigkeit wird als relativer Fehler RE (engl. *relative error*) angegeben und gibt Aufschluss über mögliche systematische Fehler in der Probenaufbereitung und -messung.

Zur Berechnung gilt folgende Formel:

$$RE\ [\%] = \frac{(Mittlere\ IST\ Konzentration) - (Soll\ Konzentration)}{Soll\ Konzentration} \times 100$$

Zur Beurteilung von Präzision und Richtigkeit wurden sowohl Inter-day- (zwischen den Tagen) als auch Intra-day- (innerhalb eines Tages) Analysen durchgeführt.

Intra-day-assay:

Zur Bestimmung der Variabilität innerhalb eines Tages wurden für jede der vier verwendeten Konzentrationen der Qualitätsproben (siehe 3.2.3.2) jeweils drei Proben gemeinsam aufbereitet, in einem Messvorgang bestimmt und ausgewertet.

Inter-day-assay:

Zur Bestimmung der Variabilität an verschiedenen Tagen wurden an drei verschiedenen Tagen für jede der vier verwendeten Konzentrationen der Qualitätsproben jeweils eine Probe 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 RSD herangezogen, die jeweils innerhalb eines Tages an den verschiedenen Messtagen ermittelt wurden. Für die Präzision zwischen verschiedenen Tagen (*interday-precision*) galt das Entsprechende. Die ermittelten Werte (RSD) sollten ≤ 15 % sein, wobei an der Quantifizierungsgrenze Abweichungen bis maximal 20 % akzeptiert wurden.

Für die Bewertung der Richtigkeit der Methode innerhalb eines Tages (*intraday-accuracy*) wurde der Median der RE 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 ≤ 15 % sowie an der Quantifizierungsgrenze maximal 20 % betragen.

(3) Bestimmungs- und (4) Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification, LLOQ*) gilt für quantitative Bestimmungen und ist der niedrigste Gehalt einer Substanz, der unter den angegebenen Analysebedingungen in einem vorliegenden Material noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Die niedrigste Konzentration der Qualitätsproben (QC 4) stellt den LLOQ dar.

Die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection, LOD*) gilt für qualitative Analysen und bezeichnet den niedrigsten Gehalt (“Grenzkonzentration”) einer Substanz, der mit einem Messverfahren noch zuverlässig identifiziert werden kann. Dabei wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 angenommen. Das heißt nur Signale, die dreimal so intensiv sind wie die Mittelwerte der Rauschsignale, gelten eindeutig als positiv. Der niedrigste Wert der Kalibriergeraden wurde als LOD bezeichnet.

(5) Selektivität

Unter Selektivität versteht man die Fähigkeit einer analytischen Methode, den Analyten in Gegenwart anderer Bestandteile der Probe präzise und richtig zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Summe der anderen Bestandteile bezeichnet man als “Matrix”.

Dafür wurde die Selektivität der Ionen-Übergänge untersucht. Zur Bestimmung der Selektivität wurden drei Matrixproben aufgearbeitet und mit den Analyten und ihren dazugehörigen internen Standards versehen. Die verschiedenen Ionen-Übergänge wurden in Bezug auf störende Einflüsse verglichen, wobei keine Störsignale bei den jeweils zu erwartenden Retentionszeiten auftreten dürfen.

(6) Wiederfindung

Als Wiederfindung (engl. *recovery*) bezeichnet man das Detektorsignal verursacht durch eine der Matrix zugesetzten und extrahierten Substanzmenge im Vergleich zum Detektorsignal verursacht durch eine direkt aus einer Standardlösung gemessenen Substanzmenge. Die Wiederfindung wurde aus je drei Messungen bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration mittels folgender Formel bestimmt:

$$Recovery\ [\%] = \frac{Mittlere\ Peakfläche\ der\ Matrixprobe}{Mittlere\ Peakfläche\ der\ Referenzlösung} \times 100$$

(7) Stabilität

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

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$Stabilität\ [\%] = \frac{(Mittlere\ IST\ Konz.der\ Untersuchungslösung) - (Mittlere\ IST\ Konz.der\ Referenzlösung)}{Mittlere\ IST\ Konzentration\ der\ Referenzlösung} \times 100$$

Die Grenzwerte für den oberen und mittleren Messbereich lagen bei 15 %, für den unteren, an der Quantifizierungsgrenze liegenden Bereich bei 20 %.

Im Folgenden werden die verschiedenen Bedingungen der Stabilitätsprüfungen näher erläutert. Bei allen Untersuchungen wurden Qualitätsproben in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 7) analysiert.

Stabilität im Autosampler

Es wurden vier Qualitätskontrollproben vermessen, anschließend über Nacht im Autosampler gelagert und am nächsten Tag nochmals vermessen.

Stabilität bei Raumtemperatur

Nach Aufarbeitung und Vermessung von drei Qualitätskontrollproben wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag nochmals vermessen.

Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen

Drei Qualitätskontrollproben wurden aufgearbeitet, vermessen und anschließend dreimal von der Lagerungstemperatur (-20°C) auf Raumtemperatur aufgetaut und wieder eingefroren und daraufhin erneut vermessen.

Langzeitstabilität

Drei Qualitätskontrollproben wurden aufgearbeitet, vermessen und für die vorgesehene Lagerungszeit unter den vorgesehenen Lagerungsbedingungen eingelagert. Nach ca. 3 Monaten wurden die Proben erneut vermessen.

3.2.3.5.3 Qualitätssicherung während der Gewebeprobenmessung

Nach erfolgreicher Validierung konnte die Methode zur Bestimmung unbekannter Konzentrationen endogener und exogener Cannabinoide im Rattengewebe eingesetzt werden. In jeder Messreihe wurden zu Beginn und am Ende jeweils zwei Kalibrierreihen sowie die Qualitätskontrollproben gemessen.

Die Messungen galten als verwendbar, wenn die Kalibriergeraden als geeignet anzusehen waren (Anforderungen siehe 3.2.3.1) und wenn für mindestens zwei Drittel aller Qualitätskontrollproben galt: Abweichung vom Sollwert nicht über 20 % an der Quantifizierungsgrenze und nicht über 15 % für alle anderen Konzentrationen wobei nicht mehr als 50 % der Qualitätsproben einer einzelnen Konzentration außerhalb der Grenzen liegen dürfen.

3.2.3.5.4 Methodenanwendung

Die Probensequenz bestand aus einem vollständigen Satz an Kalibrierproben am Anfang und am Ende jeder Messreihe sowie einem Satz an Qualitätskontrollproben pro 10 Proben mit unbekannter Konzentration. Im Rahmen einer Probensequenz wurde immer eine Hirnregion bzw. Lebergewebe aller unterschiedlich behandelten Ratten vermessen (genaue Beschreibung der Messmethode siehe 2.3.2.1.).

3.2.4 Bestimmung von endogenen und exogenen Cannabinoiden im Serum

3.2.4.1 Herstellung der Kalibrierproben

Es wurden zunächst Stammlösungen von Anandamid, OEA, PEA, 2-AG, Cannabidiol und Δ^9-THC sowie von den dazugehörigen internen, deuterierten Standards in Methanol hergestellt. Anschließend wurden Eichreihen in Methanol angefertigt. Jede Kalibrierprobe wurde mit 2,5 pmol/ml [$^2H_4$]-Anandamid, 10 pmol/ml [$^2H_2$]-OEA/ [$^2H_4$]-PEA, 500 pmol/ml [$^2H_8$]-2-AG, 100 pmol/ml [$^2H_3$]-Δ^9-THC und 250 pmol/ml [$^2H_3$]-Cannabidiol als interne Standards versehen. Die höchste Konzentration der Kalibrierproben lag über der höchsten zu erwartenden Konzentration der Analyten in der Matrix bzw. die niedrigste Konzentration unterhalb der niedrigsten zu erwartenden.

3.2.4.2 Lipidextraktion

Die Extraktion der Analyte wurde mit Ausnahme von kleinen Änderungen wie beschrieben (siehe 3.1.3.4) durchgeführt. Anstatt 300 µl wurden 1 ml-Serum-Aliquote mit dem gleichen Volumen an kaltem Aceton (-20°C), das den internen Standard enthielt, versehen. Es wurden pro Probe folgende Konzentrationen der deuterierten, internen Standards hinzugefügt: 2,5 pmol/ml für [$^2H_4$]-Anandamid, 10 pmol/ml für [$^2H_2$]-OEA / [$^2H_4$]-PEA, 500 pmol/ml für [$^2H_8$]-2-AG, 100 pmol/ml für [$^2H_3$]-Δ^9-THC und 250 pmol/ml für [$^2H_3$]- Cannabidiol.

3.2.4.3 LC-MS/MS Analytik

Zur quantitativen Bestimmung der Analyte Anandamid, OEA, PEA, 2-AG, Cannabidiol und Δ^9-THC im Serum wurde die in Kapitel 0 entwickelte Methode zur Messung im Gewebe durch Frau Dr. Carola Schäfer weiter optimiert und validiert. Dies war notwendig, da die Konzentrationen der Analyte im Serum viel geringer sind als im Gewebe.

Es ergaben sich folgende Änderungen:

Das Laufmittel A, Wasser, wurde mit 0,1 % Ameisensäure versetzt, um die Protonierung der Analyte zu unterstützen und somit die positive Ionisierung in der Ionenquelle zu verbessern.

Verschiedene Parameter der Ionenquelle sowie Potentiale wurden variiert, um die Signalintensität der jeweiligen Fragmente zu verbessern. Weitere Details sind in der Arbeit von Frau Schäfer zu finden.

3.2.4.3.1 Methodenanwendung

Die Probensequenz bestand aus einem vollständigen Satz an Kalibrierproben am Anfang und am Ende jeder Messreihe sowie einem Satz an Qualitätskontrollproben pro 10 Proben mit unbekannter Konzentration.

3.2.5 Datenauswertung der Gewebs- und Serumproben

Alle LC-MS/MS-Peaks wurden mit der Software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ausgewertet. Die Integration sämtlicher Signale wurde manuell durchgeführt. Mit Hilfe der Software Analyst wurde von den erhaltenen Flächenwerten (engl. *area under the curve*, AUC) das Verhältnis AUC Analyt/ AUC Interner Standard bestimmt mit anschließender Quantifizierung der Analyte anhand der Kalibriergeraden mittels linearer Regression. Um die Güte der linearen Regression im unteren Konzentrationsbereich zu erhöhen, wurde eine Wichtung (1/x) durchgeführt. Die linearen Kalibriergeraden basieren auf dem Quotienten der Peakflächen von Analyt und internem Standard aufgetragen gegen die Konzentration des Analyten.

3.2.5.1 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie wurden statistisch mit SPSS (SPSS Statistics 22, SPSS®, Inc., IBM Company, USA) analysiert. Das Signifikanzniveau α wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt, so dass bei p-Werten, die kleiner als 0,05 waren, die Nullhypothese abgelehnt und der Unterschied als signifikant angesehen wurde.

Auf Grund der geringen Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe ($n = 5$ bis 11) konnte Normalverteilung nur schlecht geprüft werden. Da nicht-parametrische Tests für die Analyse kleiner Stichproben (< 6) nicht optimal sind (Bland und Altman, 2009), wurden ausschließlich parametrische Tests verwendet.

Die Versuchsgruppen “SAL” (Saline), “VEH-wässrig” (Vehikel wässrig) und “VEH-ölig” (Vehikel ölig) unterschieden sich statistisch nicht und wurden daher für die Auswertung zu einer Vehikelgruppe “VEH” zusammengefasst.

Die Daten wurden je nach Fragestellung mittels 1- bzw. 2-faktorieller Varianzanalysen ohne Messwiederholung (ANOVA; Faktor: Versuchsgruppe, Wirkdauer Δ^9-THC) oder mittels 2-faktorieller Varianzanalysen mit einer Messwiederholung (mixed design ANOVA; Faktor: Versuchsgruppe, Gehirnareal) analysiert.

Um die Varianzhomogenität der Zwischensubjektfaktoren ohne Messwiederholung (Faktor: Versuchsgruppe) zu überprüfen, wurde der Levene-Test verwendet. Bei Verletzung der Varianzhomogenität ($p < 0,05$), wurde versucht, durch Transformation

der Daten (1. Logarithmus, 2. Wurzel, 3. reziproke Transformation) die Varianzhomogenität zu erreichen. Wurde die Varianzhomogenität trotz Transformation nicht erreicht, wird dies im Ergebnisteil entsprechend erwähnt und die Ergebnisse wurden entsprechend mit Vorsicht betrachtet. Bei der mixed design ANOVA wurde die Sphärizität des sich wiederholenden Faktors (Gehirnregionen) mittels Mauchly-Test geprüft. Lag eine Sphärizitätsverletzung vor ($p < 0,05$), wurden die Freiheitsgrade und entsprechend die F-Werte mittels Greenhouse-Geisser korrigiert. Da die Greenhouse-Geisser Korrektur jedoch bei $\varepsilon > 0,75$ als zu konservativ gilt, wurden die Freiheitsgrade in diesem Fall nach der Huynh-Feldt-Methode korrigiert (Field, 2009).

Die Haupteffekte und Interaktionseffekte der Varianzanalysen ohne Messwiederholung wurden mittels Post hoc-Test LSD aufgelöst. Durch multiples Testen in derselben Stichprobe erhöht sich die α-Fehler Wahrscheinlichkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden die p-Werte daher mit der Bonferroni-Methode korrigiert. So ergab sich für die p-Werte der Varianzanalysen ohne Messwiederholung der Korrekturfaktor aus der Anzahl der Behandlungsgruppen * Anzahl der Analyten.

Bei der Analyse der Wirkung exogener Cannabinoide auf die Lipidkonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen wäre eine Post hoc-Analyse mit dem LSD und anschließender Bonferroni Korrektur auf Grund der hohen Anzahl an Einzelvergleichen zu konservativ (Behandlungsgruppe*Anzahl der Analyten*Gehirnregionen). Daher wurden die Haupt- und Interaktionseffekte der mixed design ANOVA mit dem Post hoc-Test Sidak aufgelöst. Der Post hoc-Test Sidak korrigiert bereits auf Mehrfachvergleiche, so dass sich der Bonferroni-Korrekturfaktor nur aus der Anzahl der Analyte ergab. Um die Interpretation der Interaktionseffekte zu erleichtern, wurden zusätzlich Interaktionsgraphiken erstellt.

Es wurden außerdem Korrelationsberechnungen nach Pearson durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Eicosanoidkonzentrationen im Serum und im Gehirn zu identifizieren. Auch hier wurden die p-Werte Bonferroni korrigiert.

3.3 FAAH Enzymassay mit Cannabidiol

Der angewendete Enzymassay wurde von Fegley *et al*. (2005) entwickelt. Er basiert auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms durch den jeweiligen FAAH-Inhibitor. Dabei werden Zellhomogenate, die das FAAH Enzym enthalten, mit potentiellen Inhibitoren und dem radioaktiv markiertem Anandamid ([^{3}H]-Anandamid) als Substrat inkubiert, um herauszufinden ob und wie stark eine Substanz inhibitorisch wirkt. Bei der Inkubation hemmt der Inhibitor zeitabhängig das Enzym. Die Menge an radioaktiv markierten Ethanolamin in der wässrigen Phase, dessen Bildung aus Substrat [^{3}H]-Anandamid durch FAAH katalysiert wird, gilt als Maß für die Stärke der Inhibition. Es gilt je potenter ein Inhibitor ist, desto weniger radioaktiv markiertes Ethanolamin wird gebildet. Mit Hilfe verschiedener Inhibitorkonzentrationen kann eine Dosis-Wirkungskurve aufgezeichnet und die IC_{50}, die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird, ermittelt werden.

3.3.1 Materialien

3.3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

[^{3}H]-AEA (Anandamid[ethanolamin-1-3H]) (10000 dpm, spezifische Aktivität: 20 Ci/mmol)	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA
Albumin aus Rinderserum (BSA), lyophilisiertes Pulver, ≥ 98 % , Fettsäure-frei	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Cannabidiol, API (active pharmaceutical ingredient) Grade for *in vivo* applications	THC -Pharm GmbH, Frankfurt/ Main, D
Chloroform HPLC grade, ≥ 99, 8 %	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), PCR Reagenz	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA
Isofluran	Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ, USA
Kochsalzlösung, phosphatgepuffert, PBS, pH 7,4	Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Methanol, HPLC grade, ≥ 99,9 %	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Szintillationscocktail	Ultima Gold™, PerkinElmer, Santa Clara, CA, USA
Sucrose, ≥ 99,5 %	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA

Tris-HCl Puffer, pH 8, UtraPure™, 1 M	Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Wasser aus MilliQ-Anlage	EMD Millipore, Billerica, MA, USA

3.3.1.2 Geräte

Flüssigszintillationszähler	Beckman LS 6500, Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN, USA
Homogenisator	Fisher scientific Power Gen 500, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Pipetten	Gilson Pipetman Classic™ 1- 10 µl Gilson Pipetman Classic™ 2- 20 µl Gilson Pipetman Classic™ 20- 100 µl Gilson Pipetman Classic™ 50- 200 µl Gilson Pipetman Classic™ 200-1000 µl Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhelfer	Pipet Aid portable, Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2®, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
UV Meter	SpectraMax M5, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA
Wasserbad	Fisher scientific Isotemp 2100, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Zentrifuge	AllegraTM 6R, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA

3.3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Fisherbrand® Glasröhrchen aus Borosilikatglas, 12 x 75 mm	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Pipettenspitzen (10, 250, 1000 μl)	Rainin Instrument LLC, Oakland, CA
Fisherbrand® Szintillationsröhrchen, HDPE, 7 ml	Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA

3.3.1.4 Software

Excel® für Mac 2011	Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA
Prism 5 für Mac® OS X, Version 5.0a	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

3.3.2 FAAH-Enzym Aufbereitung

Nach Dekapitation unter Isofluran-Narkose wurden die Gehirne von männlichen, adulten Wistar Ratten sofort entnommen und in eiskaltem Tris-HCl Puffer (20 mM, 10 vol, pH 7,4), der mit 0,32 M Sucrose versetzt war, homogenisiert. Die Homogenate wurden zuerst für 15 min bei 800 g und dann für 30 min bei 27000 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit PBS wieder aufgelöst und die FAAH-Proteinkonzentration mittels Bradford Assay an einem UV-Meter bestimmt.

3.3.3 Herstellung der Ausgangslösungen

3.3.3.1 Puffer

Für alle Inkubationen wurde 50 mM TRIS-HCl Puffer, pH 8 verwendet. Der Puffer wurde mit 0,05 % BSA versetzt und gut vermischt.

3.3.3.2 Cannabidiol

Es wurde zunächst eine 100 mM Stammlösung von Cannabidiol in DMSO hergestellt. Aus der Stammlösung wurden Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen angefertigt: 3 μM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 3 mM, 0.01 M, 0.03 M und 0,1 M. Die Endkonzentration von DMSO im Assay betrug 1 %.

3.3.3.3 Protein-Pufferlösung

Das in 3.3.2 gewonnene Protein wurde in den Tris-HCl Puffer, pH 8 gegeben (0,112 mg/ml) und gevortext. Für jeden Assay wurden 50 μg Protein verwendet.

3.3.4 Inkubation

Für die Enzymexperimente wurden jeweils Glasröhrchen im Triplikat vorbereitet. Vehikelproben wurden angefertigt, bei denen kein Inhibitor zugefügt wurde, so dass FAAH in diesen Negativkontrollen nicht gehemmt wurde. Während für die Vehikel- und Inhibitorproben Pufferlösung mit Protein verwendet wurde (siehe 3.3.2), wurden als weitere Negativkontrolle sogenannte Leerproben hergestellt, die lediglich die Pufferlösung mit Substrat enthielten. Mit ihnen konnte die Hydrolyse-Rate bestimmt werden, die für das Substrat [^{3}H]- Anandamid ohne FAAH Protein vorliegt.

Zu diesen vorbereiteten Proben wurden dann jeweils 50 μl [^{3}H]-Anandamid hinzugefügt. Als letztes wurden jeweils 5 μl der Inhibitorlösungen in den genannten Konzentrationen (siehe 3.3.3.2) dazugegeben, wobei die Endkonzentrationen in den Glasröhrchen hundertfach verdünnt vorlagen (0,03 μM, 0,3 μM, 1 μM, 3 μM, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM und 1 mM). Anstatt des Inhibitors wurden die Leer- und

Vehikelproben mit 5 µl DMSO versetzt. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die hergestellten Inkubationslösungen in µl.

Tabelle 11: Herstellung der Inkubationsproben (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Inkubationsprobe	Puffer	Proteinpufferlsg.	CBD	DMSO	[^{3}H]-AEA
Vehikelprobe	-	445	-	5	50
Leerprobe	445	-	-	5	50
Inhibitorprobe	-	445	5		50

Im Anschluss wurden alle Glasröhrchen gevortext und im Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion mittels 1 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) gestoppt und die Röhrchen erneut gevortext. Darauf folgte Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C für 15 min.

600 µl des wässrigen Überstandes wurden abgenommen und in Szintillationsröhrchen überführt, die bereits mit 5 ml Szintillationscocktail gefüllt waren. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurde ein weiteres mit 5 ml Szintillationscocktail gefülltes Szintillationsröhrchen mit 50 µl [^{3}H]-Anandamid versetzt. Alle Röhrchen wurden geschüttelt, gevortext und anschließend die Radioaktivität in cpm (engl. counts per minute) im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

3.3.4.1 Datenauswertung

Die Hydrolyse-Aktivität des FAAH-Enzyms wurde folgendermaßen berechnet:

$$Hydrolyse - Aktivität\ [\%] = \frac{\left(gemessene\ Probe\ (cpm) - Mittelwert\ Leerproben\ (cpm)\right) * 100}{(Mittelwert\ Vehikelproben - Mittelwert\ Leerproben)(cpm)}$$

Anschließend wurden die logarithmierten Werte der Inhibitor-Konzentrationen gegen die Hydrolyse-Aktivität des FAAH Enzyms aufgetragen. Aus der resultierenden Dosis-Wirkungskurve wurde dann die IC50 bestimmt.

4 Ergebnisse Zwillingsstudie

Die Zwillingsstudie beschäftigte sich mit der Frage, ob sich die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid und 2-AG sowie der strukturell verwandten Fettsäureethanolamide OEA und PEA im Plasma monozygoter Zwillinge mit Diskordanz für Schizophrenie bzw. für eine bipolare Erkrankung unterscheiden. Zudem wurde überprüft, ob die Plasmaspiegel der diskordanten Zwillinge von denen gesunder Kontrollzwillingspaare differieren. Hierzu wurden die Plasmaproben aufbereitet und die Analyte mittels LC-MS bestimmt (siehe Kapitel 3.1.3).

4.1 Kalibriergeraden der Endocannabinoide

Um die Konzentrationen der Analyte im Humanplasma zu bestimmen, wurden Kalibriergeraden erstellt (siehe 3.1.3.3). Die Kalibriergeraden von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA und PEA sind in der Abbildung 17 dargestellt. Da für mindestens 2/3 der Datenpunkte jeder Kalibriergerade gilt, dass die Abweichung vom Sollwert bei Konzentrationen nahe der Quantifizierungsgrenze nicht mehr als 20 % und bei allen anderen Konzentrationen nicht mehr als 15 % beträgt, konnten die Kalibriergeraden als geeignet angesehen werden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist in allen Fällen > 0,99, so dass von einer sehr guten Anpassung des mathematischen Modells an die experimentell ermittelten Werte ausgegangen werden kann.

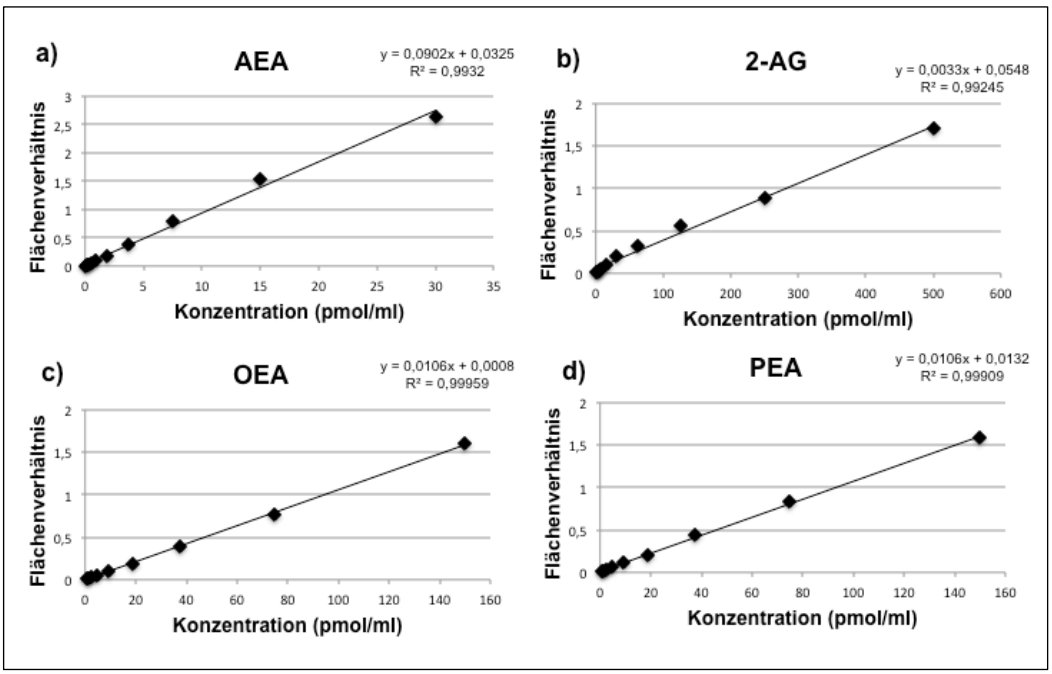


Abbildung 17:
Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Anandamid (AEA) (a), 2-AG (b), OEA (c) u. PEA (d)

4.2 Messergebnisse der Konzentrationsbestimmung von Anandamid, OEA, PEA und 2-AG mittels LC-MS

Die Vermessung der Plasmaproben erfolgte nach dem in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Verfahren. In den nachstehenden Tabellen sind die Messergebnisse von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA und PEA im Plasma der 80 Probanden des Studienkollektivs dargestellt. Alle Konzentrationen lagen innerhalb der Kalibrierungsbereiche (siehe 4.1).

Die genauen Messergebnisse aller 40 Zwillingspaare (80 Probanden) gehen aus Tabelle 12, 13 und 14 hervor. Die entsprechenden Mediane sowie die Perzentile (0, 25, 75 und 100) werden im Abschnitt 4.3 angegeben.

Tabelle 12: Zwillingspaare (25) diskordant für Schizophrenie - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml], Proband 1: gesunder Zwilling, Proband 2: kranker Zwiling, Transit-Zwillinge gelb gekennzeichnet (AEA= Anandamid)

Proband 1	AEA	OEA	PEA	2-AG	Proband 2	AEA	OEA	PEA	2-AG
1 A	5,22	0,00	29,04	64,15	**1 B**	6,61	0,00	7,76	59,02
2 A	8,33	0,00	28,86	92,37	**2 B**	11,34	0,00	21,21	36,74
3 A	7,56	1,04	36,74	23,52	**3 B**	5,36	0,29	24,58	80,04
4 A	6,52	0,27	20,67	14,73	**4 B**	5,64	4,04	58,75	0,00
5 A	5,24	0,00	36,86	19,10	**5 B**	4,52	0,00	50,41	4,11
6 A	6,57	0,00	20,43	17,35	**6 B**	5,05	2,48	33,19	0,69
7 A	3,66	0,00	17,39	0,00	**7 B**	3,73	0,01	3609,6	0,00
8 A	6,69	0,00	45,23	24,25	**8 B**	6,31	0,79	22,99	33,06
9 A	5,04	0,00	21,63	0,00	**9 B**	5,64	0,00	13,33	42,34
10 A	6,70	0,00	32,44	23,61	**10 B**	8,33	0,00	49,09	51,17
11 A	5,72	0,00	26,21	13,70	**11 B**	7,83	1,30	43,73	30,51
12 A	8,21	1,93	17,69	41,90	**12 B**	6,60	0,00	19,20	1,07
13 A	8,36	0,00	36,47	58,01	**13 B**	9,26	0,00	21,91	40,51
14 A	8,14	0,95	21,88	24,99	**14 B**	8,50	0,00	20,88	43,28
15 A	12,62	2,97	65,67	110,52	**15 B**	6,12	2,43	14,08	18,65
16 A	5,85	0,00	17,84	17,39	**16 B**	5,15	0,00	13,00	0,84
17 A	12,61	1,77	22,24	18,88	**17 B**	9,51	0,00	23,41	16,41
18 A	8,18	0,00	5,35	22,25	**18 B**	7,18	0,00	17,66	29,25
19 A	11,95	0,00	24,16	42,31	**19 B**	11,94	0,00	16,73	30,01
20 A	11,05	0,00	23,26	13,18	**20 B**	13,44	0,00	21,39	41,75
21 A*	6,23	0,00	6,37	0,00	**21 B**	5,22	0,00	11,19	0,00
22 A*	3,18	5,15	65,55	0,00	**22 B**	4,30	2,08	40,69	7,87
23 A*	5,27	2,14	52,61	6,60	**23 B**	4,74	0,00	9,74	15,51
24 A*	5,97	0,21	17,45	13,21	**24 B**	5,97	0,98	9,50	25,23
25 A*	5,29	0,53	22,75	28,33	**25 B**	6,61	0,00	21,15	24,41

Tabelle 13: Zwillingspaare (7) diskordant für bipolare Erkrankungen - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml], Proband 1: gesunder Zwilling, Proband 2: kranker Zwiling (AEA= Anandamid)

Proband 1	**AEA**	**OEA**	**PEA**	**2-AG**	Proband 2	**AEA**	**OEA**	**PEA**	**2-AG**
26 A	11,93	9,30	26,84	32,81	**26 B**	12,22	3,57	4,03	39,19
27 A	6,75	0,34	11,61	0,00	**27 B**	6,68	0,14	18,08	8,13
28 A					**28 B**	6,74	0,00	9,38	6,48
29 A	8,61	0,00	25,46	34,49	**29 B**	7,46	0,72	18,56	17,06
30 A	9,83	0,42	15,76	63,64	**30 B**	8,88	1,68	16,07	53,83
31 A	8,26	0,00	12,30	8,52	**31 B**	8,43	0,24	19,38	1,23

Tabelle 14: gesunde Kontrollen (8) - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml] (AEA= Anandamid)

Proband 1	**AEA**	**OEA**	**PEA**	**2-AG**	Proband 2	**AEA**	**OEA**	**PEA**	**2-AG**
33 A	4,51	0,00	3,94	0,00	**33 B**	3,63	0,00	3,82	0,00
34 A	5,73	0,00	0,00	29,69	**34 B**	3,86	0,00	9,11	0,00
35 A	4,19	1,56	0,26	17,09	**35 B**	4,89	0,41	2,31	25,79
36 A	4,54	0,00	16,37	31,11	**36 B**	3,72	0,00	2,73	35,27
37 A	4,63	0,78	2,34	19,47	**37 B**	6,10	0,59	0,00	18,34
38 A	4,90	0,56	9,14	3,36	**38 B**	6,61	0,60	0,00	0,00
39 A	4,07	21,40	1,26	0,00	**39 B**	3,45	0,41	2,40	0,00
40 A	3,11	0,00	1,98	1,06	**40 B**	3,74	0,00	0,00	11,15

4.3 Statistische Auswertung der Messergebnisse

4.3.1 Anandamid

Bei den gesunden Kontrollen lag die mittlere Konzentration von Anandamid im Plasma bei 4,33 pmol/ml (3,43, 3,92; 5,08, 5,75 pmol/ml für die Perzentile 0, 25; 75, 100). Bei den für Schizophrenie diskordanten Zwillinge wiesen sowohl die gesunden als auch die erkrankten Zwillinge signifikant höhere Plasmakonzentrationen von Anandamid auf (siehe Abbildung 18 A; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, $W_s = 64$, $z = -3,03$, $p = 0,002$; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, $W_s = 62$, $z = -3,11$, $p = 0,001$). Dabei unterschieden sich die ermittelten Anandamidwerte der kranken Zwillinge nicht von denen der gesunden (6,31 [3,73, 5,22; 8,33, 13,44] pmol/ml vs. 6,57 [3,18, 5,29; 8,21, 12,62] pmol/ml; $z = -0,23$, $p = 0,833$). Allerdings wurden im Vergleich zu den Zwillingen, die gesund blieben (n=20; Anandamid: 7,12 [3,66, 5,75; 8,35, 12,62] pmol/ml), bei den Transit-Zwillingen (n=5), also den gesunden Zwillingen, die zu einem späteren Zeitpunkt erkrankten, im Gegensatz signifikant erniedrigte Plasmakonzentrationen von Anandamid (5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml, $W_s = 35$, $z = -2,04$, $p = 0,042$) beobachtet.

Bei den für bipolare Störungen diskordanten Zwillingen wurden ebenso erhöhte Plasmakonzentrationen von Anandamid gefunden (siehe Abbildung 19 A; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, $W_s = 36$, $z = -3,24$, $p < 0,001$; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, $W_s = 36$, $z = -3,10$, $p = 0,001$). Die kranken Zwillinge unterschieden sich nicht von den gesunden Zwillingen (7,46 [6,68, 6,74; 8,88, 12,22] pmol/ml vs. 9,22 [6,75, 8,26; 10,12, 11,93] pmol/ml; $z = -1,15$, $p = 0,313$).

4.3.2 2-Arachidonoylglycerol (2-AG)

In den Plasmaproben der gesunden Kontrollen konnte eine mittlere 2-AG-Konzentration von 10,47 pmol ([0,00, 0,84; 20,17, 33,19] pmol/ml) nachgewiesen werden. Die für Schizophrenie diskordanten Zwillinge wiesen keine signifikant veränderten Plasmakonzentrationen von 2-AG auf (siehe Abbildung 18 B; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, $W_s = 99$, $z = -1,56$, $p = 0,126$; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, $W_s = 101$, $z = -1,48$, $p = 0,146$). Die ermittelten 2-AG-Konzentrationen der kranken Zwillinge unterschieden sich nicht von denen der gesunden (25,23 [0,00, 4,11; 40,51, 80,04] pmol/ml vs. 19,10 [0,00, 13,21; 28,33, 110,52] pmol/ml; $z = -0,03$; $p = 0,99$). Die Transit-Zwillinge (n=5) zeigten signifikant erniedrigte Plasmakonzentrationen von 2-AG (5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml) im Gegensatz zu den Zwillingen, die gesund blieben (n=20; 5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml, $W_s = 36$, $z = -1,97$, $p = 0,049$).

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der 2-AG-Plasmakonzentration bei den Zwillingen, die diskordant für bipolare Erkrankungen waren, gefunden (siehe Abbildung 19 B; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, $W_s = 54$, $z = -1,16$, $p = 0,268$; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, $W_s = 52$, $z = -1,04$, $p = 0,341$). Die kranken Zwillinge unterschieden sich nicht von den gesunden Zwillingen (17,06 [1,23, 6,48; 39,19, 53,83] pmol/ml vs. 20,67 [0,00, 7,44; 34,49, 63,64] pmol/ml; $z = -0,31$, $p = 0,844$).

4.3.3 Oleoylethanolamid (OEA)

Im Plasma der gesunden Kontrollen wurde ein mittlerer OEA-Spiegel von 0,20 pmol/ml ([0,00, 0,00; 0,63, 0,99] pmol/ml) gefunden. Im Vergleich zu den Kontrollzwillingen zeigten die für Schizophrenie diskordanten Zwillinge keine signifikant veränderten OEA-Konzentrationen (siehe Abbildung 18 D; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, $W_s = 419$, $z = -0,29$, $p = 0,773$; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, $W_s = 423$, $z = -0,09$, $p = 0,946$). Die ermittelten Werte für die kranken Zwillinge differierten nicht von denen ihrer gesunden Co-Zwillinge (0,00 [0,00, 0,00; 0,79, 4,04] pmol/ml vs. 0,00 [0,00, 0,00; 0,95, 5,15] pmol/ml; $z = -0,41$; $p = 0,715$). Die Transitzwillinge zeigten

OEA-Plasmakonzentrationen (n=5; 5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml), die nicht von denen der Zwillinge, die gesund blieben, differierten (n=20; 5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml, W_s = 235, z = -1,92, p = 0,093).

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der OEA-Plasmakonzentration bei den Zwillingen, die diskordant für bipolare Erkrankungen sind, gefunden (siehe Abbildung 19 D; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, W_s = 57, z = -0,84, p = 0,434; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, W_s = 55, z = -0,67, p = 0,530). Die kranken Zwillinge unterschieden sich nicht von den gesunden Zwillingen (0,24 [0,00, 0,00; 1,68, 3,57] pmol/ml vs. 0,38 [0,00, 0,00; 1,87, 9,30] pmol/ml; z = -0,31, p = 0,844).

4.3.4 Palmitoylethanolamid (PEA)

Für PEA wurde im Plasma der gesunden Kontrollzwillinge eine mittlere Konzentration von 2,85 pmol/ml ([0,99, 1,19; 4,57, 9,55] pmol/ml) detektiert. Die diskordanten Zwillinge wiesen signifikant höhere Plasmakonzentrationen von PEA auf (siehe Abbildung 18 C; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, W_s = 38, z = -4,09, p < 0,001; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, W_s = 38, z = -4,18, p < 0,001). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den kranken Zwillingen und den gesunden (21,18 [7,76, 13,52; 31,04, 58,75] pmol/ml vs. 23,26 [5,35, 19,14; 36,61, 65,67] pmol/ml; z = -1,14; p = 0,264). Die Transitzwillinge wiesen PEA-Plasmaspiegel auf (n=5; 5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml), die sich nicht von denen der Zwillinge, die gesund blieben, unterschieden (n=20; 5,29 [3,18, 4,23; 6,10, 6,23] pmol/ml, W_s = 260, z = 0,00, p = 1,000).

Bei den für bipolare Störungen diskordanten Zwillingen wurden auch erhöhte Plasmakonzentrationen von PEA gefunden (siehe Abbildung 19 C; gesunde Kontrollen vs. kranke Zwillinge, W_s = 40, z = -2,78, p = 0,004; gesunde Kontrollen vs. gesunde Zwillinge, W_s = 36, z = -3,10, p = 0,001). Die kranken Zwillinge unterschieden sich nicht von den gesunden Zwillingen (16,17 [4,03, 9,38; 18,56, 19,38] pmol/ml vs. 15,13 [11,61, 12,13; 25,81, 26,84] pmol/ml; z = -0,31, p = 0,844).

Die PEA-Plasmakonzentrationen der Gruppe der Zwillinge diskordant für Schizophrenie war im Vergleich zur Gruppe der Zwillinge diskordant für bipolare Störungen signifikant erhöht (n=25; 22,82 [8,78, 18,40; 34,11, 3,12] pmol/l vs. n=7; 15,43 [9,38, 13,40; 15,92, 22,01] pmol/ml; p = 0,006).

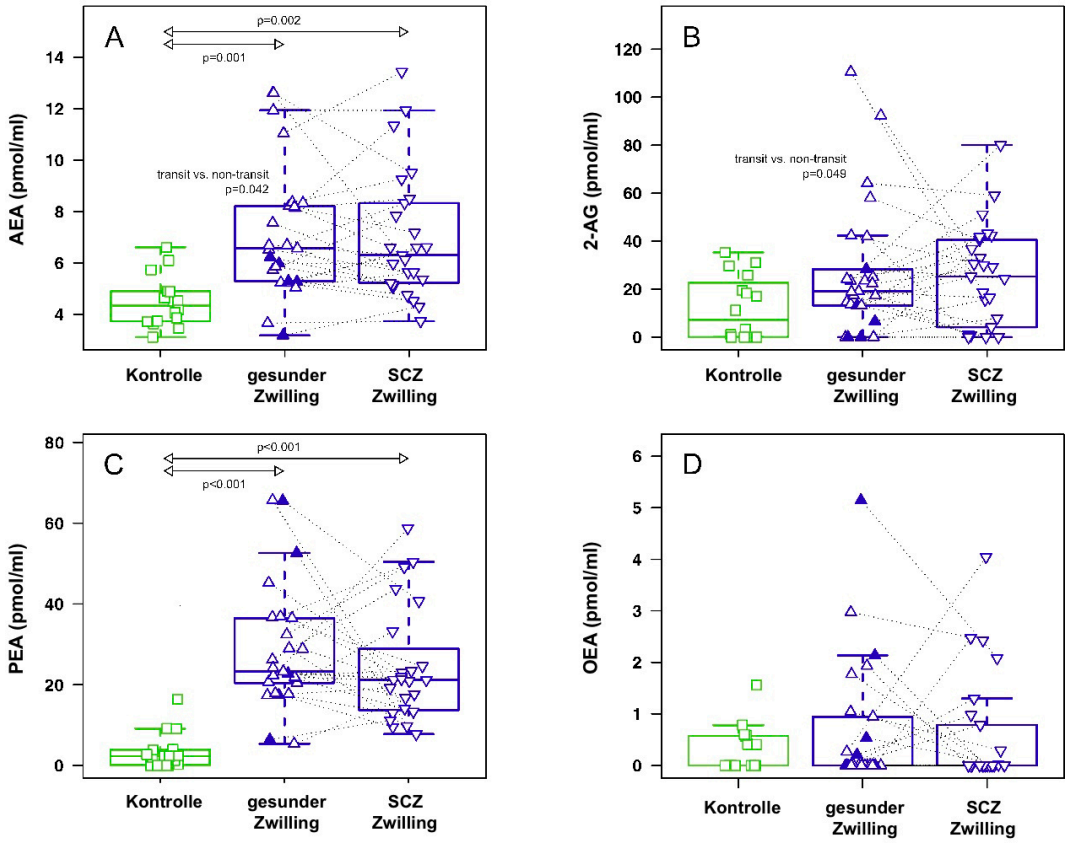


Abbildung 18:
Box-Whisker-Plot: Zwillinge diskordant für Schizophrenie

(dargestellt sind das 25., 50. und 75. Perzentil der empirischen Verteilung sowie mit Hilfe der Antennen der jeweils kleinste und größte Wert ohne Berücksichtigung der Ausreißer).

Die Graphen zeigen die Plasmakonzentrationen der gesunden Kontrollen (Kontrolle; 8 Zwillingspaare, 16 Probanden) versus **(A)** Anandamid **(AEA)** in den diskordanten, gesunden Zwillingen (gesunder Zwilling; p = 0,001) und den entsprechenden an Schizophrenie erkrankten Zwillingen (SCZ Zwilling; p = 0,002), **(B)** 2-Arachidonoylglycerol **(2-AG)** im Plasma der gesunden (gesunder Zwilling; p = 0,146) und der erkrankten Co-Zwillinge (SCZ Zwilling; p = 0,268), **(C)** Palmitoylethanolamid **(PEA)** bei den gesunden (gesunder Zwilling; p < 0,001) und den kranken Zwillingen (SCZ Zwilling; p < 0,001) und **(D)** Oleoylethanolamid **(OEA)** im Plasma der gesunden Zwillinge (gesunder Zwilling; p = 0,946) und der betroffenen Co-Zwillinge (SCZ Zwilling; p = 0,773). Zwischen den für Schizophrenie diskordanten Zwillingen gab es keinen signifikanten Unterschied für AEA (p = 0,833), 2-AG (p = 0,988), PEA (p = 0,264) und OEA (p = 0,715). Die zuerst gesunden Zwillinge, die später erkrankten (Transit-Zwillinge, n=5, ausgefüllte Dreiecke), zeigten signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen von AEA (p = 0,042) und 2-AG (p = 0,049) im Vergleich zu den gesund gebliebenen Zwillingen (n=20, ungefüllte Dreiecke). Die zusammengehörigen Werte sind mit gestrichelten Linien verbunden.

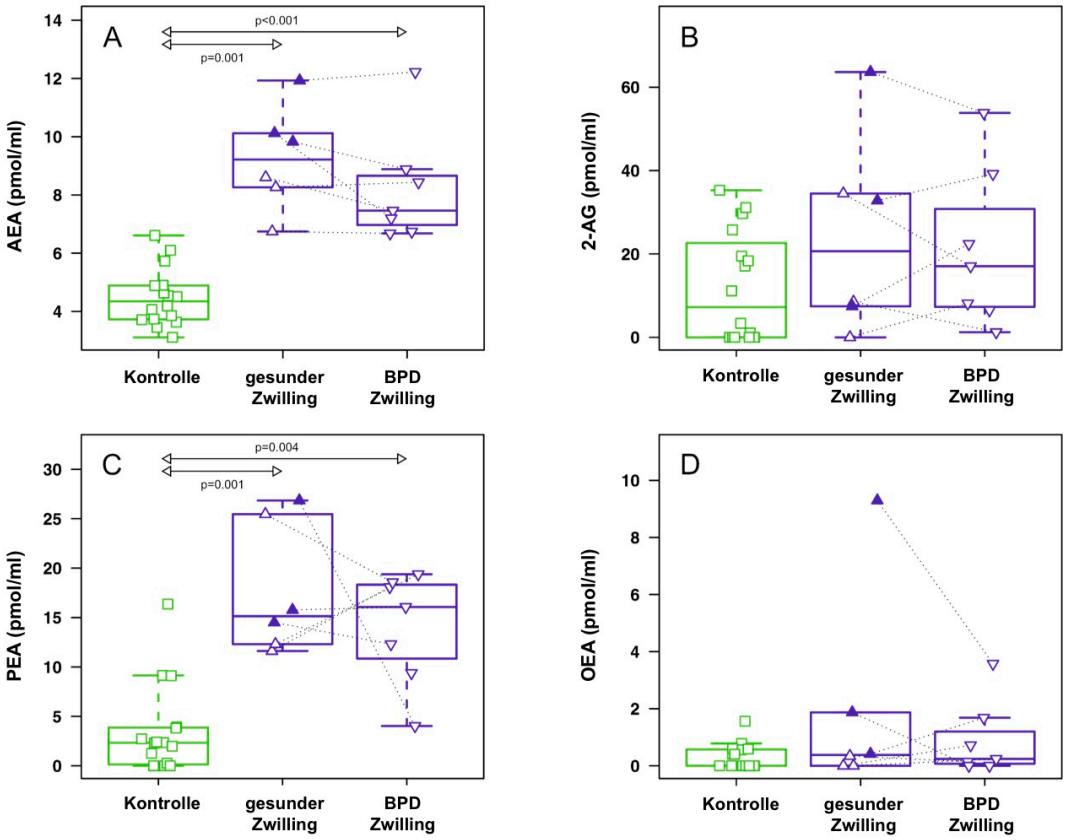


Abbildung 19:
Box-Whisker-Plot: Zwillinge diskordant für bipolare Erkrankungen

(dargestellt sind das 25., 50. und 75. Perzentil der empirischen Verteilung sowie mit Hilfe der Antennen der jeweils kleinste und größte Wert unter Ausschluss der Ausreißer).

Die Graphen zeigen die Plasmakonzentrationen der gesunden Kontrollen (Kontrolle, 8 Zwillingspaare, 16 Probanden) versus **(A)** Anandamid **(AEA)** in den diskordanten, gesunden Zwillingen (gesunder Zwilling; p = 0,001) und den entsprechenden an einer bipolaren Störung erkrankten Zwillingen (BPD Zwilling; p < 0,001), **(B)** 2-Arachidonoylglycerol **(2-AG)** im Plasma der gesunden (gesunder Zwilling; p = 0,341) und der erkrankten Co-Zwillinge (BPD Zwilling; p = 0,212), **(C)** Palmitoylethanolamid **(PEA)** bei den gesunden (gesunder Zwilling; p = 0,001) und den kranken Zwillingen (BPD Zwilling; p = 0,004) und **(D)** Oleoylethanolamid **(OEA)** im Plasma der gesunden Zwillinge (gesunder Zwilling; p = 0,530) und der betroffenen Co-Zwillinge (BPD Zwilling p = 0,434). Zwischen den für eine bipolare Störung diskordanten Zwillingen gab es keinen signifikanten Unterschied für AEA (p = 0,313), 2-AG (p = 0,844), PEA (p = 0,844) und OEA (p = 0,844). Die zuerst gesunden Zwillinge, die später erkrankten (Transit-Zwillinge, n=5, ausgefüllte Dreiecke) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den gesund gebliebenen Zwillingen. Die zusammengehörigen Werte sind mit gestrichelten Linien verbunden.

5 Diskussion Zwillingsstudie

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu überprüfen, ob sich die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid und 2-AG sowie der verwandten Fettsäure-ethanolamide OEA und PEA im Plasma von monozygoten Zwillingen mit Diskordanz für Schizophrenie bzw. für eine bipolare Erkrankung unterscheiden und ob sie von gesunden Kontrollzwillingspaaren differieren. Es wurde ebenso die Hypothese getestet, ob eine Erhöhung der Anan-damid-Plasmaspiegel sich auch in den gesunden, monozygoten Co-Zwillingen zeigt und sich somit von den Kontrollzwillingen unterscheidet.

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen waren im Plasma der für Schizophrenie diskordanten Zwillinge die Werte für Anandamid und PEA unabhängig davon erhöht, ob der Zwilling gesund oder krank war. Die 2-AG- und OEA-Plasmakonzentrationen hingegen unterschieden sich nicht von den gesunden Kontrollzwillingen. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den früheren Befunden (siehe 1.3.3) in unbehandelten, erstmanifesten paranoiden Schizophrenen (Giuffrida et al., 2004; Leweke et al., 1999a) und in Patienten im initialen Prodromal-Stadium (Koethe et al., 2009a), bei denen die Anandamidspiegel ausschließlich in CSF erhöht waren, während die Plasma- bzw. Serumwerte sich nicht von den Kontrollen unterschieden. Allerdings detektierten sowohl De Marchi *et al*. (2003) als auch Potvin *et al*. (2008) in chronisch schizophrenen Patienten erhöhte Anandamidkonzentrationen im Plasma. Vermutlich können erhöhte Spiegel zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung auch in der Peripherie detektiert werden, während dies in frühen Phasen der Erkrankung ganz überwiegend in CSF möglich ist. Des Weiteren wurde in der kürzlich veröffentlichten Studie bei Schizophreniepatienten unter Cannabidiolgabe ein Anstieg der Anandamidkonzentration im Serum gefunden, der signifikant mit der Abnahme der psychotischen Symptome assoziiert war (Leweke et al., 2012b). In diesem Fall kann von einer systemischen Modulierung der Anandamidkonzentration ausgegangen werden, die in verschiedenen Krankheitsphasen aussagekräftig ist.

In dem in der Einleitung bereits erläuterten Modell über die funktionelle Relevanz des Endocannabinoidsystem im Kontext der Schizophrenie wird vorgeschlagen, das Anandamid eine adaptive oder sogar protektive Rolle spielt (Koethe et al., 2009a; Leweke und Koethe, 2008). Eine (Über-)Aktivierung von D_2-Rezeptoren scheint im Sinne der Dopaminhypothese der Schizophrenie (van Rossum, 1966) sowohl mit der Ausbildung psychotischer Symptome als auch mit einem Anstieg der Anandamidfreisetzung im ZNS verbunden zu sein (Giuffrida et al., 1999). Den Dopamin-vermittelten psychotischen Symptomen wird somit durch Steigerung des endogenen, adaptiven

Rückkopplungsmechanismus entgegengewirkt (siehe 1.3.3). Bei Personen im initialen Prodromal-Stadium, dem Frühstadium der Erkrankung, wurde auch ein erhöhter Anandamidspiegel gefunden, wobei die Patienten mit niedrigeren Anandamid-konzentrationen häufiger und früher an einer akuten Schizophrenie erkrankten. Dies spricht für die geschilderte protektive Rolle von Anandamid (Koethe et al., 2009a). Die Daten der vorliegenden Zwillingsstudie zeigen, dass die Anan-damidkonzentrationen sowohl in den kranken als auch in den gesunden, monozygoten Zwillingen erhöht sind. Das bedeutet, dass bei den nicht erkrankten Zwillingen, die genetisch gesehen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Schizophrenie aufweisen, das Endocannabinoidsystem bereits aktiviert zu sein scheint, was an einer Steigerung der Anandamidkonzentration zu erkennen ist. Dies stützt die Annahme, dass Anandamid im Kontext der Schizophrenie eine protektive Rolle spielt, in dem durch die Aktivierung des Endocannabinoidsystems frühzeitig vor klinischer Manifestation der Erkrankung potentiell pro-psychotischen Neurotransmitterungleichgewichten entgegenwirkt wird. Da die Anandamidspiegel sowohl beim gesunden als auch beim kranken Zwilling erhöht sind, kann man davon ausgehen, dass diese Messgröße genetisch beeinflusst wird und nicht auf das Krankheitsstadium bezogen ist. Somit werden die Veränderungen der Anan-damidkonzentrationen scheinbar mehr durch genetische Grundlagen als durch Umweltfaktoren wie beispielsweise Medikation beeinflusst (siehe 1.4). Interessanterweise zeigten die sogenannten Transit-Zwillinge, die monozygoten Zwillinge, die zum Zeitpunkt der Studie noch gesund waren, aber später erkrankten, signifikant niedrigere Anandamidspiegel als die Zwillinge, die gesund blieben. Dieses Ergebnis spricht für das oben genannte Modell, da geringere Anandamidspiegel offensichtlich der Entstehung einer Schizophrenie weniger entgegenwirken und den Ausbruch der Erkrankung begünstigen.

Die für bipolare Erkrankungen diskordanten Zwillingspaare zeigten ebenso im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöhte Anandamidspiegel. Im Gegensatz zur Schizophrenie gibt es nur wenige Untersuchungen zur Pathophysiologie des Endocannabinoidsystems bei bipolaren Erkrankungen. In der oben genannten CSF-Studie (Giuffrida et al., 2004) wurde bei Patienten mit affektiven Störungen wie bipolare Erkrankungen keine Erhöhung der Anandamidkonzentration in CSF gefunden. Allerdings war das Kollektiv sehr klein, so dass eine abschließende Schlussfolgerung nicht gezogen werden konnte. Auch auf Rezeptorebene fanden sich bei CB_1-Rezeptor Expressionsstudien im anterioren zingulären Kortex keine Veränderungen der Dichte bei bipolar Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Koethe et al., 2007). Dagegen konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Anandamidspiegels durch FAAH-Inhibition mittels URB 597 zu einer

antidepressiva-ähnlichen Wirkung im „forced swim test“ und „mouse tail suspension test“ führt (Bortolato et al., 2007; Gobbi et al., 2005). Das Endocannabinoidsystem scheint also auch einen Einfluss auf die Emotionsregulation zu haben. Die gefundene Erhöhung der Anandamidkonzentrationen in den für eine bipolare Erkrankung diskordanten Zwillingen bestätigen diese Ergebnisse. Des Weiteren deuten verschiedene molekulargenetische und populationsbasierte Studien darauf hin, dass Schizophrenie und bipolare Störungen teilweise gemeinsame genetische Ursachen besitzen, was sich auch in ähnlichen Symptomen und Ansprechen auf die Arzneitherapie zeigt (siehe 1.3.2; (Lichtenstein et al., 2009; Owen et al., 2007). Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Erkrankungen ist auch eine analoge Modulation durch das Endocannabinoidsystem, hier die Erhöhung des Anandamidspiegels, denkbar.

Neben Anandamid waren auch die PEA-Konzentrationen bei den für Schizophrenie diskordanten Zwillingen gegenüber den Kontrollzwillingen signifikant erhöht. Dies stimmt mit den Ergebnissen der bereits erwähnten Studie von Potvin *et al*. (2008) überein, in der ebenso erhöhte PEA-Spiegel gefunden wurden. Bei den kranken Zwillingen waren die PEA-Konzentrationen tendenziell niedriger als bei den gesunden Zwillingen. Für PEA, ein strukturverwandtes Lipid von Anandamid, sind weitaus weniger Daten verfügbar. Es aktiviert PPARα-Rezeptoren und zeigt gut belegte analgetische, antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkungen (Lo Verme et al., 2005a; LoVerme et al., 2006) (siehe 1.2.2). Die erhöhten PEA-Spiegel könnten in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Schizophrenie stehen. So konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Individuen mit kürzlich zurückliegenden Beginn der Erkrankung erhöhte Plasma- und CSF-Spiegel von IgG Antikörpern gegen Cytomegalivirus und Toxoplasma gondii im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen (Leweke et al., 2004b). In einer neueren Studie von Hayes et al. (2014) wurde zwar keine Erhöhung der CSF-Konzentrationen von Toxoplasma gondii Antikörpern bei Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden, allerdings unterschied sich die Expression verschiedener Moleküle wie beispielsweise von IL-6R (Interleukin-6 Rezeptor), Fibrinogen, TGFα (Transformierender Wachstumsfaktor) und ACE (Angiotensin-konvertierendes Enzym) in den Patientengruppen stark von den Kontrollen. Darüber hinaus korrelierte die Verminderung einiger dieser Substanzen (IL-6R, TGFα, ACE), die auch an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, mit Toxoplasma gondii Antikörpern in CSF. Diese Befunde unterstützen die Theorie, dass inflammatorische Prozessen in der Pathophysiologie der Schizophrenie eine Rolle spielen (Torrey und Yolken, 2003; Torrey et al., 2006). Die PEA-Konzentrationen könnten erhöht sein, um entzündlichen Vorgängen entgegenzuwirken. Interessanterweise unterschieden sich die Transit-Zwillinge in Bezug auf die PEA-Spiegel nicht von

den gesunden Zwillingen. PEA stellt daher möglicherweise eher einen State-Marker und keinen genetisch basierten Trait-Marker dar, der Aufschluss über die Symptomatik der Erkrankung geben kann (siehe 1.4).

In den bipolar erkrankten Zwillingen waren ebenfalls die PEA-Spiegel im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen erhöht. Im Vergleich mit den für bipolare Erkrankungen diskordanten Zwillingen waren die PEA-Konzentrationen der für Schizophrenie diskordanten Zwillinge signifikant erhöht. Schizophrenie könnte demnach mit stärkeren entzündlichen Prozessen assoziiert sein als bipolare Erkrankungen, was sich möglicherweise in hohen PEA-Konzentrationen wiederspiegelt.

In der vorliegenden Studie wurden in keiner Gruppe Unterschiede der OEA-Konzentrationen gefunden, was bedeuten könnte, dass OEA nicht in die pathophysiologischen Prozesse der Schizophrenie und bipolarer Störungen involviert ist. Es scheint an der metabolischen Regulation beteiligt zu sein, da es als intestinaler Sättigungsfaktor agiert und eine wichtige Rolle in der peripheren Regulation des Energiegleichgewichts spielt (Fu et al., 2003; Fu et al., 2005) (siehe 1.2.2). In einer Studie wurde bei Probanden eine Erhöhung der OEA-Spiegel unter Schlafentzug gefunden (Koethe et al., 2009b). Da bekannt ist, dass Schlafentzug propsychotisch wirken kann, wäre denkbar gewesen, dass die OEA-Konzentrationen auch bei den schizophrenen Patienten in dieser Studie erhöht sind. Dies war allerdings bei diesen chronischen Patienten wie beschrieben nicht der Fall.

Vergleichbar zur Studie von Potvin *et al*. (2008) zeigten sich für 2-AG keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration zwischen schizophrenen Patienten, deren gesunden Zwillingen und den Kontrollen.

Verschiedene Gruppen haben dargelegt, dass 2-AG eine Rolle bei der Ausbildung kognitiver Defizite schizophrener Patienten spielt (Eggan et al., 2008; Pryor, 2000). Allerdings unterschieden sich die 2-AG-Konzentrationen ausschließlich bei den Transit-Zwillingen von den signifikant höheren Spiegeln der gesund gebliebenen Zwillinge. Daher ergeben sich aus unseren Daten keine unmittelbaren Hinweise, die die oben genannte Hypothese zur Rolle von 2-AG bei schizophrenen Patienten stützen.

Darüber hinaus wurden keine signifikanten Unterschiede in den 2-AG-Konzentrationen zwischen den bipolar Erkrankten, deren Co-Zwillingen und den gesunden Kontrollen gefunden. Daher bleibt unklar, ob 2-AG eine pathophysiologisch relevante Rolle bei bipolaren Störungen spielt.

Diese Pilotstudie gibt einige Hinweise auf familiäre Aspekte von Endocannabinoidveränderungen im Kontext der Schizophrenie. Die vergleichsweise kleine Stichprobe der bipolaren Zwillinge als nosologisch differenter Kontrollgruppe

kann dabei allenfalls zum Vergleich mit den schizophrenen Zwillingen herangezogen werden. Insgesamt müssen einige Einschränkungen der hier vorliegenden Untersuchung berücksichtigt werden.

Erstens können periphere Endocannabinoidspiegel nicht vollständig Endocannabinoidfunktionen im Gehirn reflektieren (siehe auch 9).

Zweitens konnten die Effekte der antipsychotischen Medikation, die bei allen Patienten individuell verschieden war, nicht kontrolliert werden, da es sich um ein bereits länger zurückliegend rekrutiertes Patienten- und Probandenkollektiv handelt. Daher ist auch davon auszugehen, dass nahezu ausschließlich Antipsychotika der ersten Generation eingesetzt wurden. Potvin *et al*. (2008) fanden keine Veränderung der Endocannabinoidspiegel im Serum bei Quetiapineinnahme. Allerdings fanden sowohl Sundram *et al*. (2005) in ihrer präklinischen Studie einen Einfluss von Clozapin auf CB_1-Rezeptoren als auch De Marchi *et al*. (2003) in ihrer klinischen Studie, bei der in Schizophreniepatienten, die mit Olanzapin therapiert wurden, eine Verminderung der Anandamidspiegel festgestellt werden konnte. Ein Grund für die unterschiedlichen Befunde könnte darin bestehen, dass bei Potvin *et al*. die Patienten in Bezug auf Symptome stabil waren und bereits zu Beginn der Studie länger mit Antipyschotika der zweiten Generation therapiert wurden. Diese chronische Behandlung hat scheinbar keine relevanten Einflüsse auf die Endocannabinoidspiegel im Serum, was für die vorliegende Studie von Bedeutung ist, da auch hier die kranken Zwillinge bereits über mehrere Jahre therapiert wurden. Während somit Antipsychotika der zweiten Generation scheinbar einen geringen Einfluss haben, wurde für Medikamente mit vorwiegend Dopamin $D_{2/3}$-antagonistischem Wirkmechanismus, in CSF ein Effekt auf die Anandamidkonzentrationen nachgewiesen (Giuffrida et al., 2004). Allerdings konnte dies noch nicht in Serum beobachtet werden. Außerdem lässt sich damit nicht die Veränderung bei den nicht erkrankten, monozygoten Zwillingen erklären, da am ehesten ein reduzierender Effekt der Erstgenerationsantipsychotika zu erwarten gewesen wäre.

Drittens gibt es keine Informationen über den Cannabiskonsum des gesamten Studienkollektivs. Hinsichtlich des Einflusses von Cannabiskonsum konnte in einer Vergleichsstudie von antipsychotika-naiven Schizophreniepatienten mit höherem Cannabiskonsum versus solchen mit seltener als 10-maligen Cannabiskonsum gezeigt werden, dass die Anandamidkonzentrationen in CSF der letztgenannten Gruppe sowohl im Vergleich zu gesunden Probanden als auch zur Patientengruppe mit höherfrequentem Cannabiskonsum, die sich diesbezüglich nicht signifikant unterschieden, etwa um den Faktor 10 signifikant erhöht waren (Leweke et al., 2007). Der bei Schizophrenen am ehesten adaptiv hochregulierte Anandamidspiegel scheint

durch Cannabisgebrauch herabgesenkt zu werden. Bei den gesunden Kontrollen bleibt das Anandamidsignalsystem unbeeinflusst. Da somit eine negative Relation in Bezug auf Cannabiskonsum nachgewiesen wurde und in der hier vorliegenden Untersuchung sowohl bei den erkrankten als auch bei den gesunden Zwillingsgeschwistern höhere Endocannabinoidspiegel gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass ein höherer Cannabisgebrauch hier als Einflussgrösse nicht im Vordergrund zu stehen scheint.

Aus der vorliegenden Studie ergeben sich trotz der genannten Einschränkungen und der begrenzten Fallzahl erstmals belastbare Hinweise, dass das Endocannabinoidsystem familiär bei schizophrenen Erkrankungen aktiviert wird und es kann spekuliert werden, dass so möglicherweise die klinische Manifestation der Erkrankung im Sinne des beschriebenen protektiven Mechanismus herausgezögert oder gar unterbunden werden kann. Somit könnte die Beeinflussung des Systems eine neue Behandlungsstrategie bei Schizophrenie darstellen und bei vulnerablen Personen zur Prävention genutzt werden.

6 Ergebnisse Methodenvalidierung

Die Methodenvalidierung wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das neu entwickelte LC-MS/MS-Verfahren zur Quantifizierung der Analyten Anandamid, 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol und Δ^9-THC im Gewebe geeignet ist. Ziel der Validierung ist die Bewertung der Qualität einer Messmethode sowie eine mögliche Ermittlung von Fehlerquellen. Zur Beurteilung der Analysenmethode wurden die in Kapitel 3.2.3.5.2 aufgeführten Qualitätsmerkmale ermittelt.

6.1 Bestimmungsbereich und Linearität

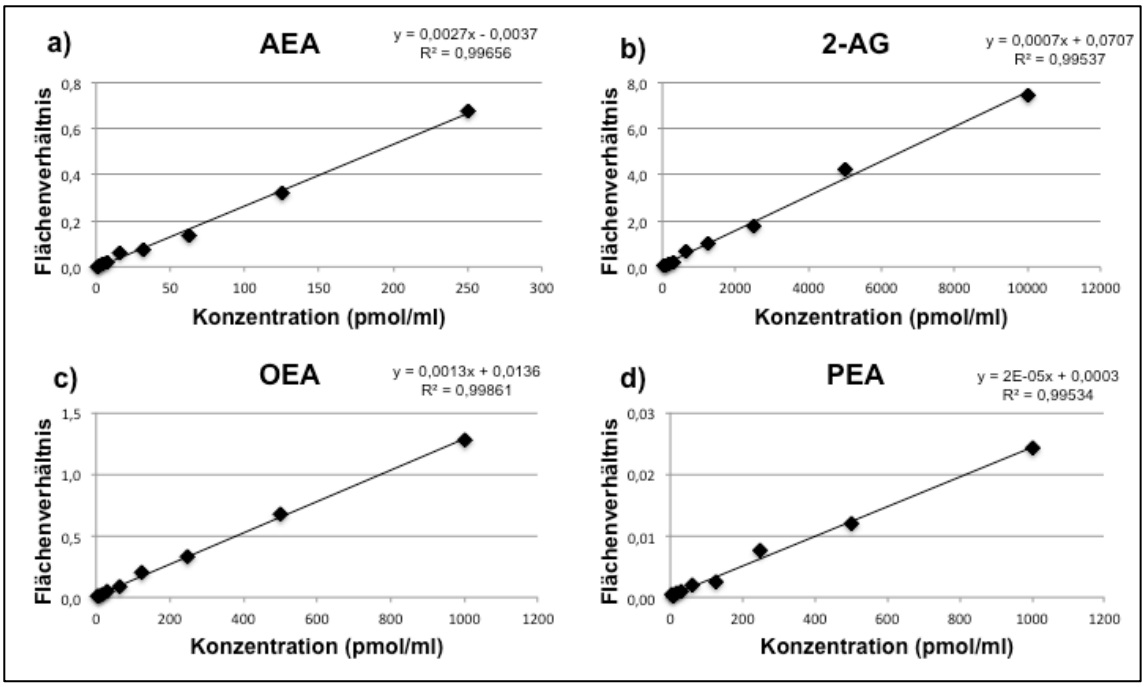


Abbildung 20:
Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Anandamid (AEA) (a), 2-AG (b), OEA (c) und PEA (d)

Die Kalibrierlösungen für die Validierung enthielten die in Kapitel 3.2.3.1 angegebenen Konzentrationen von Anandamid, 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol und Δ^9-THC. Die folgenden Abbildungen 20 und 21 zeigen die einzelnen Kalibriergeraden für Anandamid (AEA), OEA, PEA, 2-AG, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC. Da für mindestens 2/3 der Datenpunkte jeder Kalibriergerade galt, dass die Abweichung vom Sollwert bei Konzentrationen nahe der Quantifizierungsgrenze nicht mehr als 20 % und bei allen anderen Konzentrationen nicht mehr als 15 % betrug, konnten die Kalibriergeraden als geeignet angesehen werden. 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.

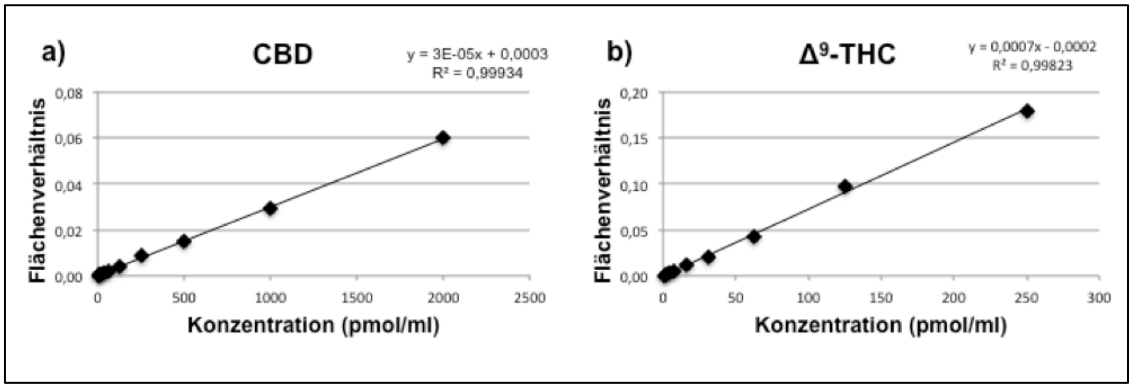


Abbildung 21:
Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Cannabidiol (CBD) (a) und Δ9-THC (b)

6.2 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit wurden Qualitätskontrollproben (QCs) mit den in Kapitel 3.2.3.2 angegebenen Konzentrationen hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Ergebnisse der Validierung der Präzision und Richtigkeit dreier nacheinander (Intra-day Analytik) bzw. an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Inter-day-Analytik) gemessener gleicher Konzentrationen für alle vier QC- Level von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ9-THC

		Intra-day-Analyse		Inter-day-Analyse	
Analyt	**QC-Level**	**Präzision [%]**	**Richtigkeit [%]**	**Präzision [%]**	**Richtigkeit [%]**
AEA	QC 1	0,7	8,0	3,3	10,9
	QC 2	13,8	14,8	10,42	8,95
	QC 3	9,1	6,5	13,2	3,2
	QC 4	4,6	15,9	9,6	3,5
2-AG	QC 1	12,7	5,3	5,0	12,0
	QC 2	10,4	-4,0	10,7	3,2
	QC 3	5,5	1,8	10,8	1,1
	QC 4	19,1	-4,1	16,7	-9,6
OEA	QC 1	11,2	7,6	3,7	7,7
	QC 2	12,3	-0,3	13,2	-0,8
	QC 3	12,3	5,5	14,9	8,5
	QC 4	7,5	4,1	12,6	17,3
PEA	QC 1	7,0	-8,4	13,3	-3,5
	QC 2	5,0	2,7	6,3	2,7
	QC 3	11,1	2,5	6,1	7,6
	QC 4	18,2	1,07	16,8	3,42

CBD	QC 1	8,3	0,9	9,5	-14,6
	QC 2	2,7	7,5	5,4	4,5
	QC 3	4,1	1,0	8,6	6,6
	QC 4	4,5	16,2	0,8	19,9
Δ^9-THC	QC 1	2,9	-4,0	9,5	4,0
	QC 2	10,4	-13,0	2,9	-4,9
	QC 3	9,7	0	10,2	0,9
	QC 4	19,8	-6,8	8,0	12,1

Alle QC-Levels der jeweiligen Analyten entsprachen den in Kapitel 3.2.3.5.2 geforderten Kriterien für Präzision und Richtigkeit. Bei wiederholter Durchführung der angewandten Methode ist somit die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse sichergestellt und es liegen keine systematischen Fehler bezüglich der Probenaufbereitung und –messung vor.

Bei der Intra-day-Analyse zeigte sich in Bezug auf die Präzision die größte Abweichung mit 19,8 % auf dem QC 4 Niveau von Δ^9-THC, während das QC 1 Niveau von Anandamid mit 0,7 % am geringsten abwich. Mit 16,2 % unterschied sich das QC 4 Niveau von Cannabidiol am meisten vom „richtigen Wert“. Keine Abweichung (0 %) wurde beim QC 3 Niveau von Δ^9-THC gefunden.

Im Rahmen der Inter-day-Analyse fand sich bezüglich der Richtigkeit die größte Differenz beim Cannabidiol QC 4 Wert mit 19,9 % und bei der Präzision auf dem QC 4 Niveau von PEA mit 16,8 %. Die geringste Abweichung vom „richtigen Wert“ zeigte sich beim QC 2 Niveau von OEA mit -0,8 %. In Bezug auf die Präzision wich das QC 4 Niveau von Cannabidiol mit 0,8 % am wenigsten ab.

6.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Nach erfolgreicher Validierung von Präzision und Richtigkeit ergaben sich gemäß Kapitel 3.2.3.5.2 die in Tabelle 16 zusammengefassten Bestimmungsgrenzen *(LLOQs)*:

Tabelle 16: Bestimmungsgrenzen (LLOQs) Validierung (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

AEA	3,91	pmol/ml	1,36	ng/ml
2-AG	156,25	pmol/ml	59,15	ng/ml
OEA	15,63	pmol/ml	5,09	ng/ml
PEA	15,63	pmol/ml	4,68	ng/ml
CBD	15,63	pmol/ml	4,92	ng/ml
Δ^9-THC	1,95	pmol/ml	0,61	ng/ml

Aus der Vermessung der Kalibriergeraden (siehe 3.2.3.1) ergaben sich gemäß Kapitel 3.2.3.5.2 folgende Nachweisgrenzen (*LODs*) (Tabelle 17):

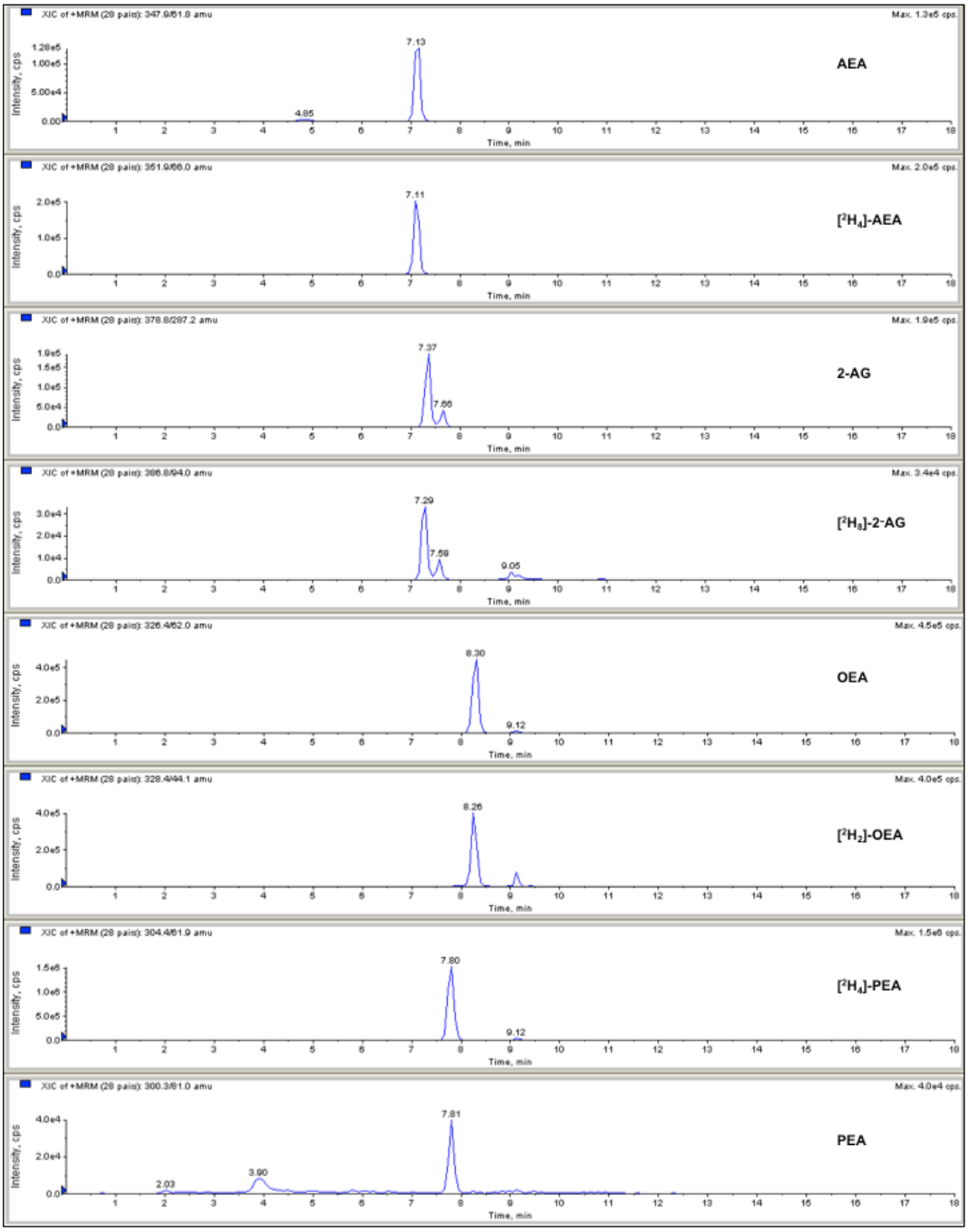
Tabelle 17: Nachweisgrenzen (LODs) Validierung (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

AEA	0,98	pmol/ml	0,34 ng/ml
2-AG	39,06	pmol/ml	14,79 ng/ml
OEA	3,91	pmol/ml	1,27 ng/ml
PEA	3,91	pmol/ml	1,17 ng/ml
CBD	7,81	pmol/ml	2,46 ng/ml
Δ^9-THC	0,98	pmol/ml	0,31 ng/ml

6.4 Selektivität

Die folgenden Abbildung 22 und 23 zeigen Beispielchromatogramme der Analyten Anandamid (AEA), OEA, PEA, 2-AG, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC sowie der dazugehörigen deuterierten Standards. Die hier verwendete Gewebeprobe wurde nach Aufbereitung mit den genannten Subs-tanzen sowie entsprechenden Standards versehen und gemessen. Aufgrund ihrer spezifischen MRM-Übergänge (siehe Tabelle 10) können die einzelnen Cannabinoide, Endocannabinoide und die verwandten Fettsäureethanolamide mit der entwickelten Methode hoch selektiv detektiert werden. Bis auf ein gewöhnliches Rauschen zeigten sich keine störenden Einflüsse auf den Massenübergängen der jeweiligen Analyten. Da die Massen von Cannabidiol und Δ^9-THC nahezu identisch sind und beide Analyten gleich fragmentiert werden, ist in den Chromatogrammen für diesen MRM-Übergang sowohl für Cannabidiol als auch für Δ9-THC ein Peak zu sehen (siehe Abbildung 23). Da sich allerdings die Retentionszeiten stark unterscheiden (siehe 3.2.3.5.1), ist die Methode auch für diese beiden Substanzen selektiv.

Abbildung 22: Selektive MRM-Übergänge der Endocannabinoide und verwandter Lipide sowie der jeweiligen deuterierten Standards



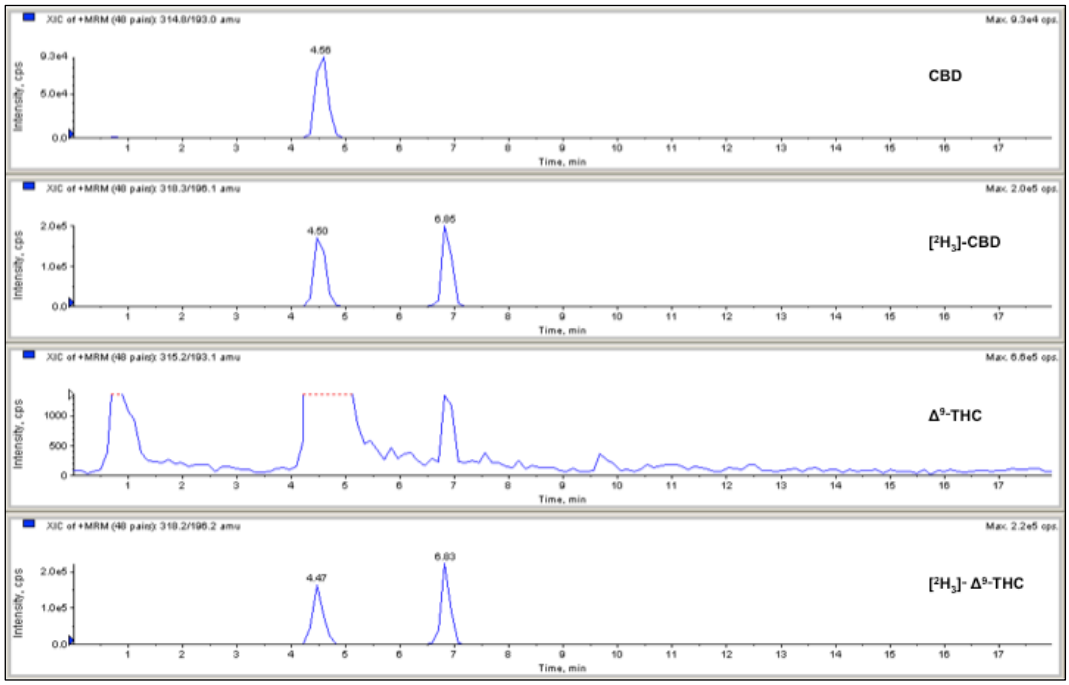


Abbildung 23:
Selektive MRM-Übergänge der Cannabinoide sowie der jeweiligen deuterierten Standards.

Aufgrund der fast identischen molaren Massen von Δ^9-THC und Cannabidiol (CBD) zeigt sich beim gewählten MRM-Übergang jeweils ein Peak für CBD (4,56 min) und ein Peak für Δ^9-THC (6,87 min). Durch die unterschiedliche Retentionszeit sind die beiden Peaks deutlich voneinander getrennt.

6.5 Wiederfindung

Für die einzelnen Analyten wurden verschiedene Konzentrationsniveaus festgelegt (siehe 3.2.3.3).

Die Ergebnisse der Wiederfindung sind in der folgenden Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Mittlere Wiederfindung (*recovery*) der Analyten Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC im Rattenhirngewebe (Stichprobengröße: n= 3)

Analyt	MP3 (Niedriges Niveau)	MP2 (Mittleres Niveau)	MP3 (Hohes Niveau)
AEA in [%]	74,5	74,1	82,4
2-AG in [%]	87,2	80,2	92,6
OEA in [%]	86,3	85,0	81,6
PEA in [%]	80,1	74,4	93,4
CBD in [%]	89,0	75,3	81,0
Δ^9-THC in [%]	84,1	99,3	93,5

Die Wiederfindung für die Substanzen lag insgesamt zwischen 74,1 % und 99,3 %, wobei für Δ^9-THC die besten Werte erzielt wurden und die Wiederfindungsquote von Anandamid am schlechtesten war. Tendenziell ist die Wiederfindung bei höherem Konzentrationsniveau größer.

6.6 Stabilität

Die in den folgenden Tabellen 5- 8 gezeigten Konzentrationsveränderungen gegenüber den direkt nach der Aufbereitung vermessenen Proben ergaben sich mit der im Kapitel 3.2.3.5.2 aufgeführten Berechnungsformel.

6.6.1 Stabilität von Proben im Autosampler

Die Proben wurden nach eintägiger (24 Stunden) Lagerung im Autosampler bei 4°C erneut vermessen und zeigten folgende Ergebnisse (Tabelle 19):

Tabelle 19: Stabilitätsuntersuchung von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC nach eintägiger Probenlagerung im Autosampler bei 4°C, grau= Sollwert überschritten

Autosampler-Stabilität	**QC-Niveau**			
	QC1	**QC2**	**QC3**	**QC4**
Mittlere Abweichung der **AEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	5,2	20,1	-2,2	-7,1
Mittlere Abweichung der **2-AG**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	15,1	15,0	-16,7	-11,8
Mittlere Abweichung der **OEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-6,6	-0,5	11,1	-13,8
Mittlere Abweichung der **PEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	4,4	-1,0	-40,1	-22,5
Mittlere Abweichung der **CBD**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	21,6	-5,8	6,3	-12,1
Mittlere Abweichung der **Δ^9-THC**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	3,3	5,3	5,8	18,1

Für die Analyten Anandamid, 2-AG, PEA und Cannabidiol wurden bei jeweils unterschiedlichen QC-Niveaus die Sollwerte überschritten. Grenzwerte für die Abweichungen sind für den oberen/ mittleren Messbereich 15 %, für den unteren 20 %. Die größte Abweichung fand sich dabei beim QC 3 Niveau von PEA mit -40,1 %, wobei sich sowohl für das PEA QC 1 als auch für das QC 2 Niveau mit 4,4 % bzw. -1,0 % im Vergleich zu den anderen Analyten jeweils die zweitgeringsten Konzentrationsabweichungen zeigten.

6.6.2 Stabilität bei Raumtemperatur

Des Weiteren wurden die QC-Proben nach Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur erneut vermessen. Es zeigten sich die in Tabelle 20 aufgelisteten Konzentrationsveränderungen.

Tabelle 20: Stabilitätsuntersuchung nach Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur, grau= Sollwert überschritten (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Raumtemperatur-Stabilität	QC-Niveau		
	QC1	QC2	QC3
Mittlere Abweichung der **AEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-3,0	-8,6	56,6
Mittlere Abweichung der **2**-**AG**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	1,2	46,7	6,3
Mittlere Abweichung der **OEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-1,5	-3,0	6,4
Mittlere Abweichung der **PEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	12,7	-0,2	-31,5
Mittlere Abweichung der **CBD**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	11,9	4,6	3,6
Mittlere Abweichung der **Δ^9-THC**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-18,6	3,6	-10,2

Mit Ausnahme von den Qualitätskontrollproben der Analyten OEA und Cannabidiol fanden sich bei allen Konzentrationsniveaus Abweichungen vom Sollwert. Die QC 3 Probe von Anandamid differierte am stärksten mit 56,6 %. Die geringste Abweichung fand sich beim QC 2 Niveau von PEA mit -0,2 %.

6.6.3 Stabilität nach dreimaligen Einfrieren und Auftauen

Die Überprüfung der Stabilität, nachdem die Proben nach der ersten Vermessung dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut wurden, ergab die in Tabelle 21 aufgelisteten mittleren Konzentrationsveränderungen.

Tabelle 21: Stabilitätsuntersuchung nach dreimaligem Einfrieren und Wiederauftauen, grau= Sollwert überschritten (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

freeze/thaw Stabilität	QC-Niveau		
	QC1	QC2	QC3
Mittlere Abweichung der **AEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	4,4	44,0	-8,8
Mittlere Abweichung der **2**-**AG**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	10,1	17,5	4,8
Mittlere Abweichung der **OEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-6,4	-6,2	-25,2
Mittlere Abweichung der **PEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-2,6	-7,2	63,6
Mittlere Abweichung der **CBD**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	19,7	1,2	9,8
Mittlere Abweichung der **Δ^9-THC**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-3,3	-0,8	-10,7

Mit Ausnahme von Δ^9-THC fanden sich bei allen anderen Subtanzen Abweichungen von den Sollwerten, die die Grenzwerte überschritten. Mit 63,6 % fand sich die größte Differenz beim QC 3 Niveau von PEA. Die geringste Abweichung zeigte sich beim Δ^9-THC QC 2 Niveau mit -0,8 %.

6.6.4 Langzeitstabilität

Die Überprüfung der Stabilität nach dreimonatiger Lagerung bei -20°C ergab die in Tabelle 22 aufgelisteten mittleren Konzentrationsänderungen.

Tabelle 22: Stabilitätsuntersuchung nach dreimonatiger Lagerung bei -20°C, grau= Sollwert überschritten (AEA= Anandamid, CBD= Cannabidiol)

Langzeit-Stabilität	**QC-Niveau**		
	QC1	**QC2**	**QC3**
Mittlere Abweichung der **AEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-11,8	-14,9	-4,6
Mittlere Abweichung der **2**-**AG**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	6,3	6,5	10,7
Mittlere Abweichung der **OEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-2,6	-7,9	6,3
Mittlere Abweichung der **PEA**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-7,1	-10,4	-14,0
Mittlere Abweichung der **CBD**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	3,6	12,0	12,7
Mittlere Abweichung der **Δ^9-THC**-Konz. im Vergleich zur Referenzmessung [%]	12,7	8,6	4,5

Die Ergebnisse der Langzeitstabilität wiesen bei keinem der Analyten Abweichungen vom Sollwert auf. Die größte Differenz zeigte sich hier beim QC 2 Niveau von Anandamid mit 14,9 %. Am geringsten wich das OEA QC 1 Niveau mit -2,6 % ab.

6.7 Gesamtergebnis der Methodenvalidierung

Die Ergebnisse der Validierung entsprachen den in Kapitel 3.2.3.5.2 aufgeführten Kriterien. Somit konnte die Methode zur Bestimmung endogener und exogener Cannabinoide sowie strukturverwandter Lipide im Gewebe eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zeigten jedoch, dass es zu erheblichen Konzentrationsveränderungen der Substanzen kommt, wenn die Proben länger im Autosampler oder bei Raumtemperatur gelagert werden sowie nach mehrmaligem

Einfrieren und Auftauen. Nur die Langzeitstabilität konnte für alle Analyten nachgewiesen werden, so dass eine Lagerung über drei Monate bei -20°C die Konzentrationen der Substanzen nicht beeinflusst.

7 Diskussion Methodenvalidierung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine neue LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der endogenen Cannabinoide Anandamid und 2-AG, der verwandten Eicosanoide OEA und PEA sowie der exogenen Cannabinoide Δ^9-THC und Cannabidiol im Gewebe entwickelt. Die beschriebene Analytik, die die simultane Quantifizierung von Endocannabinoiden und exogenen Cannabinoiden im Rattengewebe ermöglicht, erfüllte die geforderten, internationalen Kriterien für Validierungsprozesse (CPMP/ICH/281/95, 1996; CPMP/ICH/381/95, 1994; FDA, 2001).

In der Literatur werden verschiedene LC/MS-, LC-MS/MS- und GC/MS-Methoden zur Endocannabinoidbestimmung und zur Quantifizierung von Cannabinoiden in biologischen Flüssigkeiten beschrieben, wobei gerade bei komplexen, biologischen Proben wie Gewebe eine Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie sinnvoll ist.

Allerdings existiert bislang keine Methode, mit der zeitgleich in einem Messlauf die sich chemisch ähnelnden Endocannabinoide und Cannabinoide valide gemessen werden können. Das neu entwickelte Verfahren bietet somit eine enorme Probenmaterial- und Zeitersparnis gegenüber bereits bestehenden Methoden, bei der die Substanzen mit separaten Methoden detektiert werden müssen.

Die Messbereiche der Analyten wurden nach den zu erwartenden, physiologischen Konzentrationen gewählt (siehe 1.6). Die Linearität war für alle Substanzen gegeben (siehe 0). Die Methode zeigt eine ausreichende Präzision und Richtigkeit für jeden einzelnen Analyten. Die Bestimmungsgrenzen lagen für Anandamid bei 3,91 pmol/ml, für OEA, PEA und Cannabidiol bei 15,63 pmol/ml, für 2-AG bei 156,25 pmol/ml und für Δ^9-THC bei 1,95 pmol/ml und sind damit für die valide Quantifizierung der Analyten im Gewebe niedrig genug. Die hohe Selektivität der Methode bedingt durch die massenspektrometrische Detektion zeigt sich in den Abbildungen 22 und 23 des Kapitels 6.4. Die spezifischen MRM-Übergänge ermöglichen eine sensitive Quantifizierung der jeweiligen Substanz. Die Wiederfindung der Methode lag für alle Analyten zwischen 74,1 und 99,3 %, was auf eine effiziente Extraktion der Analyten aus Gehirngewebe schließen lässt. Die Ergebnisse für Anandamid, 2-AG, OEA und PEA waren vergleichbar mit den Werten von Richardson *et al.* (2007). Anandamid zeigte mit 74,1 – 82,43 % zwar die schlechteste Wiederfindungsquote der Methode, allerdings ist diese im Vergleich zu Koga *et al*. (1997), die nur eine Wiederfindung von 67 bis 73 % für Anandamid erreichten, immer noch deutlich besser.

Die Untersuchungen zur Stabilität zeigten deutlich wie empfindlich die Analyten auf Temperaturschwankungen reagieren (siehe 6.6). So zeigten sich Konzentrations-

veränderungen bei der Lagerung im Autosampler und bei Raumtemperatur, die deutlich die Grenzwerte überschritten. Daraus lässt sich schließen, dass die Verarbeitung der Proben möglichst eisgekühlt und die Messung möglichst zeitnah erfolgen sollten ohne lange Aufbewahrung im Autosampler. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen scheint den größten Effekt auf die Stabilität der Analyten zu haben, da hier die größte Differenz gefunden wurde (vgl. (Schreiber et al., 2007). Die hohe Instabilität der Analyten sollte unbedingt bei der Probenaufbereitung beachtet werden, um möglichst valide Messergebnisse zu erhalten. Deswegen wurde auch das Protokoll der Probengewinnung so abgeändert, dass die Leber analog zur Behandlung des Gehirns nach Entnahme in kleineren Stücken, die für eine Messung ausreichend waren, eingefroren wurde. Somit musste die Gewebsprobe nur einmal zur Aufbereitung aufgetaut werden.

In Bezug auf die Langzeitstabilität zeigten sich allerdings bei keiner Substanz Konzentrationsveränderungen, die außerhalb der vorgeschriebenen Grenzen lagen, so dass die Lagerung über 3 Monate bei -20°C stabil ist. Um die Stabilität der extrahierten Proben noch mehr zu erhöhen, wurden diese stets bei -80°C gelagert.

Die in dieser Arbeit beschriebene Lipidextraktion zur Gewinnung der Endocannabinoide und verwandter Fettsäureethanolamide, die sich an der Methode von Giuffrida und Piomelli orientiert (Giuffrida und Piomelli, 1998a), ist zwar zeitaufwendig, aber aus verschiedenen Gründen hinsichtlich der Ergebnisqualität besonders günstig. Gewebe stellt eine sehr komplexe Matrix dar, die viele Störfaktoren wie beispielsweise andere Lipidfraktionen aber auch Abbauenzyme der Endocannabinoide in verschiedenen Gewebekompartimenten beinhaltet, die beseitigt bzw. kontrolliert werden müssen, um die sensitive LC-MS/MS-Messung zu ermöglichen. So erfolgt nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform und Methanol eine weitere Normalphasen-SPE, um die vielen hydrophilen Begleitstoffe abzutrennen. Die Eindampfschritte der angewandten Extraktion sind nötig, um die Analyten aufzukonzentrieren, die in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen (siehe 1.6). Während der gesamten Probenaufbereitung ist der Kontakt mit Kunststoff zu vermeiden, da die lipophilen Substanzen daran adsorbieren und somit die Messergebnisse verfälscht werden. Um weitere fehlerhafte Messergebnisse auszuschließen, sollten auch die verwendeten Lösungsmittel auf Verunreinigungen mit den Analyten untersucht werden. Skonberg *et al.* (2010) entdeckten zum einen in Chloroform verschiedener Firmen nachweisbare Kontaminationen mit PEA. Zum anderen kam es bei Gebrauch eines bestimmten Chloroforms zum Verlust von OEA in der Probe durch Addition des Chlors an die Doppelbindung. Da Chloroform als eines der Lösungsmittel bei der klassischen Lipidextraktion verwendet wird, um die Endocannabinoide aus dem

Probenmaterial zu extrahieren, kann dies somit zur Verfälschung der Messergebnisse führen. Somit ist die Wahl der Lösungsmittel ebenso ausschlaggebend für die valide Messung. Außerdem sollte insgesamt ab der Probengewinnung möglichst schnell und standardisiert gearbeitet werden, um den Verlust der Analyten gering zu halten.

Durch Zugabe der deuterierten internen Standards ist eine exakte Quantifizierung der Substanzen möglich, da sich diese im Rahmen der Probenaufbereitung genauso verhalten sollten wie die zugehörigen Analyten.

Da die Flüssig-Flüssig-Extraktion sehr zeitaufwendig ist und es durch die vielen Arbeitsschritte auch zum Verlust der Substanzen kommt, stellt die Festphasen-extraktion eine zumindest zeitsparende Alternative dar (siehe 1.6). Allerdings scheint hier die Wiederfindung der Analyten je nach Säulenmaterial stark zu variieren, was ein offensichtlicher Nachteil ist (Zoerner et al., 2011).

Die Vorteile der gewählten Methode, hohe Aufreinigung und Konzentrierung der Analyten, überwiegen den Nachteil des Probenverlusts, so dass die Flüssig-Flüssig-Extraktion als geeignet angesehen werden kann. Allerdings ist eine Weiterentwicklung der Probenaufbereitung sicherlich sinnvoll, um niedrigere Bestimmungsgrenzen zu erreichen. Neuere Untersuchungen haben beispielsweise gezeigt, dass sich andere Lösungsmittel wie Toluol als bessere Eluenten der Analyten aus Serum erwiesen haben (Fanelli et al., 2012; Zoerner et al., 2011), so dass sicherlich interessant wäre, ob mit Toluol bei der Extraktion aus Gewebe ebenfalls höhere Ausbeuten erzielt werden können. Durch die Steigerung der Ausbeute werden bessere Quantifizierungsgrenzen erreicht.

Auch die Dauer der Messzeit pro Probe, in der vorliegenden Arbeit 18 min, könnte durch Neuerungen im chromatographischen Bereich verkürzt werden. Bei der sogenannten UHPLC-Analytik (engl. *Ultra High Performance liquid chromatography*), einer Weiterentwicklung der HPLC-Technik, können Säulen verwendet werden, die eine geringere Partikelgröße (Durchmesser: 1,7 – 2,2 µm) besitzen. Dadurch wird eine viel höhere, chromatographische Trennung innerhalb sehr kurzer Analysenzeiten erreicht. Bedingt durch das Säulenmaterial ist zudem der Druck bei den Messungen viel höher als bei der HPLC (Churchwell et al., 2005).

Obwohl noch Optimierungsmöglichkeiten bestehen, hebt sich die in dieser Arbeit etablierte Methode von den bisherigen in der Literatur beschriebenen ab. Es ist zum ersten Mal gelungen, ein selektives Verfahren zu entwickeln, mit dem simultan Endocannabinoide und exogene Cannabinoide im Gewebe bestimmt werden können und das zu validen Messergebnissen führt. Mit der Methode ist es möglich, die Analyten bis zu einer Nachweisgrenze im unteren picomolaren Bereich zu bestimmen.

Dies ist aufgrund der niedrigen physiologischen Konzentrationen der Endocannabinoide notwendig. Daher ist man für die Analyse auch darauf angewiesen, den Analytenverlust durch eine optimierte Handhabung der Proben bei der Aufarbeitung soweit wie möglich zu vermeiden, wie dies in der hier beschriebenen Vorgehensweise exemplarisch gelungen ist.

8 Ergebnisse FAAH Enzymassay mit Cannabidiol

Um zu überprüfen, ob Cannabidiol (CBD) möglicherweise das FAAH Enzym inhibiert, wurde der FAAH Enzymassay in Rattengehirnpräparationen wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt.

Der Enzymassay wurde an vier aufeinander folgenden Tagen jeweils mit dreifachen Ansatz pro Messpunkt durchgeführt (n=12). Mit Hilfe der Formel (siehe 3.3.4.1) wurde die Hydrolyse-Aktivität des Enzyms berechnet (siehe Tabelle 23). Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden gemittelt, um eine bestmögliche Annäherung an den tatsächlichen Wert zu erhalten.

Tabelle 23: Messergebnisse Enzymassay

Log [CBD]	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
-3,00	1,53	1,57	1,76	1,57
-4,00	9,31	8,29	10,45	8,95
-5,00	44,63	45,00	47,83	48,71
-6,00	87,91	84,21	94,81	93,17
-3,52	4,80	3,79	4,34	5,38
-4,52	22,19	21,73	23,20	24,24
-5,52	76,96	74,35	80,25	86,13
6,52	97,33	94,29	104,39	109,26
-7,52	100,00	100,00	100,00	100,00

Die Dosis-Wirkungskurve von Cannabidiol (CBD) auf die FAAH Aktivität ist in Abbildung 24 dargestellt. Die IC_{50} beträgt 8,66 µM.

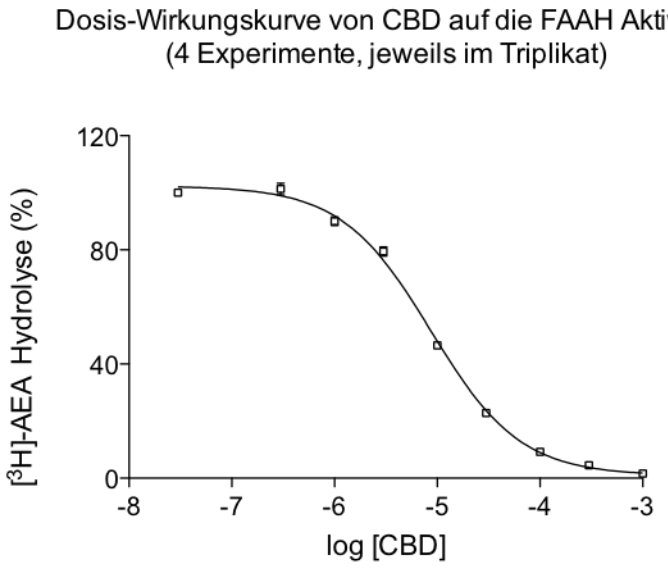


Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurve von Cannabidiol/FAAH.

Cannabidiol (CBD) hemmt FAAH mit einer mittleren, effektiven Konzentration von 8,66 µM.

9 Ergebnisse tierexperimentelle Endocannabinoidstudie

In der tierexperimentellen Studie wurde der Frage nachgegangen, ob die exogenen Cannabinoide Cannabidiol und Δ^9-THC die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG) und der verwandten Fettsäureethanolamide Oleoylethanolamid (OEA) und Palmitoylethanolamid (PEA) peripher und zentral beeinflussen. URB 597 als bekannter Modulator des Endocannabinoidsystems wurde als Positivkontrolle verwendet. Es sollte außerdem überprüft werden, ob unterschiedliche Lösungsmittel (wässrig oder ölig) die Wirkung von Cannabidiol, URB 597 und Δ^9-THC auf die Endocannabinoide und strukturell verwandten Substanzen verändern und ob sie einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC haben. Des Weiteren wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Eicosanoidkonzentrationen im Serum und im Gehirn vorlag (vgl. 3.2.5.1).

Hierzu wurden die Proben wie in Kapitel 3.2.3.4 beschrieben aufbereitet. Die Bestimmung der Analytkonzentrationen erfolgte nach dem in Kapitel 0 aufgeführten Verfahren.

9.1 Ergebnisse Teilstudie „Wirkung von Cannabidiol und URB 597 auf das Endocannabinoidsystem"

In der Teilstudie „Wirkung von Cannabidiol (CBD) und URB 597 auf das Endocannabinoidsystem" wurden die Messdaten für Anandamid, 2-AG, OEA und PEA der Versuchsgruppen “CBD-wässrig”, “CBD-ölig”, “URB-wässrig”, “URB-ölig” und “VEH” (Vehikel; siehe Tabelle 5) für Serum, Gesamthirn und Leber mittels 1-faktorieller ANOVA (Faktor: Versuchsgruppe) ausgewertet. Für die URB 597-Gruppen (URB-wässrig, URB-ölig) und die Vehikelgruppe (VEH) wurden außerdem die Endocannabinoide und verwandten Lipide in den verschiedenen Gehirnarealen (Kleinhirn, Mittelhirn, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, präfrontaler Kortex) separat analysiert und mit einer 2-faktoriellen mixed design ANOVA (Faktoren: Versuchsgruppe, Gehirnareal) verglichen. Anhand der detaillierten Gehirngewebe-Analyse der URB 597 behandelten Tiere wird verdeutlicht, in welchen Gehirnregionen FAAH durch URB 597 blockiert werden kann, während durch Betrachtung der Vehikeltiere die generelle Verteilung der Lipidkonzentrationen im Gehirn beschrieben wird.

9.1.1 Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen durch Cannabidiol und URB 597

Abbildung 25 a-d zeigt die Konzentrationen der einzelnen Analyte Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG im Serum für die Versuchsgruppen “CBD-wässrig”, “CBD-ölig”, “URB-wässrig”, “URB-ölig” und “VEH” 2 h nach Injektion.

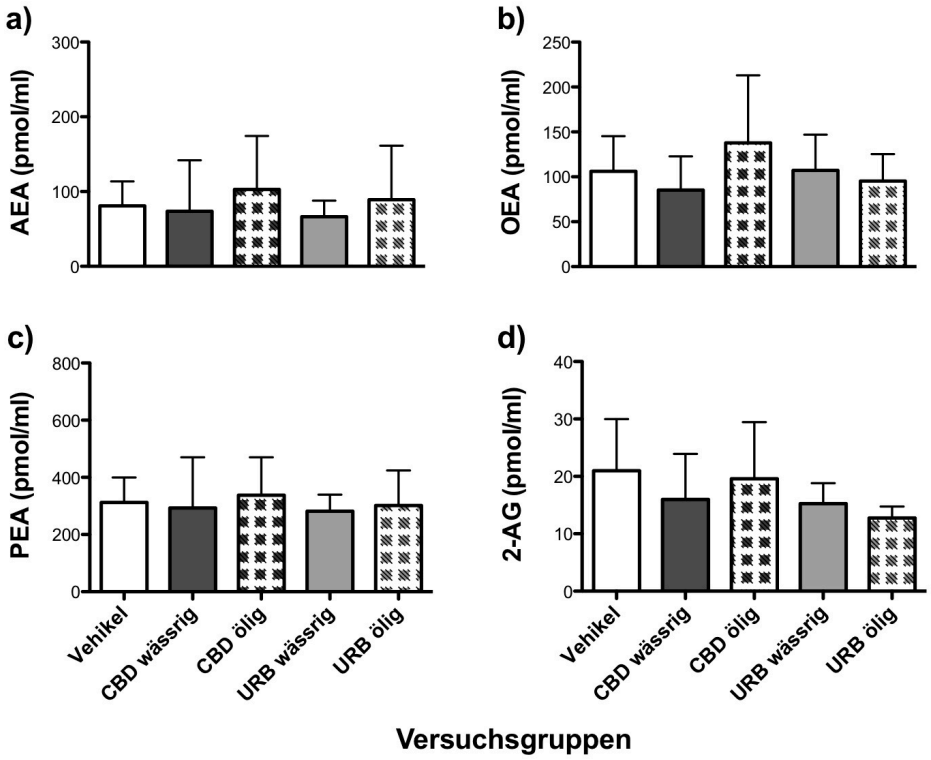


Abbildung 25:
Eicosanoidkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).

Unabhängig vom Lösungsmittel hatte weder URB 597 noch Cannabidiol (CBD) 2 h nach Injektion einen Einfluss auf die Konzentration der Endocannabinoide Anandamid (AEA) (**a**) und 2-AG (**d**). Auch die Konzentrationslevel der verwandten Fettsäureethanolamide OEA (**b**) und PEA (**c**) unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Die Eicosanoidkonzentrationen waren nach CBD- und URB 597-Gabe vergleichbar mit der Vehikelwirkung.

Unabhängig vom Lösungsmittel (wässrig, ölig) hatte weder URB 597 noch Cannabidiol einen Effekt auf die Eicosanoidkonzentrationen im Serum. Es wurde kein Unterschied zur Vehikelwirkung gefunden (AEA: $F(4,29) = 0{,}380$; $p = 0{,}821$; OEA: $F(4,29) = 1{,}13$; $p = 0{,}362$; PEA: $F(4,29) = 0{,}180$; $p = 0{,}947$; 2-AG: $F(4,29) = 1{,}30$; $p = 0{,}294$).

Die Analyse des Gehirngewebes nach URB 597-, Cannabidiol (CBD)- bzw. Vehikelbehandlung ergab hingegen einige signifikante Effekte (Abbildung 26 a-d). Für Anandamid lag ein signifikanter Haupteffekt für den Faktor „Behandlung“ vor ($F(4,29) = 4{,}42$; $p = 0{,}007$). Der Post hoc-Test zeigte, dass sich die Versuchsgruppe “URB-wässrig” von “CBD-ölig” signifikant unterschied ($p = 0{,}04$). Dies war in der Tendenz auch für den Vergleich zwischen der Versuchsgruppe “URB-ölig” und “CBD-ölig” ($p = 0{,}08$) der Fall (siehe Abbildung 26 a). URB 597 führte also im Vergleich

zur Cannabidiolbehandlung (im öligen Lösungsmittel) zu erhöhten Anandamidkonzentrationen. Auch für OEA und PEA konnte ein signifikanter Haupteffekt nachgewiesen werden (OEA: $F(4,29) = 9,48$; $p < 0,001$; PEA: $F(4,29) = 7,07$; $p < 0,001$), allerdings wurde trotz Datentransformationen keine Varianzhomogenität erreicht, so dass die Ergebnisse unter Vorbehalt betrachtet werden müssen (Levene-Test OEA: $F(4,29) = 13$; $p < 0,001$; PEA: $F(4,29) = 15,96$; $p < 0,001$). Die Post hoc-Analyse zeigte, dass die OEA-Konzentration nach URB 597-Behandlung unabhängig vom Lösungsmittel signifikant höher war als nach Cannabidiol (CBD)- oder Vehikel-Gabe ("URB-wässrig" vs. "CBD-wässrig" $p = 0,02$, "URB-wässrig" vs. "CBD-ölig" $p = 0,04$, "URB-ölig" vs. "CBD-wässrig" $p = 0,02$, "URB-ölig" vs. "CBD-ölig" $p = 0,02$; "URB-wässrig" vs. "VEH" $p = 0,02$, "URB-ölig" vs. "VEH" $p = 0,02$). Cannabidiol beeinflusste nicht die OEA-Spiegel und unterschied sich somit nicht vom Vehikel ("CBD-wässrig" vs. "VEH" $p = 0,879$, "CBD-ölig" vs. "VEH" $p = 0,930$; siehe Abbildung 26 b). Der Post hoc-Test ergab für PEA signifikante Unterschiede für die Vergleiche "URB-wässrig" vs. "CBD-wässrig" ($p = 0,04$), "URB-ölig" vs. "CBD-wässrig" ($p = 0,04$) sowie "URB-wässrig" vs. "VEH" ($p = 0,02$) und "URB-ölig" vs. "VEH" ($p = 0,02$). Ähnlich wie schon für OEA beschrieben, führte URB 597 unabhängig vom Lösungsmittel zu einem erhöhten PEA-Spiegel im Gehirngewebe. Die Cannabidiolgabe hatte hingegen keinen Einfluss auf die PEA-Konzentrationen im Gehirn und unterschied sich nicht vom Vehikel ("CBD-wässrig" vs. "VEH" $p = 0,899$, "CBD-ölig" vs. "VEH" $p = 0,596$; siehe Abbildung 26 c). Auch die Konzentration von 2-AG im Gehirngewebe unterschieden sich zwischen den Behandlungsgruppen nicht ($F(4,29) = 0,75$; $p = 0,564$; siehe Abbildung 26 d).

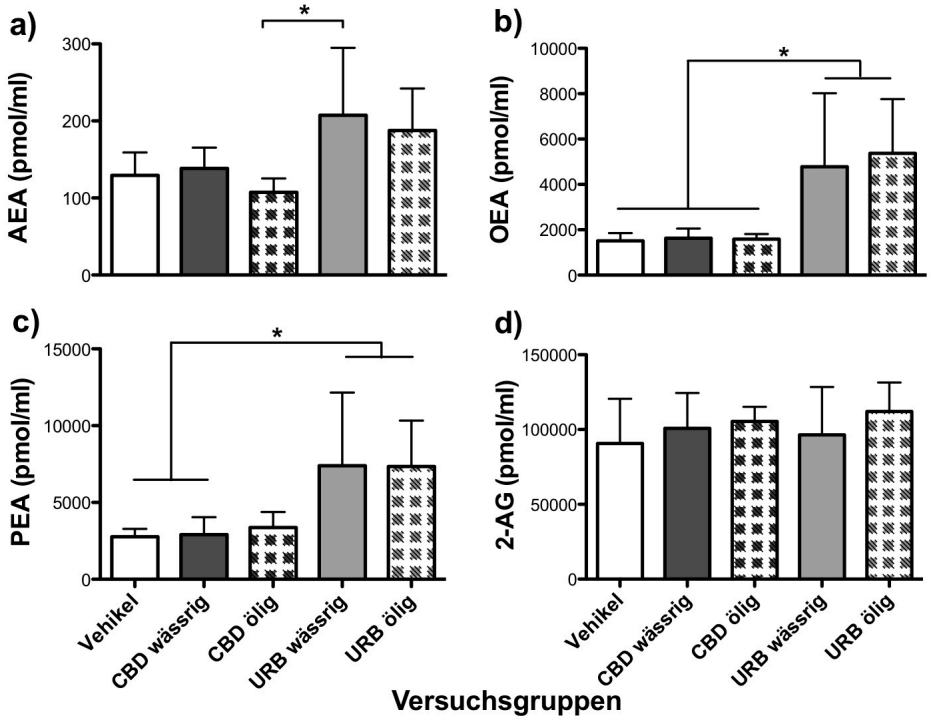


Abbildung 26:
Eicosanoidkonzentrationen im Gehirngewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).

Im Gehirngewebe waren die Anandamid (AEA)-, OEA- und PEA-Spiegel 2 h nach URB 597-Gabe, unabhängig vom Lösungsmittel, erhöht. Für AEA **(a)** gab es nur einen signifikanten Effekt zwischen den Versuchsgruppen "URB-wässrig" vs. "CBD-ölig" ($p = 0,04$). Die OEA-Konzentrationen **(b)** der URB 597-Gruppen waren signifikant im Vergleich zur Vehikelgruppe und zu den CBD-Gruppen erhöht (je $p = 0,02$, außer "URB-wässrig" vs. "CBD-ölig" $p = 0,04$). Auch die PEA-Spiegel **(c)** waren nach URB 597-Gabe erhöht. Unabhängig vom Lösungsmittel unterschieden sich die URB 597-Gruppen von der Vehikelgruppe (je $p = 0,02$) und der CBD-wässrig Gruppe (je $p = 0,04$) signifikant. Nach CBD-Gabe differierten die AEA-, OEA- und PEA-Konzentrationen nicht von der Vehikelgruppe. Weder CBD noch URB 597 hatten einen Einfluss auf die 2-AG-Konzentration **(d)**. (*: $p \leq 0,05$)

In Abbildung 27 a-d sind die Konzentrationsspiegel der einzelnen Analyte Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG im Lebergewebe für die Versuchsgruppen "CBD-wässrig", "CBD-ölig", "URB-wässrig", "URB-ölig" und "VEH" 2 h nach Injektion dargestellt. Im Bezug auf die Analyte Anandamid und 2-AG unterschieden sich weder die Cannabidiol (CBD)- noch die URB 597-Behandlungsgruppen vom Vehikel (AEA: $F(4,29) = 2,21$; $p = 0,092$, 2-AG: $F(4,29) = 0,632$; $p = 0,644$; siehe Abbildung 27 a und d). Sowohl für die PEA- als auch für die OEA-Konzentration gab es einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Behandlung" (OEA: $F(4,29) = 5,81$; $p = 0,001$; PEA: $F(4,29) = 20,90$; $p < 0,001$). Für OEA ergab die Post hoc-Analyse, dass der Haupteffekt durch einen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen "URB-wässrig" vs. "VEH" ($p = 0,02$) sowie zwischen "URB-ölig" vs. "VEH" ($p = 0,02$) zustande kam. Unabhängig vom Lösungsmittel war die OEA-Konzentration nach URB 597-Gabe höher als in der Vehikelgruppe (siehe Abbildung 27 b). Für PEA wurde

im Post hoc-Test nachgewiesen, dass sich die Versuchsgruppen nach URB 597-Gabe signifikant von den Cannabidiol (CBD)-Behandlungsgruppen und vom Vehikel unterschieden ("URB-wässrig" vs. "CBD-wässrig" p = 0,02, "URB-wässrig" vs. "CBD-ölig" p = 0,02, "URB-ölig" vs. "CBD-wässrig" p = 0,02, "URB-ölig" vs. "CBD-ölig" p = 0,02, "URB-wässrig" vs. "VEH" p = 0,02, "URB-ölig" vs. "VEH" p = 0,02; siehe Abbildung 27 c). Während URB 597 unabhängig vom Lösungsmittel zu einem signifikanten Anstieg der OEA- und PEA-Level führte, veränderte Cannabidiol nicht die Eicosanoidkonzentrationen und unterschied sich nicht vom Vehikel (OEA: "CBD-wässrig" vs. "VEH" p = 0,319, "CBD-ölig" vs. "VEH" p = 0,880; PEA: "CBD-wässrig" vs. "VEH" p = 0,667, "CBD-ölig" vs. "VEH" p = 0,238; siehe Abbildung 27).

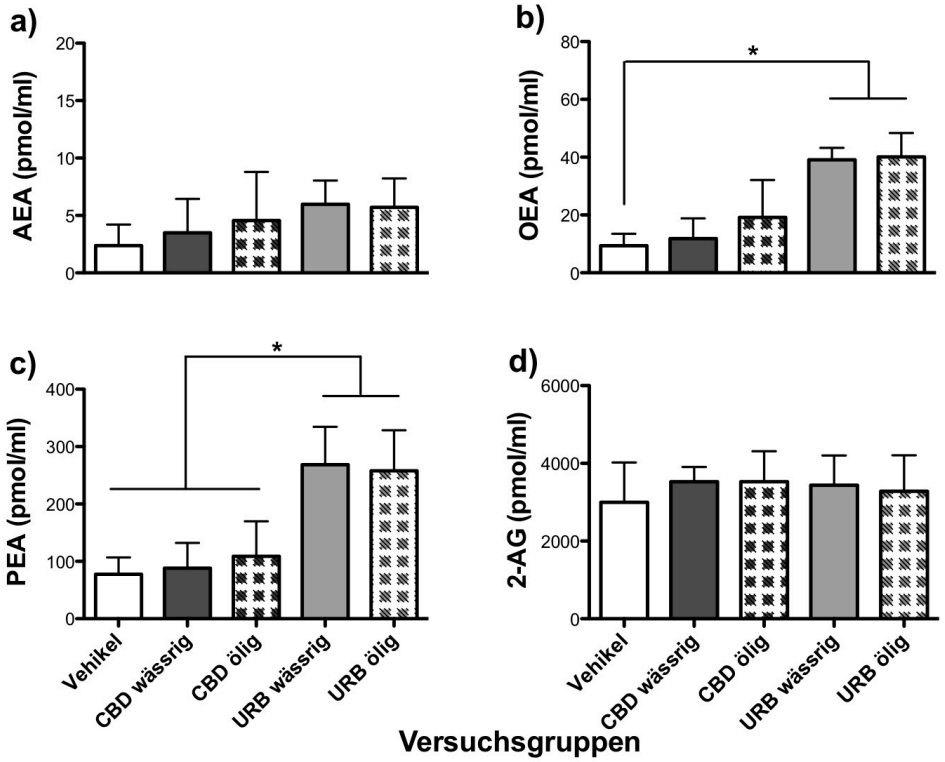


Abbildung 27:
Eicosanoidkonzentrationen im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).

In der Leber zeigten sich für die Anandamid (AEA)- **(a)** und die 2-AG-Konzentrationen **(d)** keine Behandlungseffekte. Sowohl die OEA- **(b)** als auch die PEA-Spiegel **(c)** waren im Mittel hingegen nach URB 597-Gabe unabhängig vom Lösungsmittel erhöht. Dieser Effekt war für PEA in beiden URB 597-Versuchsgruppen signifikant (je p = 0,02). Die OEA-Spiegel waren nach URB 597-Gabe im Mittel auch erhöht. Hier waren jedoch nur die Vergleiche "URB-wässrig" vs. "VEH" sowie "URB-ölig" vs. "VEH" signifikant (je p = 0,02). Unabhängig vom Lösungsmittel war die OEA-Konzentration nach URB 597-Gabe höher als nach Vehikelbehandlung. Die Wirkung von CBD unterschied sich nicht von der Vehikelbehandlung. (*: $p \leq 0,05$).

9.1.2 Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen nach URB 597-Gabe in verschiedenen Gehirnregionen

In Abbildung 28 a-d sind die Konzentrationen der Analyte Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG nach Behandlung mit “URB-wässrig”, “URB-ölig” und “VEH” für das Kleinhirn, das Mittelhirn, den Thalamus, den Hypothalamus, den Hippocampus und den präfrontalen Kortex dargestellt.

Für das Endocannabinoid Anandamid (AEA) (Abbildung 28 a) ergab die 2-faktorielle mixed-design ANOVA einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Gehirnregionen“ ($F (2,37;42,70) = 44,79$; $p < 0,001$). Da die Sphärizität verletzt war (Mauchly Test: $p < 0,001$), wurden die Freiheitsgrade Greenhouse-Geisser ($\varepsilon = 0,474$) korrigiert. Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass die Anandamidkonzentrationen im Kleinhirn, Mittelhirn, Hypothalamus und Thalamus signifikant niedriger waren als im Hippocampus und im präfrontalen Kortex (jeweils: $p = 0,004$). Außerdem war der Anandamidspiegel im Mittelhirn höher als im Kleinhirn ($p = 0,024$; siehe Abbildung 28 a).

Es gab ebenfalls einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Versuchsgruppe“ ($F (2,18) = 4,420$; $p = 0,027$). Da der Levene-Test trotz Datentransformation signifikant war (Kleinhirn $p < 0,001$, Mittelhirn $p < 0,001$, Hypothalamus $p = 0,021$, Thalamus $p = 0,005$) und somit keine Varianzhomogenität vorlag, müssen die Ergebnisse jedoch unter Vorbehalt betrachtet werden. Die Post hoc Sidak-Analyse ergab nach p-Wert-Korrektur keine signifikanten Effekte mehr.

Des Weiteren lag ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Versuchsgruppe und Gehirnregionen ($F (4,75;42,70) = 4,94$; $p = 0,001$) vor, der in Abbildung 28 sowie in Abbildung 29 a und b dargestellt ist. Die Auflösung des Interaktionseffekt ergab, dass die Anandamid-Konzentration im Mittelhirn nach URB 597-Gabe unabhängig vom Lösungsmittel signifikant höher war als nach Vehikelbehandlung (“URB-wässrig” vs. “VEH” $p = 0,032$, “URB-ölig” vs. “VEH” $p = 0,04$). Dies war im Thalamus auch für den Vergleich zwischen der Versuchsgruppe “URB-wässrig” und “VEH” der Fall ($p = 0,008$). In der Tendenz war die Anandamidkonzentration auch im Kleinhirn nach URB 597-Gabe im wässrigen Lösungsmittel höher als in der Vehikelgruppe ($p = 0,076$). Im Hypothalamus unterschieden sich die Anandamidspiegel zwischen der Versuchsgruppe “URB-wässrig” und “VEH” nach p-Wert Korrektur auch nicht mehr tendenziell ($p = 0,11$). Im Hippocampus und im präfrontalen Kortex zeigte sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Hippocampus: “URB-wässrig” vs. “VEH” $p = 0,943$, “URB-ölig” vs. “VEH” $p = 0,999$; präfrontaler Kortex: “URB-wässrig” vs. “VEH” $p = 1,000$, “URB-ölig” vs. “VEH” $p = 0,883$; Abbildung 29 a). URB 597 führte also

im Hippocampus und präfrontalen Kortex nicht zu einer Veränderung der Anandamidkonzentrationen.

In Abbildung 29 b wird deutlich, dass die Anandamid (AEA)-Konzentrationen innerhalb der Vehikelgruppe in den Gehirnregionen Kleinhirn, Mittelhirn, Hypothalamus und Thalamus signifikant niedriger waren als im Hippocampus und präfrontalen Kortex ($p = 0{,}004$). Für die Versuchsgruppe "URB-ölig" war dieser Effekt nur für den Vergleich zwischen dem Kleinhirn und dem Mittelhirn ($p = 0{,}004$), zwischen dem Kleinhirn und dem Hippocampus ($p = 0{,}04$) sowie zwischen dem Kleinhirn und dem präfrontalem Kortex ($p = 0{,}004$) signifikant. In der Versuchsgruppe "URB-wässrig" wurden im Kleinhirn, Mittelhirn, Hypothalamus und Thalamus im Mittel die höchsten Anandamidspiegel gemessen, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

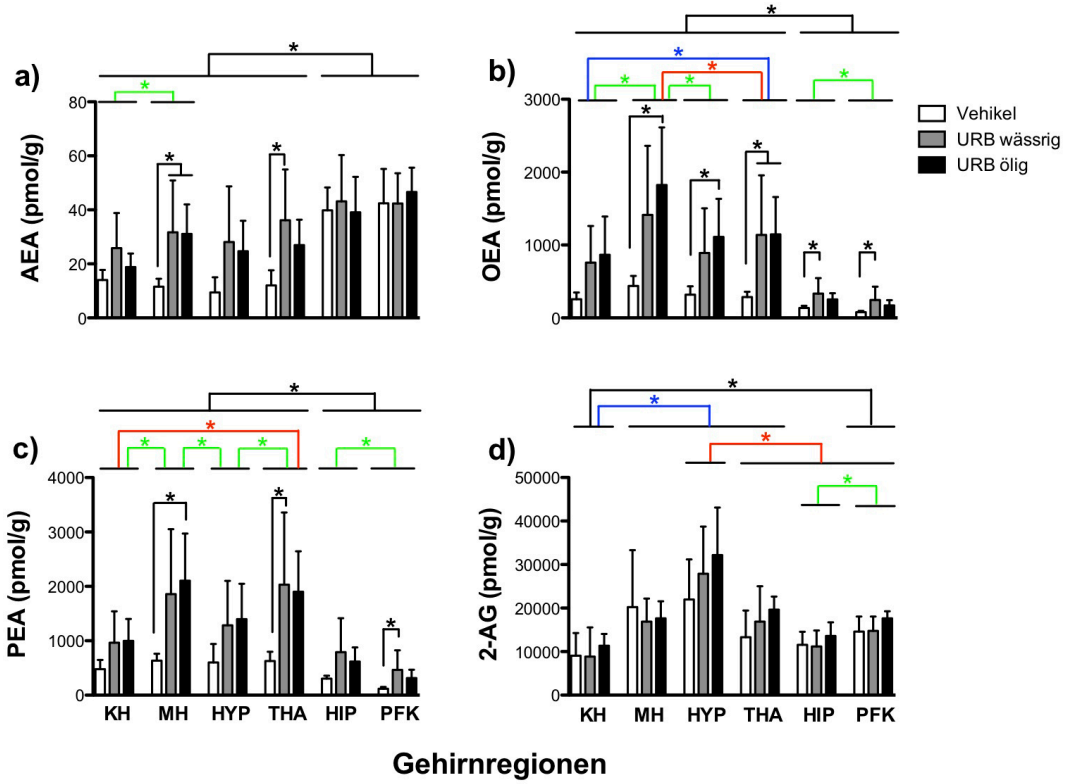


Abbildung 28:
Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen nach URB 597-Gabe in verschiedenen Gehirnregionen

a) Unabhängig von der Versuchsgruppe war die Anandamid **(AEA)**-Konzentration im Hippocampus (HIP) und im präfrontalen Kortex (PFK) signifikant höher als in den anderen Hirnregionen (je $p = 0{,}004$). Außerdem war der AEA-Spiegel im Mittelhirn (MH) signifikant höher als im Kleinhirn (KH) ($p = 0{,}024$). Im MH unterschied sich "VEH" durch niedrigere AEA-Konzentrationen signifikant von "URB-wässrig" ($p = 0{,}032$) und "URB-ölig" ($p = 0{,}04$) während im Thalamus (THA) nur ein signifikanter Unterschied zwischen "VEH" und "URB-wässrig" bestand ($p = 0{,}008$). **b)** Die Konzentrationen von **OEA** waren für alle Versuchsgruppen im KH, MH, Hypothalamus (HYP) und THA signifikant höher (je $p = 0{,}004$) als im HIP und im PFK. Im MH wurde die höchste Konzentration gemessen und dieser Unterschied war im Vergleich zu allen Hirnregionen signifikant ($p = 0{,}004$). Im KH wurden signifikant niedrigere OEA-Spiegel im Vergleich zum THA ($p = 0{,}024$) gefunden. Außerdem waren die OEA-Konzentrationen im PFK im Vergleich zum HIP signfikant erniedrigt ($p = 0{,}004$). Die Behandlungsgruppe "URB-ölig" zeigte signifikant erhöhte OEA-Spiegel im MH ($p = 0{,}004$), HYP ($p = 0{,}016$) und THA ($p = 0{,}032$). Im Vergleich zur "VEH" Gruppe ergab sich nach "URB-wässrig"-Behandlung eine signifikant höhere OEA-Konzentration im THA ($p = 0{,}032$), HIP ($p = 0{,}048$) und PFK ($p = 0{,}044$). **c)** Das KH, das MH, der HYP und der THA wiesen im Vergleich zum PFK und HIP signifikant höhere Spiegel von **PEA** auf (jeweils $p = 0{,}004$, außer KH vs. HIP

p = 0,032). Die PEA-Konzentrationen im KH und HYP waren signifikant niedriger als im MH und THA (KH jeweils p = 0,004; HYP vs. MH p = 0,008, HYP vs. THA p = 0,044). Der HIP differierte signifikant vom PFK (p = 0,004), wobei im HIP höhere PEA-Konzentrationen gemessen wurden. "URB-ölig" unterschied sich im MH signifikant von "VEH" (p = 0,012), während im THA für diesen Gruppenvergleich nur ein tendenzieller Effekt bestand (p = 0,056). "URB-wässrig" zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zur "VEH" im THA (p = 0,028) und im PFK (p = 0,03). Im MH lag lediglich ein tendenzieller Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor (p = 0,056). **d)** Der HYP unterschied sich mit dem höchsten **2-AG**-Spiegeln signifikant von allen Gehirnregionen mit Ausnahme des MH (jeweils p = 0,004). Das KH mit der geringsten 2-AG-Konzentration wies Signifikanzen gegenüber allen Gehirnarealen mit Ausnahme des HIP auf (jeweils p = 0,004, außer PFK p = 0,048). Der HIP zeigte einen signifikant geringeren 2-AG-Spiegel im Vergleich zum PFK (p = 0,012). Die einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht voneinander. URB 597 hat demnach unabhängig vom Lösungsmittel keinen Einfluss auf die 2-AG-Spiegel. (*: p ≤ 0,05).

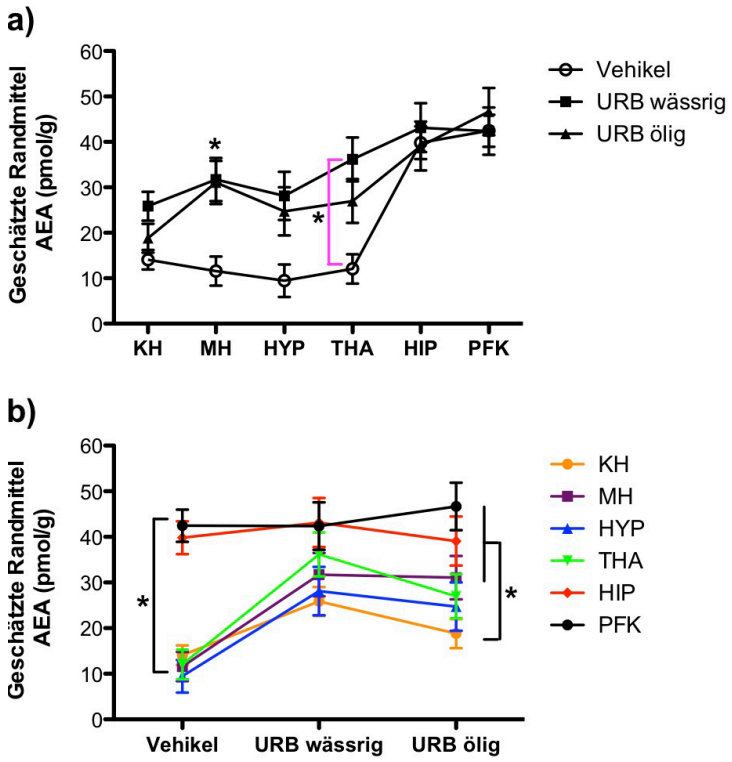


Abbildung 29: Interaktionsgraphiken Gehirnregion* Versuchsgruppe für Anandamid

Die geschätzten Randmittel der Anandamid (AEA)-Konzentrationen (gemittelt über die Gehirnregionen (a) bzw. die Gruppen (b)) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe und der Gehirnregion. Abbildung **a)** zeigt deutlich, dass die AEA-Konzentration der URB 597-Versuchsgruppen im Mittelhirn (MH) signifikant erhöht war im Vehikelvergleich ("URB-wässrig" vs. "VEH" p = 0,032; "URB-ölig" vs. "VEH" p = 0,04) während im Thalamus (THA) nur zwischen "VEH" und "URB-wässrig" ein signifikanter Unterschied bestand (p = 0,008). Im Kleinhirn (KH) war in der Tendenz außerdem AEA in der "URB-wässrig" Gruppe höher als in der "VEH" Gruppe (p = 0,076). Das heißt, die URB 597-Gabe führte in diesen Regionen zur Erhöhung der AEA-Spiegel. Im Hippocampus (HIP) und im präfrontalen Kortex (PFK) hingegen fanden sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Wie in **b)** dar-gestellt waren innerhalb der Vehikelgruppe die AEA-Spiegel im KH, MH, Hypothalamus (HYP) und THA signifikant niedriger als im HIP und PFK (je p = 0,004). In der "URB-ölig" Gruppe fanden sich signifikant niedrigere AEA-Konzentrationen für das KH im Vergleich zum MH (p = 0,004), zum HIP (p = 0,04) und zum PFK (p = 0,004). In der "URB-wässrig" Gruppe zeigten sich zwischen den Gehirnregionen keine signifikanten Unterschiede der AEA-Spiegel. (*: p ≤ 0,05)

In Abbildung 28 b sind die OEA-Spiegel der Versuchsgruppen "URB-wässrig", "URB-ölig" und "VEH" in den verschiedenen Gehirnregionen dargestellt. Da die Varianzhomogenität nicht gegeben war, wurden die Freiheitsgrade korrigiert (Mauchly Test: p < 0,001; Greenhouse-Geisser Schätzung; ε = 0,295). Es gab einen signifikanten Haupteffekt zwischen den Gehirnregionen (F (1,47;26,52) = 59,65; p < 0,001). Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass die OEA-Konzentrationen im Kleinhirn, Mittelhirn, Hypothalamus und Thalamus signifikant höher waren als im präfrontalen Kortex und Hippocampus (jeweils p = 0,004). Die OEA-Spiegel im Mittelhirn waren am höchsten und differierten von allen anderen Gehirnarealen signifikant (p = 0,004). Es wurden signifikant niedrigere OEA-Konzentrationen für das Kleinhirn im Vergleich zum

Thalamus ($p = 0,024$) sowie für den präfrontalen Kortex im Vergleich zum Hippocampus gefunden ($p = 0,004$; siehe Abbildung 28 b).

Außerdem ergab sich ein signifikanter Haupteffekt der Behandlung ($F (2,18) = 9,19$; $p = 0,002$), allerdings war die Varianzhomogenität nicht gegeben (Levene-Test: Kleinhirn $p = 0,002$, Mittelhirn $p < 0,001$, Hypothalamus $p = 0,002$, Thalamus $p < 0,001$, Hippocampus $p = 0,001$, präfrontaler Kortex $p < 0,001$), so dass die Ergebnisse nur unter Vorbehalt betrachtet werden können. Der Haupteffekt kam durch einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen “URB-ölig” und “VEH” ($p = 0,02$) zustande. Des Weiteren gab es einen tendenziellen Unterschied zwischen “URB-wässrig” vs. “VEH” ($p = 0,064$).

Es fand sich zudem ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Versuchsgruppe und Gehirnregionen ($F (2,95; 26,52) = 9,802$; $p < 0,001$), der sowohl in Abbildung 28 als auch in den Interaktionsgraphiken (siehe Abbildung 30 a und b) dargestellt ist. Die Auflösung des Interaktionseffekts ergab für alle Gehirnregionen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, wobei beide URB 597-Behandlungsgruppen signifikant oder tendenziell von der Vehikelgruppe differierten. Die Versuchsgruppe “URB-ölig” wies im Vergleich zum “VEH” signifikant erhöhte OEA-Spiegel im Mittelhirn ($p = 0,004$), Hypothalamus ($p = 0,016$) und Thalamus ($p = 0,032$) sowie tendenziell erhöhte OEA-Level im Kleinhirn ($p = 0,056$) auf. Nach URB 597-Gabe im wässrigen Lösungsmittel war die OEA-Konzentration im Thalamus ($p = 0,032$), Hippocampus ($p = 0,048$) und präfrontalen Kortex ($p = 0,044$) im Vergleich zu “VEH” signifikant erhöht. In der Tendenz war dies auch für das Mittelhirn ($p = 0,08$) der Fall (siehe Abbildung 30 a).

Wie aus Abbildung 30 b deutlich wird, gab es nach URB 597-Gabe zwischen den OEA-Konzentrationen einiger Hirnregionen signifikante Unterschiede, während die Vehikelgruppe in allen Regionen vergleichbare OEA-Spiegel aufwies. In der “URB-wässrig” Versuchsgruppe wurden im Vergleich zum Hippocampus und präfrontalen Kortex signifikant erhöhte OEA-Konzentrationen im Mittelhirn (Hippocampus $p = 0,008$; präfrontaler Kortex $p = 0,004$), Hypothalamus (Hippocampus $p = 0,044$; präfrontaler Kortex $p = 0,012$) und Thalamus (Hippocampus $p = 0,004$; präfrontaler Kortex $p = 0,004$) gefunden. Das Kleinhirn zeigte nur im Vergleich zum präfrontalen Kortex signifikant erhöhte OEA-Level ($p = 0,036$) und wies signifikant niedrigere OEA-Spiegel gegenüber dem Mittelhirn ($p = 0,016$) auf. Das Mittelhirn unterschied sich mit höheren OEA-Konzentrationen signifikant vom Hypothalamus ($p = 0,016$). Im Hippocampus war das OEA-Level signifikant höher als im präfrontalen Kortex ($p = 0,004$). Nach URB 597-Gabe im öligen Lösungsmittel unterschied sich das Mittelhirn von allen anderen Regionen signifikant, wobei dort die höchsten

OEA-Konzentrationen gemessen wurden (je p = 0,004). Im Hippocampus und präfrontalen Kortex zeigten sich im Vergleich zu den allen anderen Gehirnarealen die niedrigsten OEA-Level. Auch diese Unterschiede waren signifikant (je p = 0,004). Im Hippocampus wurden jedoch signifikant höhere OEA-Konzentrationen nachgewiesen als im präfrontalen Kortex (p = 0,004; siehe Abbildung 30 b).

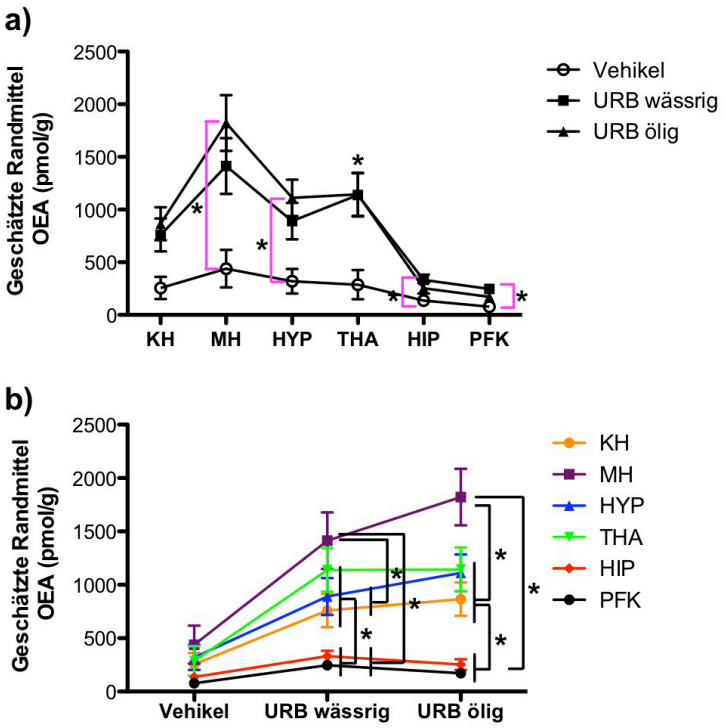


Abbildung 30: Interaktionsgraphiken Gehirnregion* Versuchsgruppe für OEA

Die geschätzten Randmittel der OEA-Konzentrationen (gemittelt über die Gehirnregionen **(a)** bzw. die Versuchsgruppen **(b)**) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe und der Gehirnregion. **a)** Die OEA-Konzentrationen nach URB 597 Gabe unterschieden sich in allen Gehirnregionen außer dem Kleinhirn (KH) signifikant von der Vehikelgruppe. Die Gruppe "URB-ölig" zeigte signifikant erhöhte OEA-Spiegel im Mittelhirn (MH) (p = 0,004), Hypothalamus (HYP) (p = 0,016) und Thalamus (THA) (p = 0,032) während URB 597 im wässrigen Lösungsmittel zu erhöhten OEA-Konzentra-tionen im THA (p = 0,032), Hippocampus (HIP) (p = 0,048) und präfrontalen Kortex (PFK) (p = 0,044) führte. Graphik **b)** verdeutlicht, dass sich die OEA-Konzentrationen der Gehirnregionen in den jeweiligen URB 597-Versuchsgruppen teilweise signifikant unterschieden, während die OEA-Spiegel in den Gehirnarealen der Vehikelgruppe nicht differierten. In der "URB-wässrig" Gruppe fanden sich im Vergleich zum HIP und PFK erhöhte OEA-Konzentrationen im MH (HIP p = 0,008; PFK p = 0,004), HYP (HIP p = 0,044; PFK p = 0,012) und THA (HIP p = 0,004; PFK p = 0,004). Das KH zeigte nur gegenüber dem PFK signifikant erhöhte OEA-Level (p = 0,036), hatte aber eine signifikant niedrigere Konzentration als das MH (p = 0,016). Es wurden signifikant erhöhte OEA-Konzentrationen im MH im Vergleich zum HYP(p = 0,016) sowie für den HIP im Vergleich zum PFK gefunden (p = 0,004). Für "URB-ölig" differierten der HIP und PFK mit signifikant niedrigeren OEA-Leveln von den restlichen Gehirnregionen (je p = 0,004) wobei der HIP im Vergleich zum PFK signifikant höhere OEA-Spiegel aufwies (p = 0,004). Das MH mit der höchsten OEA-Konzentration unterschied sich von allen restlichen Gehirnarealen signifikant (je p = 0,004). (*: p ≤ 0,05)

In Abbildung 28 c sind die PEA-Spiegel der Behandlungsgruppen "URB-wässrig", "URB-ölig" und "VEH" in Abhängigkeit von den verschiedenen Gehirnregionen dargestellt. Für die statistische Analyse der PEA-Konzentrationen mussten die Freiheitsgrade für die Gehirnregionen (Mauchly Test: p < 0,001) korrigiert werden (Greenhouse-Geisser Schätzung; ε = 0,392). Es gab einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Gehirnregionen" (F (1,96; 35,28) = 58,58; p < 0,001). Die Auflösung des Haupteffekts für die Gehirnareale mittels Post hoc-Test Sidak ergab, dass das Kleinhirn, Mittelhirn, Hypothalamus und Thalamus im Vergleich zum präfrontalen Kortex und Hippocampus signifikant höhere PEA-Spiegel aufwiesen (jeweils p = 0,004, außer Kleinhirn vs. Hippocampus p = 0,032). Außerdem waren die PEA-Konzentrationen im Kleinhirn und Hypothalamus signifikant niedriger als im

Mittelhirn und im Thalamus (Kleinhirn je $p = 0{,}004$; Hypothalamus vs. Mittelhirn $p = 0{,}008$, Hypothalamus vs. Thalamus $p = 0{,}044$). Der Hippocampus und der präfrontale Kortex differierten signifikant ($p = 0{,}004$), wobei im Hippocampus die PEA-Konzentration höher war (siehe Abbildung 28 c).

Es gab zwar einen signifikanten Haupteffekt der Behandlung ($F(2,18) = 7{,}71$; $p = 0{,}004$), allerdings war die Varianzhomogenität nicht gegeben (Levene-Test: Kleinhirn $p = 0{,}002$, Mittelhirn $p < 0{,}001$, Hypothalamus $p = 0{,}019$, Thalamus $p < 0{,}001$, Hippocampus $p < 0{,}001$, präfrontaler Kortex $p < 0{,}001$), so dass die Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden müssen. Nach p-Wert-Korrektur gab es nur noch tendenzielle Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Tendenz kam durch etwas höhere PEA-Spiegel nach URB 597-Gabe zustande ("URB-wässrig" vs. "VEH" $p = 0{,}06$; "URB-ölig" und "VEH" $p = 0{,}064$).

Desweiteren gab es eine signifikante Interaktion zwischen den Gehirnregionen und den Versuchsgruppen ($F(3,92; 35,28) = 7{,}77$; $p < 0{,}001$; siehe Abbildung 31 a). Der Post hoc-Test Sidak löste den Interaktionseffekt weiter auf und ergab, dass sich die Versuchsgruppe "URB-ölig" im Mittelhirn signifikant von "VEH" unterschied ($p = 0{,}012$). Im Thalamus gab es hingegen für den gleichen Vergleich nur eine tendenziellen Unterschied ($p = 0{,}056$). Für den Thalamus und den präfrontalen Kortex ergab die Analyse außerdem, dass sich die "URB-wässrig" Gruppe signifikant von der Vehikelgruppe unterschied (Thalamus $p = 0{,}028$, präfrontaler Kortex $p = 0{,}032$) während im Mittelhirn lediglich ein Trend vorlag ($p = 0{,}056$). URB 597 erhöhte also durch FAAH-Inhibition die Konzentration von PEA, allerdings war dieser Effekt im Vergleich zur Vehikelgruppe nach URB 597-Gabe im öligen Lösungsmittel nur im Mittelhirn signifikant, während die PEA-Konzentrationen der "URB-wässrig" Gruppe im Thalamus und präfrontalen Kortex erhöht waren. Wie aus Abbildung 28 c sowie aus der zugehörigen Interaktionsgraphik (Abbildung 31 b) deutlich wird, gab es außerdem innerhalb der Versuchsgruppen einige signifikante Unterschiede zwischen den PEA-Konzentrationen in den verschiedenen Gehirnregionen. In der Vehikelgruppe gab es nur einen signifikanten Unterschied zwischen dem Kleinhirn und präfrontalen Kortex ($p = 0{,}004$), wobei im Kleinhirn höhere Konzentrationen gemessen wurden. Nach URB 597-Gabe im wässrigen Lösungsmittel wiesen alle Gehirnregionen im Vergleich zum präfrontalen Kortex signifikant höhere PEA-Spiegel auf (Kleinhirn $p = 0{,}004$, Mittelhirn $p = 0{,}004$, Hypothalamus $p = 0{,}024$, Thalamus $p = 0{,}004$, Hippocampus $p = 0{,}028$). Das Mittelhirn und der Thalamus unterschieden sich außerdem mit höheren PEA-Konzentrationen signifikant vom Kleinhirn (Mittelhirn $p = 0{,}004$, Thalamus $p = 0{,}004$) und dem Hippocampus (Mittelhirn $p = 0{,}008$, Thalamus $p = 0{,}004$). Nach URB 597-Gabe im öligen Lösungsmittel hatten das Mittelhirn, der Hypothalamus und der Thalamus

signifikant höhere PEA-Level im Vergleich zum Hippocampus und präfrontalen Kortex (jeweils p = 0,008, außer Hypothalamus vs. Hippocampus p = 0,02). Das Kleinhirn unterschied sich mit höheren PEA-Konzentrationen nur signifikant vom präfrontalen Kortex (p = 0,004). Außerdem identisch zur "URB-wässrig" Gruppe wiesen das Mittelhirn und der Thalamus signifikant höhere PEA-Spiegel im Vergleich zum Kleinhirn (Mittelhirn p = 0,004, Thalamus p = 0,008) auf. Für den Hypothalamus war mit niedrigerer PEA-Konzentration außerdem die Differenz zum Mittelhirn signifikant (p = 0,04; siehe Abbildung 31 b).

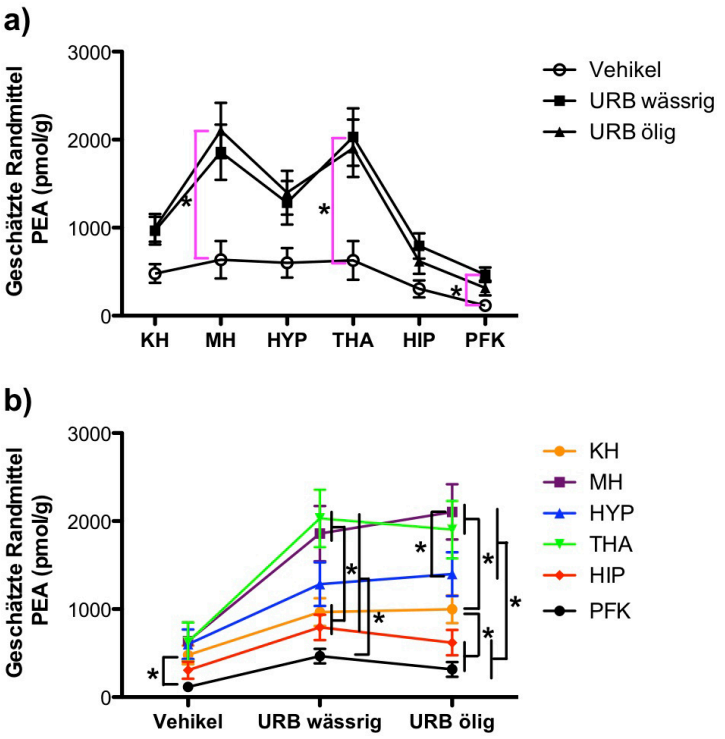


Abbildung 31: Interaktionsgraphiken Gehirnregion* Versuchsgruppe für PEA

Die geschätzten Randmittel der PEA-Konzentrationen (gemittelt über die Gehirnregionen **(a)** bzw. die Versuchsgruppen **(b)**) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe und der Gehirnregion. Abbildung **a)** zeigt, dass URB 597 durch FAAH-Inhibition die Konzentration von PEA erhöhte, allerdings war dieser Effekt für "URB-ölig" nur im Mittelhirn (MH) (p = 0,012) sowie für "URB-wässrig" im Thalamus (THA) (p = 0,028) und präfrontalen Kortex (PFK) (p = 0,032) im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant. Ein tendenzieller Unterschied fand sich für "URB-ölig" im THA (p = 0,056) sowie für "URB-wässrig" im MH (p = 0,056). Graphik **b)** verdeutlicht, dass sich die PEA-Konzentrationen der Gehirnregionen in den jeweiligen Versuchsgruppen teilweise signifikant unterschieden, wobei in der Vehikelgruppe nur ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kleinhirn (KH) und dem PFK bestand (p = 0,004), der sich durch erhöhte OEA-Spiegel im KH erklärte. In der "URB-wässrig" Gruppe zeigten sich für alle Gehirnregionen im Vergleich zum PFK signifikant höhere PEA-Spiegel (KH p = 0,004, MH p = 0,004, Hypothalamus (HYP) p = 0,024, THA p = 0,004, Hippocampus (HIP) p = 0,028). Das MH und der THA unterschieden sich mit höheren PEA-Konzentrationen signifikant vom KH (MH p = 0,004, THA p = 0,004) und HIP (MH p = 0,008, THA p = 0,004). Die "URB-ölig" Gruppe wies höhere PEA-Level im MH, HYP und THA im Vergleich zum HIP und PFK auf (jeweils p = 0,008, außer HYP vs. HIP p = 0,02). Das KH unterschied sich nur signifikant vom PFK (p = 0,004). Das MH und der THA zeigten signifikant höhere PEA-Spiegel im Vergleich zum KH (MH p = 0,004, THA p = 0,008). Im HYP wurden signifikant niedrigere PEA-Level gemessen als im MH (p = 0,04). (*: p ≤ 0,05)

In Abbildung 28 d sind die 2-AG-Konzentrationen der Behandlungsgruppen "URB-wässrig", "URB-ölig" und "VEH" in den verschiedenen Gehirnregionen dargestellt. Die 2-faktorielle mixed-design ANOVA zeigte für 2-AG, nach einer Greenhouse-Geisser-Korrektur (ε = 0,605; Mauchly Test sig. p < 0,001), einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Gehirnregionen" (F (3,02;54,43) = 22,21; p < 0,001). Die Post hoc-Analyse Sidak löste diesen Effekt weiter auf und ergab, dass die 2-AG-Konzentration im Hypothalamus signifikant höher war als in allen anderen Gehirnregionen mit Ausnahme des Mittelhirns (jeweils

p = 0,004). Im Kleinhirn wurde die geringsten 2-AG-Konzentration nachgewiesen und dieser Unterschied war im Vergleich zu allen anderen Gehirnarealen mit Ausnahme des Hippocampus signifikant (jeweils p = 0,004, außer präfrontaler Kortex p = 0,048). Der Hippocampus wies den zweitniedrigsten 2-AG-Spiegel auf und unterschied sich signifikant vom präfrontalen Kortex (p = 0,012; siehe Abbildung 28 d).

Es gab keinen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Behandlung“. Das heißt durch die URB 597-Behandlung, unabhängig vom Lösungsmittel, wurde die 2-AG-Konzentration nicht verändert und unterschied sich nicht vom Vehikel. Außerdem gab es keinen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den Gehirnregionen und den Versuchsgruppen.

9.2 Ergebnisse Teilstudie „Wirkung von Δ^9-THC auf das Endocannabinoidsystem"

Im Fokus der Teilstudie „Wirkung von Δ^9-THC auf das Endocannabinoidsystem“ standen die Effekte von Δ^9-THC auf die Endocannabinoide und verwandten Fettsäureethanolamide. Dazu wurden, identisch zu Cannabidiol und URB 597, die Messwerte für die Versuchsgruppen “THC-wässrig/a”, “THC-ölig/a”, “THC-wässrig/b”, “THC-ölig/b” und “VEH” (siehe Tabelle 5) mit einer 1-faktoriellen ANOVA (Faktor: Versuchsgruppe) statistisch verglichen. Dabei steht a in der Kurzbezeichnung der Versuchsgruppen für eine Δ^9-THC-Wirkdauer von 15 min nach Injektion bzw. b für eine Wirkdauer von 2 h. Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC zu untersuchen, wurden die Δ^9-THC-Konzentrationen im Gesamthirn, Serum und Leber mittels 2-faktorieller ANOVA (Faktoren: Behandlung, Wirkdauer Δ^9-THC) verglichen.

Um zu ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen den peripheren und zentralen Eicosanoidkonzentrationen besteht, wurden für jede Versuchsgruppe die Serum- und Gehirnspiegel der einzelnen Analyte mittels Pearson-Korrelation korreliert.

9.2.1 Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC

Abbildung 32 zeigt die Δ^9-THC-Konzentrationen im Serum (a), im Gehirn (b) und in der Leber (c) nach der Behandlung mit Δ^9-THC. Den Tieren wurde Δ^9-THC entweder im wässrigen oder öligen Lösungsmittel injiziert. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Zeitpunkte der Blutabnahme/ Organentnahme nach Δ^9-THC-Injektion gewählt. Das heißt, bei einer Gruppe wurde 15 min nach Δ^9-THC-Injektion mit der Blutabnahme und der Organentnahme begonnen, beim anderen Teil 2 h nach Injektion. Im Folgenden wird für die 15 min Gruppen die Kurzbezeichnung „a“ und für die 2 h Gruppen die Kurzbezeichnung „b“ verwendet. Die 2-faktorielle Varianzanalyse (Faktoren

unabhängig: Behandlung, Wirkdauer Δ^9-THC) der Δ^9-THC-Konzentrationen zeigte signifikante Haupteffekte für alle Organe, allerdings war der Levene-Test für alle Datensätze auch nach den Transformationen signifikant (Serum $p < 0{,}001$, Gehirn $p = 0{,}008$, Leber $p = 0{,}010$) und somit die Voraussetzung einer Varianzhomogenität verletzt. Die Ergebnisse müssen daher unter Vorbehalt betrachtet werden.

Für das Serum (Abbildung 32 a) ergab sich ein signifikanter Haupteffekt der Behandlung ($F(1,26) = 25{,}97$; $p < 0{,}001$). Der Post hoc-Test löste diesen Effekt weiter auf und ergab, dass sich die Versuchsgruppen “THC-wässrig/a” vs. “THC-ölig/a” bzw. “THC-wässrig/b” vs. “THC-ölig/b” signifikant unterschieden ($p = 0{,}004$). Das heißt, für beide Wirkzeiten (15 min, 2 h) führte Δ^9-THC im wässrigen Lösungsmittel insgesamt zu einem signifikant höheren Δ^9-THC-Spiegel im Serum als es im öligen Lösungsmittel der Fall war (Abbildung 32 a). Nach 2 h war die Δ^9-THC-Konzentration im öligen Lösungsmittel im Mittel höher als nach 15 min Wirkdauer (15 min: 0,06 ± 0,11 pmol/ml, 2 h: 2,19 ± 1,37 pmol/ml) während Δ^9-THC im wässrigen Lösungsmittel ähnliche Konzentrationen zu beiden Zeitpunkten aufwies (15 min: 20,02 ± 13,40 pmol/ml, 2 h: 12,20 ± 5,38 pmol/ml). Allerdings gab es vermutlich aufgrund der hohen Standardabweichung keinen signifikanten Interaktionseffekt.

Die statistische Analyse des Gehirngewebes (Abbildung 32 b) ergab einen Haupteffekt für den Faktor „Wirkdauer Δ^9-THC“ ($F(1,26) = 12{,}62$; $p = 0{,}001$), der dadurch zustande kam, dass nach 2 h Wirkdauer mehr Δ^9-THC im Gehirngewebe nachweisbar war als nach 15 min. Außerdem wurde ein Interaktionseffekt zwischen den Faktoren „Versuchsgruppe“ und „Wirkdauer von Δ^9-THC“ nachgewiesen ($F(1,26) = 5{,}56$; $p = 0{,}026$). Die Auflösung des Interaktionseffektes ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe “THC-ölig/a” und “THC-ölig/b” ($p = 0{,}004$), wobei nach 2 h signifikant höhere Δ^9-THC-Spiegel im Gehirn gemessen wurden. Zwischen den Versuchsgruppen “THC-wässrig/b” und “THC-ölig/b” wurde nur noch ein tendenzieller Effekt nachgewiesen ($p = 0{,}064$), der ebenso aus der höheren Δ^9-THC-Konzentration im öligen Lösungsmittel zum 2 h Zeitpunkt resultierte (siehe Abbildung 32 b).

In Abbildung 32 c sind die Δ^9-THC-Konzentrationen der Behandlungen “THC-wässrig/a”, “THC-ölig/a”, “THC-wässrig/b” und “THC-ölig/b” im Lebergewebe dargestellt. Es gab weder einen signifikanten Haupteffekt für den Faktor „Wirkdauer von Δ^9-THC“ ($F(1,26) = 0{,}99$; $p = 0{,}330$) noch für die Behandlungsgruppe ($F(1,26) = 0{,}70$; $p = 0{,}410$). Es gab jedoch einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den Faktoren „Wirkdauer von Δ^9-THC“ und „Behandlung“ ($F(1,26) = 6{,}70$; $p = 0{,}016$). Die Auflösung des Effekts ergab nach p-Wert Korrektur jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr. Die Δ^9-THC Gruppen, in denen das

ölige Lösungsmittel verwendet wurde, zeigten dennoch im Mittel 2 h nach Injektion höhere Δ^9-THC-Konzentration (15 min: 27,46 ± 48,07 pmol/ml, 2 h: 257,97 ± 337,83 pmol/ml). Im Gegensatz dazu waren im wässrigen Lösungsmittel die Δ^9-THC-Konzentrationen nach 2 h im Mittel etwas geringer als nach 15 min (15 min: 140,16 ± 159,34 pmol/ml, 2 h: 37,44 ± 15,58 pmol/ml). Allerdings waren die Standardabweichungen hoch und es bestand kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 32 c).

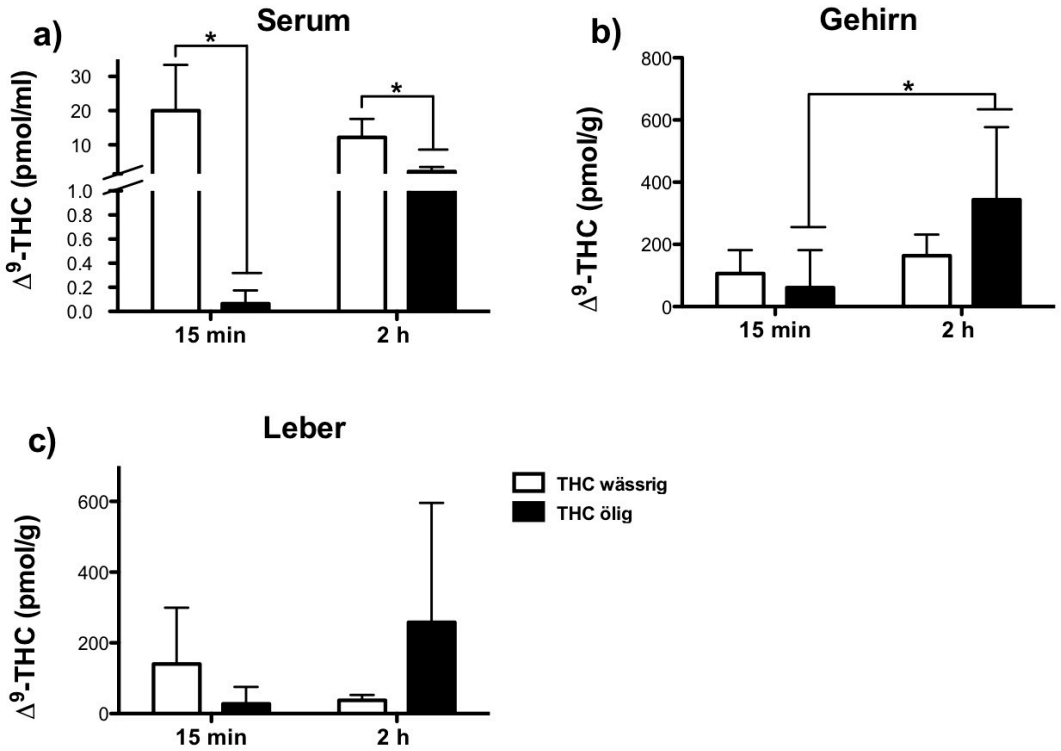


Abbildung 32:
Δ^9-THC-Konzentration im Serum, Gehirn und Leber in Abhängigkeit von der Δ^9-THC Wirkdauer und dem Lösungsmittel.

Im Serum **(a)** waren die Δ^9-THC-Spiegel nach THC-Gabe unabhängig von der Wirkdauer im öligen Lösungsmittel signifikant höher als im wässrigen Lösungsmittel ($p = 0{,}004$). Im Gehirn **(b)** differierte die Behandlungsgruppe "THC-ölig/15 min" von "THC-ölig/2 h " signifikant ($p = 0{,}004$). Dabei waren die Δ^9-THC-Konzentrationen im öligen Lösungsmittel nach 2 h im Vergleich zu 15 min erhöht. Ein Trend ergab sich für "THC-wässrig" vs. "THC-ölig" zum 2 h Zeitpunkt ($p = 0{,}064$). In der Leber **(c)** ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Zwar waren im Mittel die Δ^9-THC-Spiegel im öligen Lösungsmittel nach 2 h höher, während im wässrigen Lösungsmittel die Δ^9-THC-Konzentrationen hingegen nach 2 h geringer zu sein schienen als nach 15 min. Allerdings waren die Standardabweichungen hoch und es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. (*: $p \leq 0{,}05$)

9.2.2 Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen durch Δ^9-THC

Abbildung 33 a-d zeigt die Konzentrationen der einzelnen Analyte Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG im Serum für die Versuchsgruppen "THC-wässrig/a", "THC-ölig/a", "THC-wässrig/b", "THC-ölig/b" und "VEH/b". Allen Vehikeltieren wurde zum 2 h Zeitpunkt nach Injektion Blut entnommen und anschließend erfolgte die Organentnahme. Im Serum zeigte die THC-Behandlung unabhängig vom Lösungsmittel und von der Δ^9-THC Wirkdauer keine Wirkung auf die Anandamid- und

OEA-Konzentrationen. Für Anandamid fand sich zwar ein signifikanter Haupteffekt der „Behandlung“ (AEA: F (4,36) = 4,00; p = 0,009), in der Post hoc-Analyse gab es nach p-Wert-Korrektur jedoch keine signifikanten Effekte oder Tendenzen mehr. Dieser Haupteffekt muss außerdem mit Vorsicht betrachtet werden, da trotz Datentransformation keine Varianzhomogenität erreicht wurde (Levene-Test : p < 0,001). Für OEA gab es keine signifikanten Haupteffekte oder Interaktionen (siehe Abbildung 33 a und b). Der OEA-Spiegel war also unabhängig von der Behandlung im Mittel in etwa gleich hoch.

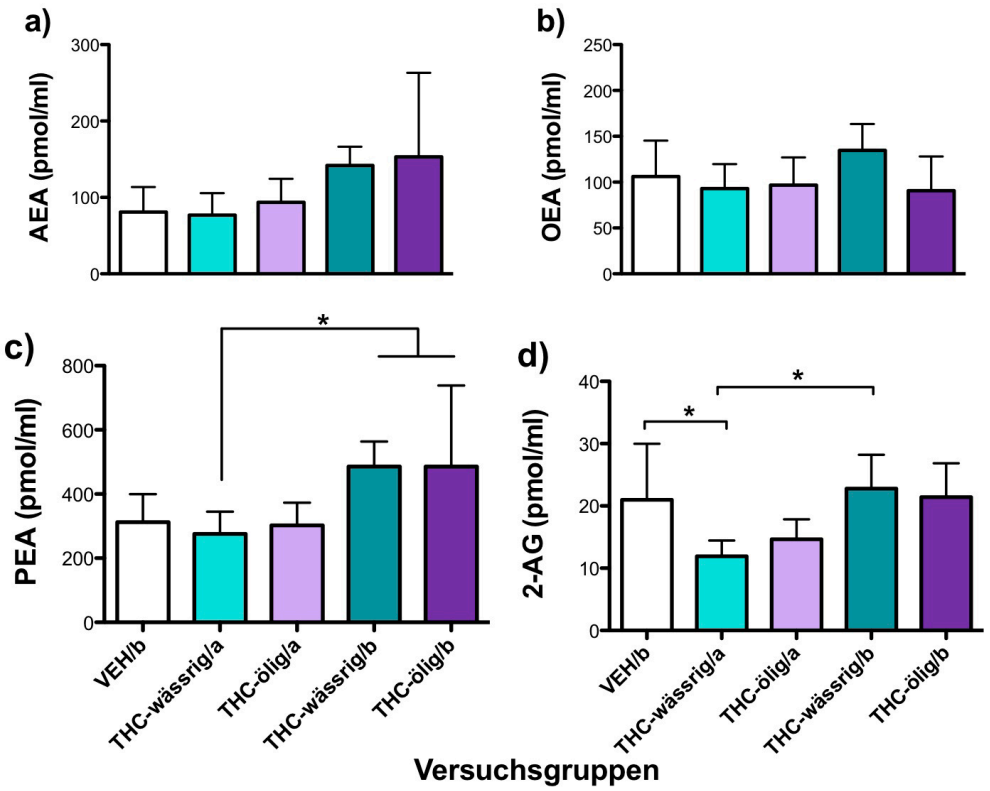


Abbildung 33:
Eicosanoidkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h).

Zwischen den Behandlungsgruppen unterschieden sich die Anandamid (AEA)**(a)**- und die OEA**(b)**-Konzentrationen im Serum nicht. Die PEA**(c)**-Spiegel waren hingegen nach Δ^9-THC-Gabe im Mittel unabhängig vom Lösungsmittel erhöht, wenn die Injektion 2 h vor der Blutentnahme erfolgte. Dieser Effekt war für die Versuchsgruppe “THC-wässrig/a” vs. “THC-wässrig/b” (p = 0,02) sowie vs. “THC-ölig/b” (p = 0,04) signifikant. Tendenziell unterschied sich “VEH/b” von “THC-wässrig/b” (p = 0,06). Die 2-AG-Spiegel **(d)** der Versuchsgruppe „THC-wässrig/a” waren im Vergleich zu “THC-wässrig/b” (p = 0,02) und “VEH/b” (p = 0,04) signifikant erniedrigt. (*: p ≤ 0,05)

Für PEA und 2-AG gab es hingegen signifikante Haupteffekte für den Faktor „Behandlung“ (PEA: F (4,36) = 5,94; p = 0,001; 2-AG: F (4,29) = 5,32; p = 0,002). Die Varianzhomogenität war für PEA trotz Datentransformationen jedoch nicht gegeben (Levene-Test PEA: p < 0,001). Die Auflösung des Effekts über die Post hoc-Analyse zeigte, dass sich der PEA-Gehalt im Serum der Versuchsgruppe “THC-wässrig/a” signifikant von dem der Versuchsgruppe “THC-wässrig/b” (p = 0,02) sowie von dem der Versuchsgruppe “THC-ölig/b” (p = 0,04) unterschied. Sowohl im wässrigen als auch im öligen Lösungsmittel war die PEA-Konzentration im Serum nach 2 h höher als

wenn THC im wässrigen Lösungsmittel verabreicht wurde und die Blutentnahme nach 15 min erfolgte. Tendenziell differierte auch die Vehikelgruppe “VEH/b” von “THC-wässrig/b” ($p = 0,06$; siehe Abbildung 34 c). Für 2-AG ergab die Post hoc-Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen “THC-wässrig/a” vs. “THC-wässrig/b” ($p = 0,02$). Wurde das THC im wässrigen Lösungsmittel verabreicht, war der 2-AG-Spiegel 2 h nach Injektion höher als nach 15 min (siehe Abbildung 33 d). Außerdem unterschied sich Versuchsgruppe “THC-wässrig/a” signifikant von “VEH/b” ($p = 0,04$), wobei die 2-AG-Spiegel nach THC-Behandlung im wässrigen Lösungsmittel geringer waren. Die Vehikelgruppe unterschied sich nicht von den Versuchsgruppen mit 2 h Wirkdauer.

In Abbildung 34 a-d sind die Konzentrationen der Analyte Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG im Gehirngewebe für die Versuchsgruppen “THC-wässrig/a”, “THC-ölig/a”, “THC-wässrig/b”, “THC-ölig/b” und “VEH/b” dargestellt. Die OEA- und 2-AG-Spiegel unterschieden sich zwischen den Behandlungsgruppen nicht (siehe Abbildung 34 b und d). Die Δ^9-THC-Versuchsgruppen differierten nicht von der Vehikelgruppe. Sowohl für Anandamid als auch für PEA gab es hingegen signifikante Behandlungseffekte (AEA: $F(4,36) = 3,40$; $p = 0,019$; PEA: $F(4,36) = 3,37$; $p = 0,019$). Die Post hoc-Analyse für Anandamid zeigte allerdings nach p-Wert-Korrektur nur noch einen tendenziellen Effekt zwischen Versuchsgruppe “THC-ölig/a” und “THC-wässrig/b” ($p = 0,06$), wobei die Anandamidkonzentration der “THC-wässrig/b” Gruppe niedriger war (siehe Abbildung 34 a). Die PEA-Konzentration unterschied sich signifikant zwischen den Versuchsgruppen “THC-wässrig/b” und “VEH/b” ($p = 0,02$). Der PEA-Spiegel war bei den Δ^9-THC-behandelten Tieren (“THC-wässrig/b”) im Vergleich zu den Vehikeltieren signifikant erhöht (siehe Abbildung 34 c).

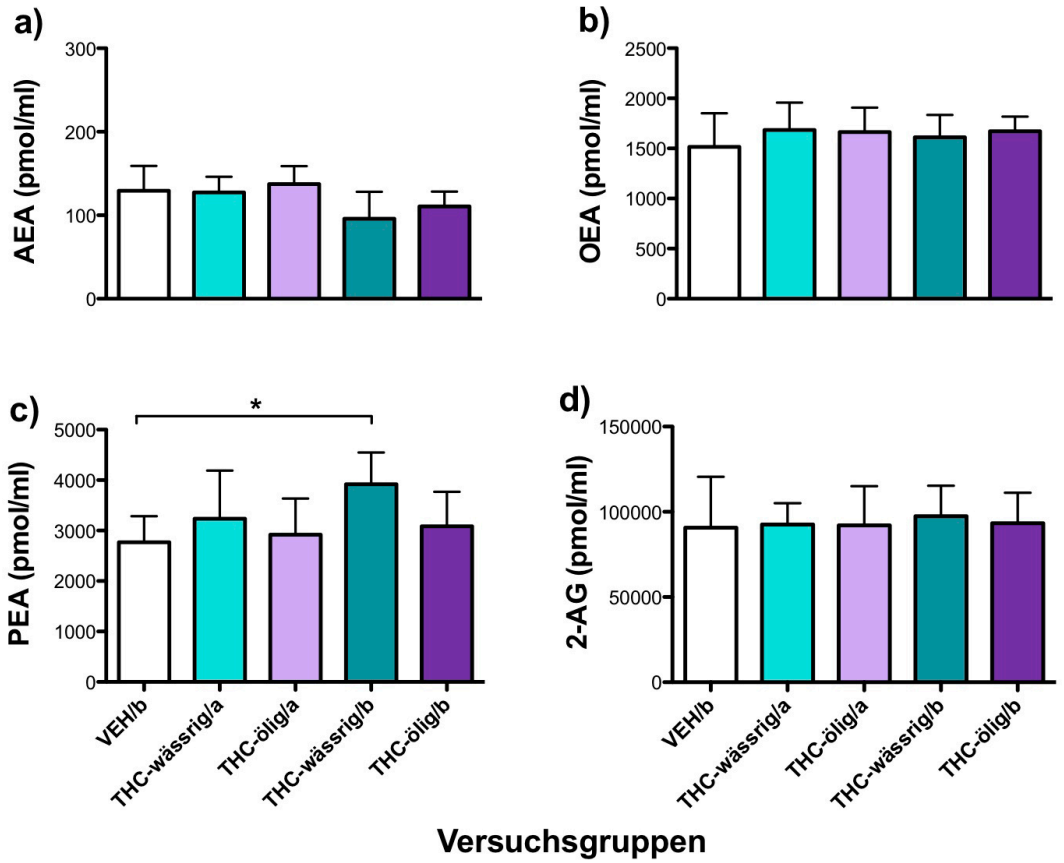


Abbildung 34:
Eicosanoidkonzentrationen im Gehirngewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h).

2-AG(d)- und OEA(b)-Spiegel unterschieden sich nach Δ^9-THC-Behandlung nicht von der Vehikelgruppe. Für Anandamid (AEA) **(a)** zeigte sich ein tendenzieller Effekt zwischen "THC-ölig/a" und "THC-wässrig/b" (p = 0,06), wobei die AEA-Spiegel bei der 2 h Versuchsgruppe ("THC-wässrig/b") geringer waren. Die PEA-Konzentration **(c)** war in der Versuchsgruppe "THC-wässrig/b" im Vergleich zu "VEH/b" signifikant erhöht (p = 0,02). (*: p ≤ 0,05)

Abbildung 35 a-d zeigt die Konzentrationsspiegel von Anandamid (AEA), OEA, PEA und 2-AG im Lebergewebe für die Versuchsgruppen "THC-wässrig/a", "THC-ölig/a", "THC-wässrig/b", "THC-ölig/b" und "VEH/b". Bezüglich der 2-AG-Konzentrationen fanden sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 35 d). Für Anandamid gab es einen signifikanten Haupteffekt (AEA: F (4,36) = 3,88; p = 0,010). In der Post hoc-Analyse wurde ein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppe "THC-wässrig/a" vs. "THC-wässrig/b" (p = 0,02) sowie ein tendenzieller Effekt zwischen "THC-wässrig/b" vs. "VEH/b" (p = 0,06) nachgewiesen. Die Anandamidkonzentration war in der "THC-wässrig/b" Gruppe deutlich erhöht. Die Versuchsgruppe "THC-ölig/b" hingegen zeigte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen keine erhöhten Anandamidspiegel (siehe Abbildung 35 a). Für OEA und PEA zeigte sich auch ein signifikanter Haupteffekt der „Behandlung" (OEA: F (4,36) = 3,80; p = 0,011; PEA: F (4,36) = 3,37; p = 0,05), allerdings mussten die Daten mit Vorsicht betrachtet werden, weil eine Varianzhomogenität trotz

Datentransformationen nicht gegeben war (Levene-Test OEA: F (4,36) = 24,19; p< 0,001; EA: F (4,36) = 12,15; p < 0,001). Wie die Post hoc-Analyse ergab, war die OEA-Konzentration in der Versuchsgruppe “THC-wässrig/a” signifikant höher als in “VEH/b” (p = 0,02; siehe Abbildung 35 b). Für PEA ergab die Post hoc-Analyse für den Gruppeneffekt nach p-Wert Korrektur nur noch einen tendenziellen Effekt zwischen den Versuchsgruppen “THC-wässrig/a” und “VEH/b” (p = 0,08). Auch hier war die PEA-Konzentration nach Behandlung mit Δ^9-THC in wässriger Lösung nach 15 min höher als in der Vehikelgruppe (siehe Abbildung 35 c). Die THC-Gabe in öliger Lösung zeigte dagegen weder nach 15 min noch nach 2 h einen Unterschied zur Vehikelbehandlung.

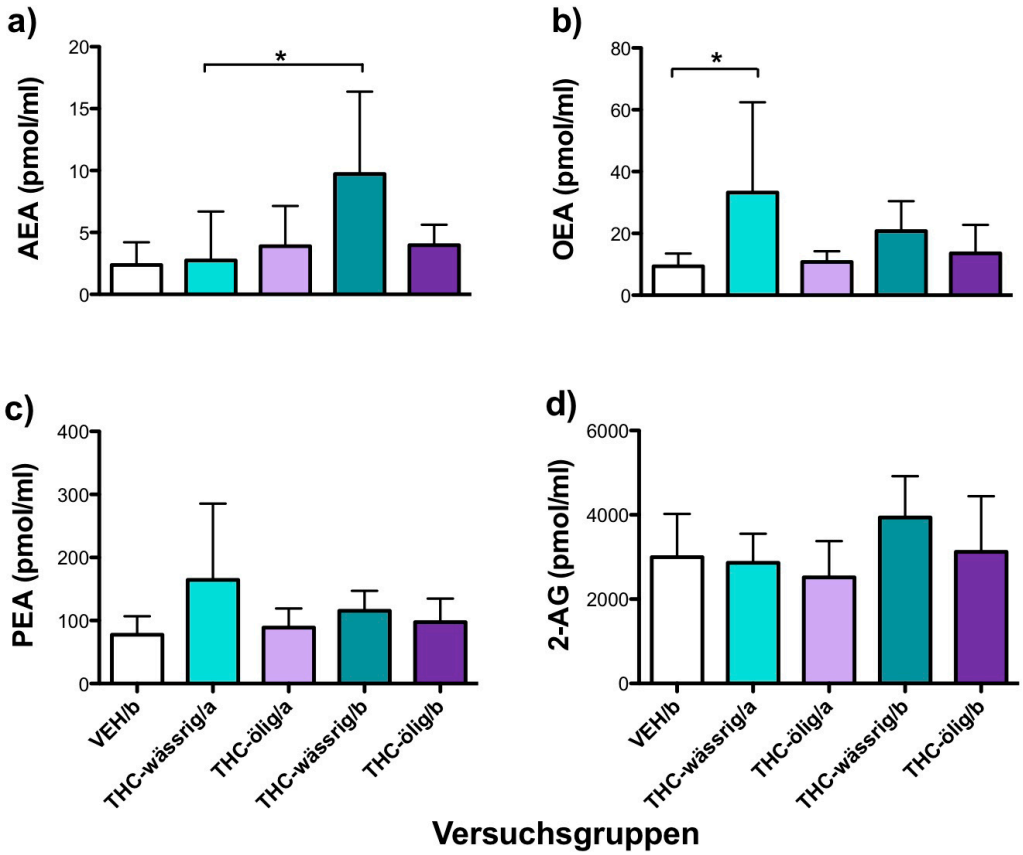


Abbildung 35:
Eicosanoidkonzentrationen im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h).

Die Anandamid (AEA)-Konzentration **(a)** der Versuchsgruppe “THC-wässrig/b” unterschied sich signifikant von der Versuchsgruppe “THC-wässrig/a” (p = 0,02) sowie tendenziell von “VEH/b” (p = 0,06). “THC-wässrig/a” zeigte sowohl erhöhte OEA- als auch PEA-Spiegel, wobei der OEA-Spiegel **(b)** einen signifikanten Unterschied zur Vehikelgruppe zeigte (p = 0,02). Die PEA-Konzentration **(c)** unterschied sich hingegen zwischen den beiden Gruppen nur tendenziell (p = 0,08). Die 2-AG-Konzentrationen **(d)** unterschieden sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht. (*: p ≤ 0,05)

9.3 Korrelationsanalyse zwischen Serum-Eicosanoid-konzentrationen und Eicosanoidspiegeln im Gehirn

Für jede Behandlungsgruppe wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den Eicosanoidkonzentrationen im Serum und Gesamthirn gab. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnisse der Korrelationen
(signifikante p-Werte sind fett markiert, korrigierter p-Wert in Klammern, CBD= Cannabidiol)

Korrelation zwischen c(Serum) und c(Gehirn)	Versuchs-gruppe	Korrelations-koeffizient r	p-Wert	
	"VEH"	0,233	0,511	
	"CBD-wässrig"	0,666	0,103	
	"CBD-ölig"	0,673	0,143	
	"URB-wässrig"	0,874	0,053	
AEA	"URB-ölig"	0,234	0,705	
	"THC-wässrig/a"	-0,280	0,543	
	"THC-wässrig/b"	-0,291	0,484	
	"THC-ölig/a"	-0,342	0,368	
	"THC-ölig/b"	0,421	0,406	
	"VEH"	-0,073	0,832	
	"CBD-wässrig"	0,790	**0,034**	**(1,224)**
	"CBD-ölig"	*-0,157*	0,766	
	"URB-wässrig"	0,884	**0,047**	**(1,692)**
OEA	"URB-ölig"	0,457	0,439	
	"THC-wässrig/a"	-0,484	0272	
	"THC-wässrig/b"	*0,366*	0,373	
	"THC-ölig/a"	*-0,451*	0,223	
	"THC-ölig/b"	0,000	0,999	
	"VEH"	0,206	0,543	
	"CBD-wässrig"	0,840	**0,018**	**(0,648)**
	"CBD-ölig"	0,074	0,890	
	"URB-wässrig"	0,932	**0,021**	**(0,756)**
PEA	"URB-ölig"	0,535	0,353	
	"THC-wässrig/a"	0,596	0,158	
	"THC-wässrig/b"	0,704	0,051	
	"THC-ölig/a"	0,242	0,530	
	"THC-ölig/b"	-0,114	0,830	

2-AG	“VEH”	0,371	0,261
	“CBD-wässrig”	-0,628	0,131
	“CBD-ölig”	-0,767	0,075
	“URB-wässrig”	-0,605	0,279
	“URB-ölig”	0,826	0,085
	“THC-wässrig/a”	0,542	0,209
	“THC-wässrig/b”	-0,262	0,531
	“THC-ölig/a”	-0,150	0,699
	“THC-ölig/b”	-0,450	0,371

Für die Vehikelgruppe, für alle Δ^9-THC Versuchsgruppen sowie für “CBD-ölig” und “URB-ölig” wurden keine Korrelationen zwischen Serum und Gehirngewebe gefunden. Sowohl für Cannabidiol als auch für URB 597 im wässrigen Lösungsmittel lagen allerdings signifikante Korrelationen für die Eicosanoide OEA und PEA vor. Hier gab es nach beiden Behandlungen positive Korrelationseffekte zwischen der OEA-Konzentration im Serum und im Gehirngewebe (“CBD-wässrig” $r = 0,790$, $p = 0,034$, “URB-wässrig” $r = 0,884$, $p = 0,047$; siehe Abbildung 36 a und c) bzw. zwischen der PEA-Konzentration im Serum und im Gehirngewebe (“CBD-wässrig” $r = 0,840$, $p = 0,018$, “URB-wässrig” $r = 0,932$; $p = 0,021$; siehe Abbildung 36 b und d). Je höher die OEA- bzw. PEA-Konzentration im Serum war, desto höher war die Konzentration im Gehirn. Nach p-Wert Korrektur zeigte sich allerdings für beide Analyte keine Signifikanz mehr (OEA: “CBD-wässrig” $p = 1,224$, “URB-wässrig” $p = 1,692$; PEA: “CBD-wässrig” $p = 0,648$, “URB-wässrig” $p = 0,756$).

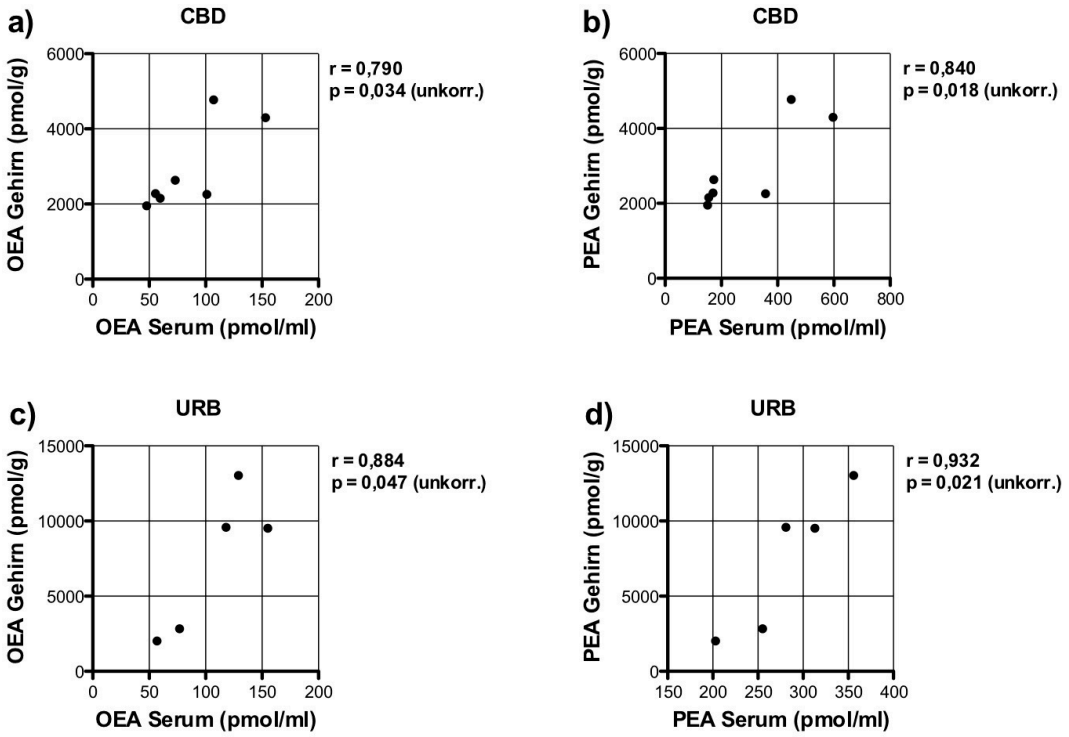


Abbildung 36:
Korrelationsgraphiken für Eicosanoidkonzentrationen Serum vs. Gehirn nach Cannabidiol (CBD)- bzw. URB 597-Behandlung im wässrigen Lösungsmittel ("CBD-wässrig", "URB-wässrig")

Wie in Abbildung a) dargestellt, war der OEA-Serumspiegel mit der OEA-Gehirnkonzentrationen in der "CBD-wässrig" Versuchsgruppe positiv korreliert. Je mehr OEA im Serum war, desto höher war das Level im Gehirngewebe. Eine positive Korrelation zeigt sich auch für PEA-Konzentrationen der "CBD-wässrig"-Behandlungsgruppe in b). In Abbildung c) und d) ist der Zusammenhang zwischen dem OEA-/PEA-Serumspiegel und der OEA-/PEA-Gehirnkonzentrationen in der "URB-wässrig" Versuchsgruppe dargestellt. Ebenso fand sich nach URB 597-Behandlung für beide Analyten eine jeweils positive Korrelation. Das heißt je mehr OEA bzw. PEA im Serum war, desto höher waren die Level im Gehirngewebe. Alle Effekte waren nach p-Wert Korrektur jedoch nicht mehr signifikant (vgl. Tabelle). (R = Pearsonkorrelationskoeffizient)

10 Diskussion FAAH Enzymassay/ Tierexperimentelle Endocannabinoidstudie

Im Fokus der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie stand zum einen die Frage, ob das Phytocannabinoid Cannabidiol eine dem selektiven FAAH-Inhibitor URB 597 vergleichbare Wirkung auf die Konzentrationen der Endocannabinoide Anandamid und 2-AG sowie auf die strukturell verwandten Substanzen OEA und PEA im Tiermodell Ratte hat. Zum anderen sollte der periphere und zentrale Einfluss von Δ^9-THC auf die Konzentrationen von Anandamid, 2-AG, OEA und PEA dargestellt werden. Außerdem wurde überprüft, ob unterschiedliche Lösungsmittel die Wirkung von Cannabidiol, Δ^9-THC und URB 597 auf die Endocannabinoide und strukturell verwandten Fettsäureethanolamide verändern. Mittels Korrelationsanalyse sollte desweiteren ein möglicher Zusammenhang zwischen Eicosanoidkonzentrationen im Gehirn und Serum detektiert werden.

Im Vergleich zu Zellmembranaufbereitungen von murinen Neuroblastomzellen, in denen die IC_{50} 27,5 µM betrug (Bisogno et al., 2001), ergaben die Ergebnisse des Enzymassays in der vorliegenden Arbeit, dass Cannabidiol bereits mit einer IC_{50} von 8,66 µM die FAAH-Hydrolyse in Rattengehirnpräparationen blockierte (siehe auch Vorabveröffentlichung Leweke et al., 2012b). Dass in der zitierten Studie eine geringere inhibitorische Wirkung beobachtet wurde, könnte damit zusammenhängen, dass für den Enzymassay Zellkulturen aus Neuroblastomzellen benutzt wurden, während in der vorliegenden Dissertation Membranpräparationen des Gehirns von gesunden Nagern eingesetzt wurden. Da Neuroblastomzellen Tumorzellen sind, die sich aus peripheren Nervenzellen ableiten, könnte durch ihre schnelle Vermehrung eventuell auch der gesamte Zellstoffwechsel und damit auch das FAAH Enzym verändert sein. Eine zusätzliche Erklärung könnte sein, dass das FAAH-Enzym zwischen den beiden Spezies (Maus, Ratte) differiert und dadurch möglicherweise die Wirkweise eines Pharmakons wie Cannabidiol beeinflusst wird. Giang *et al.* (1997) fanden in molekularbiologischen Studien eine 91% Homologie des FAAH Enzyms bei Maus und Ratte, so dass die Enzyme der beiden Spezies nicht identisch sind. Das humane FAAH Enzym besitzt sogar nur 82% Ähnlichkeit mit dem Ratten FAAH Enzym sowie nur 84% Homologie mit dem murinen FAAH Enzym (Giang und Cravatt, 1997). Daher ist nicht auszuschließen, dass die IC_{50} von Cannabidiol bezüglich des humanen FAAH-Enzyms von den Werten der Literatur bzw. der vorliegenden Arbeit abweicht. Eine alternative Möglichkeit zum FAAH Enzymassay könnte die Untersuchung der Cannabidiolwirkung auf FAAH mittels FAAH-PET darstellen. Rusjan et al. (2013) ist es gelungen, das erste verfügbare Radiopharmakon ^{11}C-carbonyl-URB694 (^{11}C-CURB)

zur funktionellen Bildgebung des FAAH Enzyms im humanen, lebenden Gehirn zu entwickeln. Falls Cannabidiol wie URB 597 als FAAH-Inhibitor wirkt, müsste die Bindung von ^{11}C-CURB an das FAAH-Enzym im Gehirn bei Cannabidioladministration dosisabhängig abnehmen.

In der vorliegenden tierexperimentellen Endocannabinoidstudie wurde neben dem in der Literatur oft verwendeten wässrigem Lösungsmittel ein öliges Solvens, Sesamöl, gewählt. In der pharmazeutischen Technologie wird Öl oftmals als Lösungsmittel zur diffusionskontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen verwendet, so z.B. als Depotformulierung bei bestimmten Neuroleptika und Antidepressiva (Senior und Radomsky, 2000). In der ersten doppelblinden, randomisierten, kontrollierten klinischen Cannabidiolstudie (Leweke et al., 2012b) wurden Schizophreniepatienten Kapseln mit reinem Cannabidiol verabreicht, dessen Bioverfügbarkeit nicht durch eine galenische Formulierung optimiert wurde. Hierunter war eine recht langsame Anflutung von Cannabidiol beobachtet worden. Das ölige Lösungsmittel kommt dieser Kinetik näher als das wässrige Lösungsmittel und bietet daher eine möglicherweise bessere Vergleichbarkeit zwischen den Studien. Hinzu kommt, dass die lipophilen Cannabinoide sich gut in Sesamöl lösen lassen. Die Pharmakokinetik der Eicosanodie wurde im Serum, in der Leber und im Gehirn untersucht.

Um zu überprüfen, ob Cannabidiol das FAAH Enzym im Tiermodell Ratte inhibiert, wurde die Cannabidiolwirkung auf die Pharmakokinetik der Eicosanoide nicht nur mit Vehikel sondern auch mit der Wirkung von URB 597, einem bekannten selektiven FAAH-Inhibitor, verglichen. Die Messungen der Teilstudie „Wirkung von Cannabidiol und URB 597 auf das Endocannabinoidsys“em" zeigten deutlich, dass die URB 597-Gabe (i. p.) zu einem Anstieg der Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen im Gehirngewebe führte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorherigen Studien, in denen URB 597 als selektiver FAAH-Inhibitor mit einer IC_{50} von 4,6 ± 1,6 nM das FAAH Enzym im Gehirn hemmte (Kathuria et al., 2003). Da die Hydrolyse von Anandamid, OEA und PEA durch FAAH katalysiert wird, kommt es unter URB 597-Behandlung zur Akkumulation dieser Analyte (siehe 1.2.3.1). Nach einer Studie von Fegley *et al.* (2005) erreicht URB 597 15 min nach Injektion den Maximaleffekt. Die Wirkung dauert mindestens 16 h an. 1 h nach URB 597-Injektion werden für Anandamid Maximalkonzentrationen im Gehirngewebe gemessen, während PEA erst nach 2 h und OEA sogar erst nach 6 h den Peak erreichen (Fegley et al., 2005). Das heißt, nach 2 h Wirkdauer kann man nur für PEA den maximalen URB 597-Effekt erwarten, während bei Anandamid die maximale Konzentration vermutlich wieder langsam abnimmt und bei OEA noch nicht erreicht ist. Sowohl für OEA als auch für PEA wurden unabhängig vom Lösungsmittel signifikante Erhöhungen der Konzentrationen gemessen. Anandamid

zeigte hingegen nur nach Injektion der wässrigen, aber nicht der öligen URB 597-Lösung einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Gehirn. Da aber die Anandamidwerte, wie auch in der Abbildung 26 erkennbar, bei beiden URB 597-Darreichungsformen in einem ähnlichen Bereich liegen, läßt dies vermutlich auf ein Problem der Datenvarianz schließen. Dafür spricht auch, dass eine verzögerte URB 597-Freisetzung im Sesamöl vermutlich nicht die Ursache sein kann, da dann dieser Effekt auch bei OEA und PEA zu sehen sein müsste, die selbst im wässrigen Lösungsmittel den maximalen Peak erst später als Anandamid erreichen. Die gemessenen 2-AG-Spiegel blieben im Gegensatz zu den Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen nach URB 597-Administration unbeeinflusst. Dies bestätigt bisherige Erkenntnisse (Kathuria et al., 2003), da 2-AG nicht von FAAH inaktiviert wird, sondern primär von der Monoacylglycerol-Lipase (MGL) (siehe 1.2.3.2).

In der Leber hatte die URB 597-Behandlung nur Effekte auf OEA und PEA, nicht aber auf 2-AG und Anandamid. Dabei waren die OEA-Spiegel für URB 597, unabhängig vom Lösungsmittel, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, während PEA nach URB 597-Gabe sich zudem signifikant von beiden Cannabidiol-Versuchsgruppen unterschied. Das Lösungsmittel beeinflusste hier nicht die Wirkung von URB 597. Wie in der vorliegenden Studie fanden Fegley *et al.* (2005) keine Beeinflussung der Anandamidkonzentration in der Leber durch URB 597-Behandlung. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass andere Enzyme in der Leber wie z. B. Cytochrom P-450 Enzyme oder COX-2 Anandamid trotz URB 597-Behandlung abbauen, da diese nicht durch URB 597 gehemmt werden (siehe 1.2.3.1; Kozak und Marnett, 2002; Rouzer und Marnett, 2008). Dies würde bedeuten, dass die Anandamidinaktivierung in der Leber im Gegensatz zum Gehirn überwiegend nicht durch FAAH erfolgt. In der Literatur existieren dazu bis dato allerdings keine weiteren Studien, so dass dies gegenwärtig spekulativ bleiben und in zukünftigen Studien geklärt werden muss.

Im Serum fand sich 2 h nach URB 597-Injektion überraschenderweise keine Erhöhung der Anandamid-, OEA- und PEA-Spiegel. Dies könnte allerdings durch die kurze Halbwertszeit von URB 597 im Serum bedingt sein: in einer *in vitro* Studie wurde gezeigt, dass URB 597 von Hydrolasen abgebaut wird und die Halbwertszeit weniger als 1 h beträgt (Vacondio et al., 2009). Dabei erfolgt durch verschiedene, bis jetzt nicht identifizierte Serum-Hydrolasen eine basische Hydrolyse des Carbamat-Derivates URB 597. Möglich ist also, dass URB 597 2 h nach Injektion nicht mehr in ausreichender Konzentration vorlag, um FAAH ausreichend zu hemmen und daher kein signifikanter Anstieg der Eicosanoidkonzentrationen mehr gemessen werden konnte. Wie oben erläutert, scheint es dagegen in lipophilen Kompartimenten wie dem Gehirn- und Lebergewebe zur Anreicherung von URB 597 zu kommen und folglich zu einer

längeren Wirkdauer. Dies steht auch im Einklang mit der bereits zitierten Studie, in der im Lebergewebe eine doppelt so lange Halbwertszeit gemessen wurde wie im Serum (Vacondio et al., 2009).

Um noch einen detaillierteren Einblick in die Wirkung von URB 597 auf die Eicosanoide im Gehirn zu erlangen, wurden die Effekte in spezifischen Gehirnarealen im Vergleich zum Vehikel untersucht. Unabhängig davon, ob die Tiere mit URB 597 oder mit Vehikel behandelt wurden, ergab die Analyse der einzelnen Gehirnareale erhöhte Anandamidspiegel im Hippocampus und im präfrontalen Kortex. In Übereinstimmung mit Di Marzo *et al.* (2000) fanden sich die höchsten Ausgangskonzentrationen für Anandamid im Hippocampus. Sowohl im Hippocampus als auch im präfrontalen Kortex ist auch die Dichte der CB_1-Rezeptoren höher als in den anderen Hirnregionen (Thalamus, Hypothalamus, Mittelhirn, Cerebellum; Herkenham et al., 1991; Thomas et al., 1992; Tsou et al., 1998).

Im Hippocampus kommt dem Endocannabinoidsystem eine zentrale Rolle bei der neuronalen Synchronisation zu (Wilson und Nicoll, 2001). Dies könnte erklären, warum in den beiden Gehirnregionen höhere Spiegel des endogenen Liganden Anandamid sowie höhere Dichten seiner Zielstruktur, den CB_1-Rezeptoren, bestehen. Beide Gehirnareale spielen zudem eine wichtige Rolle bei schizophrenen Erkrankungen (Harrison, 2004; Heckers et al., 1998; Knable und Weinberger, 1997). Interessanterweise wurde weder im Hippocampus noch im präfrontalen Kortex eine erhöhte Anandamidkonzentration nach URB 597-Gabe gefunden, während in allen anderen Gehirnregionen mit Ausnahme des Hypothalamus wie erwartet ein Anstieg des Anandamidspiegels beobachtet wurde. In PET-Studien von Wilson et al. (2011) und Hicks et al. (2013) wurden im Kortex die größten Anreicherungen des jeweiligen Radiotracers zur Markierung von FAAH gefunden. Da das FAAH Enzym aber sowohl im Hippocampus als auch im präfrontalen Kortex stark exprimiert wird (Egertova et al., 2003; Ueda et al., 2000), wäre eine Erhöhung der Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen durch die URB 597-Behandlung zu erwarten gewesen. Allerdings wurden erhöhte OEA- und PEA-Spiegel gemessen, was auf eine intakte Blockade des FAAH Enzyms hindeutet. Ein Grund könnte darin liegen, dass im Hippocampus und präfrontalen Kortex neben FAAH auch andere Enzyme spezifisch zur Inaktivierung von Anandamid beitragen könnten, so dass eventuell eine Hemmung der Anandamidhydrolyse durch die URB 597-Blockade von FAAH nicht zu einer Akkumulation führt. Des Weiteren fällt auf, dass die Anandamidkonzentrationen in diesen Gehirnarealen wie oben erwähnt besonders hoch sind, so dass spekuliert werden kann, dass die Spiegel durch URB 597-Gabe nicht noch mehr erhöht werden können, da durch einen bislang nicht bekannten Rückkopplungsmechanismus die

Anandamidsynthese in einem ähnlichen Maße abnimmt wie der Abbau durch FAAH-Blockade verzögert wird. Die Frage, was zu einer solchen Rückkopplung führen könnte, kann hier nicht beantwortet werden. Für eine solche Überlegung spricht, dass die OEA- und PEA-Konzentrationen im Hippocampus und im präfrontalen Kortex im Vergleich zu den anderen Gehirnregionen eher niedrig sind. Das heißt, wenn alle drei Eicosanoide über FAAH abgebaut werden, dann scheint die Synthese von Anandamid, OEA und PEA in den beiden Gehirnarealen unterschiedlich stark aktiv zu sein und andererseits wäre ohne den spekulierten Rückkopplungsmechanismus Anandamid Substrat der Wahl des Enzyms. Das im Hypothalamus keine signifikante Erhöhung der Anandamidkonzentration beobachtet werden konnte, liegt wahrscheinlich an der hohen, gemessenen Standardabweichung. Wie bereits für das Gesamthirn festgestellt, zeigte auch die Analyse der einzelnen Gehirnregionen, dass URB 597 im wässrigen Lösungsmittel die Anandamidhydrolyse stärker hemmt als es im Sesamöl der Fall ist. Vermutlich kann dies ebenso mit der großen Datenvarianz begründet werden.

OEA und PEA wiesen dagegen in der vorliegenden Studie sowohl in den Kontrolltieren als auch in den URB 597-behandelten Tieren die geringsten Spiegel im Hippocampus und präfrontalen Kortex im Vergleich zu den übrigen Gehirnarealen auf. Im Mittelhirn und Thalamus waren die Konzentrationen dagegen hoch. Wie in der Einleitung erläutert, ist die CB_1-Rezeptordichte hier geringer (siehe 1.2.1). OEA und PEA als strukturverwandte Substanzen von Anandamid entfalten ihre Wirkung nicht über CB-Rezeptoren und zählen daher nicht zu den Endocannabinoiden (siehe 1.2.2). Sie binden wie in der Einleitung beschrieben am PPAR-α-Rezeptor, der vermehrt im Herz, in der Leber, in der Niere und auch im Gehirn vorkommt (Michalik et al., 2006). Im Nucleus ruber und Nucleus nervi oculomotorii des Mittelhirns sowie in bestimmten Nuclei des Thalamus (z.B. Nucleus rhomboidalis, Nucleus parafascicularis, Nucleus centromedianus) ist dieser Rezeptor stark vertreten (Moreno et al., 2004), was zu der Beobachtung passt, dass in diesen Arealen eine besonders hohe OEA- und PEA-Konzentrationen gemessen wurde. Das FAAH-Enzym wird ebenfalls in den Gehirnregionen mit keiner oder geringer CB_1-Rezeptordichte wie dem Mittelhirn und Thalamus exprimiert. Dies wird in der vorliegenden Arbeit auch dadurch bestätigt, dass URB 597 in diesen Regionen signifikant die OEA- und PEA-Spiegel steigert. Somit ist das FAAH Enzym vermutlich auch hier maßgeblich an der Inaktivierung von OEA und PEA beteiligt und beeinflusst dadurch insgesamt sowohl Endocannabinoid- als auch PPAR-α-Rezeptor-vermittelte Signalwege (Egertova et al., 2003).

Im Gegensatz zum Gesamthirn finden sich bei der Analyse der einzelnen Gehirnregionen lösungsmittelbedingte Unterschiede in der Wirkung von URB 597 auf OEA und PEA. URB 597 im wässrigen Solvens führte zum deutlichen Anstieg von OEA bzw.

PEA im Thalamus und präfrontalen Kortex während URB 597 im öligen Lösungsmittel die Inaktivierung von OEA bzw. PEA im Mittelhirn hemmte. Diese Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich ebenfalls mit der Varianz der Daten erklären, da die OEA- und PEA-Werte bei beiden Darreichungsformen in einem ähnlichen Bereich liegen.

Im Gegensatz zu Anandamid, OEA und PEA wird 2-AG, wie bereits erläutert, nicht von FAAH abgebaut, was sich auch darin widerspiegelt, dass die Gabe von URB 597 keinen Einfluss auf die 2-AG-Konzentrationen hatte. Betrachtet man die 2-AG-Spiegel in den verschiedenen Gehirnarealen, so fällt auf, dass 2-AG die höchsten Spiegel im Hypothalamus aufweist, obwohl hier die Dichte an CB_1-Rezeptoren gering ist (Herkenham et al., 1991). Möglich ist, dass 2-AG neben seiner Wirkung als Endocannabinoid als Zwischenprodukt verschiedener Lipidsynthesen fungiert und somit auch in Arealen mit wenigen CB_1-Rezeptoren vermehrt exprimiert wird.

Im Unterschied zu URB 597 zeigte Cannabidiol unabhängig vom Lösungsmittel weder im Serum noch im Gehirn- oder Lebergewebe einen Effekt auf die Anandamid-, OEA-, PEA- und 2-AG-Konzentrationen und differierte in der Wirkung nicht von der Vehikelgruppe. Somit konnte die in dieser Arbeit und in der Literatur beschriebene *in vitro* FAAH-Inhibition durch Cannabidiol (Enzymassay; Bisogno et al., 2001; Leweke et al., 2012b; Watanabe et al., 1996) nicht durch die vorliegende tierexperimentelle Endocannabinoidstudie bestätigt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden, tierexperimentellen Studie im Gehirn nachgewiesene Cannabidiolkonzentration lag allerdings um eine Vielfaches unterhalb der für eine mittlere FAAH-Inhibition erforderlichen Konzentration von 8,66 µM (siehe oben). Das heißt, dass die Dosierung zu gering gewählt wurde, um eine inhibitorische Wirkung überhaupt nachweisen zu können. Die verwendete Dosierung (12 mg/kg) wurde an die vorherige Humanstudie unserer Arbeitsgruppe angepasst (Leweke et al., 2012b): Den Patienten wurden 800 mg Cannabidiol pro Tag verabreicht, was bei einem Durchschnittsgewicht von 70 kg einer Dosis von 11,43 mg/kg entspricht. In der genannten Studie wirkte Cannabidiol antipsychotisch, wobei es zum Anstieg der Anandamid- aber auch der OEA- und PEA-Spiegel im Serum kam. Dies lässt vermuten, dass Cannabidiol durch FAAH-Blockade das Endocannabinoidsystem hochreguliert und somit seine Wirkung erzielt. Allerdings können andere Wirkmechanismen nicht ausgeschlossen werden (siehe 1.3.4). Dass diese Menge im Rattenmodell dennoch zu einer nicht nachweisbaren FAAH-Inhibition führt, könnte mehrere Gründe haben. Im Gegensatz zur zitierten Humanstudie, bei der Kapseln mit reinem Cannabidiol verwendet wurden, wurde den Ratten Cannabidiol nicht oral verabreicht, sondern i. p. injiziert. Es stellt sich die Frage, ob die Applikationsroute unterschiedliche Bioverfügbarkeiten von Cannabidiol bedingt. Möglich ist, dass

aufgrund der intraperitonealen Verabreichung des Cannabidiols in der vorliegenden Studie, weniger Cannabidiol im Gehirn ankam. In einer Studie von Navarro *et al*. (1993) wurde Δ^9-THC, das Cannabidiol strukturell stark ähnelt, in Sesamöl oral in Ratten appliziert und führte zu einer sedierenden Wirkung. Somit scheint die Bioverfügbarkeit bei einer oralen Gabe des in Sesamöl gelösten Cannabinoids auszureichen, um die gewünschte Wirkung zu erzielen und ist besser vergleichbar zur medikamentösen Gabe. Allerdings bedeutet diese Art der Administration zum einen mehr Stress für das Tier. Zum anderen wird in der Studie keine genaue Angabe zur Administration gemacht. Es ist nicht klar, ob das Tier mit einer Spritze im Mundwinkel gefüttert oder ob eine Schlundsonde verwendet wurde. Bei der Gabe mit Spritze kann nicht garantiert werden, dass das Tier alles schluckt. Dow-Edwards und Zhao (2008) wendeten die Schlundsonde als Administrationsroute für Δ^9-THC in Ratten an. Diese Applikationsart birgt allerdings Risiken wie Magenperforation. Die orale Gabe von Cannabidiol scheint laut der zitierten Studien eine Alternative darzustellen, ist allerdings mit Nachteilen wie Stress und Applikationsrisiken verbunden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass der First-Pass-Effekt in der Leber bei Mensch und Nager unterschiedlich ausgeprägt ist. Sinnvoll wäre es daher, die pulmonale oder andersgeartete Verabreichung von Cannabidiol unter Umgehung des First-Pass-Effektes zu testen. In Humanstudien mit pulmonal verabreichten Δ^9-THC wurde eine im Vergleich zur oralen Administration deutlich höhere Bioverfügbarkeit nachgewiesen (Hazekamp et al., 2006; Naef et al., 2004). Vorstellbar ist jedoch auch, dass Cannabidiol in Mensch und Ratte *per se,* also unabhängig von der Verabreichung, unterschiedlich im Rahmen der bekannten zweigipfligen Kinetik (eigene unveröffentlichte Ergebnisse) umverteilt oder metabolisiert wird. Weitere Studien sind notwendig, um dies zu klären. Hier wird, wie oben bereits erläutert, deutlich, dass Tierstudien zur Vorhersage humaner Wirkungen sehr sorgfältig translatiert sein müssen.

Während Cannabidiol die zelluläre Wiederaufnahme von Anandamid zu hemmen scheint, wodurch es zu einer Erhöhung von Anandamid im synaptischen Spalt kommen kann (Bisogno et al., 2001), wird auch diskutiert, dass Cannabidiol indirekt die Endocannabinoidsynthese steigern kann. In hippocampalen Zellkulturen von Ratten führte es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, der in Anwesenheit von Anandamid und 2-AG geringer war. Folglich könnten durch den Ca^{2+}-Anstieg Anandamid und 2-AG zunächst vermehrt synthetisiert werden und damit die Cannabidiolwirkung wiederum negativ modulieren (Ryan et al., 2007). Das heißt, die Messung der Eicosanoidspiegel erlaubt nur begrenzte Rückschlüsse über die Lokalisation des Effektes (z.B. extra- versus intrasynaptisch), da nur die

Gesamtänderung im Gewebe/Serum gemessen wird. Somit könnte Cannabidiol auch in geringerer Konzentration, wie sie in dieser Studie im Gehirn gefunden wurde, über andere Mechanismen wirken. Falls diese Wirkmechanismen existieren, beeinflussen sie aber offensichtlich nicht die Eicosanoidkonzentrationen.

In dieser Untersuchung wurde darüber hinaus der Δ^9-THC-Spiegel in den verschiedenen Geweben bzw. Serum genauer betrachtet. Sowohl bei der Analyse der Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC als auch von Cannabidiol bestand das Problem darin, dass im Serum, im Gehirn und in der Leber mehrerer Versuchstiere kein Δ^9-THC bzw. Cannabidiol nachweisbar war, so dass diese aus der Analyse ausgeschlossen werden mussten. Die Versuchstierzahl pro Gruppe verkleinert sich dadurch (n = 6 – 8). Ein Grund könnte in der i. p. Injektion liegen, die laut Literatur eine Fehlerquote von 10 – 20 % aufweist (Gaines Das und North, 2007).

Im Serum und im Gehirn zeigte die Analyse der Δ^9-THC-Spiegel eine retardierte Anflutung des Δ^9-THC im öligen Lösungsmittel. Während die Δ^9-THC-Konzentrationen im wässrigen Solvens zu beiden Zeitpunkten ähnlich hoch waren, war der Δ^9-THC-Spiegel bei Gabe im Sesamöl nach 2 h deutlich höher als nach 15 min. Somit wurden bei der Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels bereits nach 15 min Maximalspiegel im Serum bzw. Gehirn erreicht. Literaturangaben bestätigen diese Ergebnisse (Tseng et al., 2004).

Δ^9-THC wird vorwiegend in der Leber abgebaut (Agurell et al., 1986). Obwohl keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten, entstand der Eindruck, dass bei Verwendung eines wässrigen Solvens die Δ^9-THC-Konzentration 2 h nach Injektion geringer war als 15 min nach Injektion. Im Gegensatz dazu schien der Δ^9-THC-Spiegel 2 h nach Injektion höher zu sein, wenn die Verabreichung im öligen Lösungsmittel erfolgte. Letzteres spiegelt vermutlich zumindest tendenziell die retardierte Wirkung des Δ^9-THC im öligen Solvens wider. Das ölige Lösungsmittel scheint dabei zwar über eine verzögerte, aber insgesamt bessere Resorption und letztlich Bioverfügbarkeit zu verfügen. Möglicherweise ließe sich der Zusammenhang durch eine Vergrößerung der Stichprobe deutlicher zeigen, da die Standardabweichungen in der vorliegenden Studie recht hoch waren.

In diesem Zusammenhang sollten auch die Effekte von Cannabidiol, Δ^9-THC und URB 597 auf das Verhalten im Rattenmodell diskutiert werden. Dies wurde in einer anderen Arbeit unserer Forschungsgruppe untersucht (Rohleder, 2012). Hier spiegelte sich auch die unterschiedliche Kinetik in Abhängigkeit vom Lösungsmittel wider. Die Tiere, bei denen die arzneimittelnahe, ölige Δ^9-THC-Formulierung verwendet wurde, wiesen keine Verhaltensveränderungen auf. Im Gegensatz dazu führte die Administration von Δ^9-THC in wässriger Lösung zu einer starken Sedierung der Ratten,

die sich unter anderem in einer verlangsamten Motorik bemerkbar machte. Da die Δ^9-THC-Konzentration im Gehirngewebe nach 2 h bei Verwendung des öligen Lösungsmittels im Vergleich zum wässrigen Solvens tendenziell höher lag, kann der Unterschied auf das Verhalten der Tiere nicht darauf zurückgeführt werden, dass durch Verwendung von Sesamöl weniger Δ^9-THC in das Gehirn gelangt. Vielmehr scheint für die Wirkung von Δ^9-THC eine schnelle Kinetik notwendig zu sein. Der durch das Sesamöl bewirkte langsame Anstieg der Δ^9-THC-Spiegel scheint einen Toleranzeffekt auszulösen, der zu einer abgeschwächten Wirkung im Vergleich zum wässrigen Lösungsmittel führt. Dies könnte beispielsweise wie in 1.3.3 erläutert eine verminderte CB_1-Rezeptorverfügbarkeit an der Zelloberfläche durch Rezeptorinternalisierung zur Folge haben. Bedingt durch die verzögerte Freigabe aus dem öligen Lösungsmittel gelangt zwar kontinuierlich Δ^9-THC an den CB_1-Rezeptor, allerdings ist die Δ^9-THC-Konzentration in der Anflutungsphase nicht so hoch. Im Gegensatz dazu werden bei Verwendung des wässrigen Solvens schnell hohe Δ^9-THC-Spiegel am Rezeptor erreicht, so dass möglicherweise aufgrund der schnelleren Kinetik keine Desensitivierungsmechanismen wie beispielsweise die oben erwähnte Rezeptor-internalisierung in der Zelle aktiviert werden können. Dies resultiert dann vermutlich darin, dass nach Δ^9-THC-Gabe im öligen Solvens phänotypisch keine Veränderung im Vergleich zum Vehikel beobachtet werden kann, während die Δ^9-THC-Behandlung im wässrigen Lösungsmittel zu oben beschriebenen Verhaltenseffekten in den Ratten führt.

Im Vergleich zu Δ^9-THC zeigte sich für Cannabidiol im Serum sowie im Gehirn- und Lebergewebe eine vergleichbare Bioverfügbarkeit in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, was auf die große, strukturelle Ähnlichkeit der beiden Substanzen zurückzuführen ist (Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt). Die Ergebnisse der Leberanalyse deuten somit darauf hin, dass Δ^9-THC und Cannabidiol auf gleiche Art metabolisiert werden, bevor sie in das Gehirn gelangen, was in der Literatur auch so beschrieben wird (Agurell et al., 1986). Im Gegensatz zur abgeschwächten Wirkung des Δ^9-THC durch das ölige Lösungsmittel ist nicht davon auszugehen, dass das auch für Cannabidiol der Fall ist. Wie oben beschriebenen dürfte eine langsame Anflutung der Cannabidiolspiegel keinen Einfluss auf die FAAH-Inhibition haben, da die Wirkung von URB 597 in beiden Lösungsmitteln vergleichbar war. Der Organismus scheint somit die Rezeptorverfügbarkeit der CB_1-Rezeptoren anzupassen, während die Verfügbarkeit der FAAH-Enzyme unverändert bleibt.

Die durch das ölige Lösungsmittel bedingte Adaption der CB_1-Rezeptorverfügbarkeit scheint sich in den Eicosanoidmessungen widerzuspiegeln. Während Δ^9-THC vor allem im wässrigen Lösungsmittel zu Konzentrationsänderungen von Anandamid,

OEA, PEA und 2-AG führte, wurden im öligen Lösungsmittel dagegen kaum Effekte beobachtet. Sowohl im Gehirngewebe als auch im Serum war die PEA-Konzentration 2 h nach Gabe von Δ^9-THC im wässrigen Solvens im Vergleich zur Vehikelgruppe erhöht. Lediglich im Serum wurde auch bei Gabe im öligen Lösungsmittel ein erhöhter PEA-Spiegel beobachtet. Die gefundenen höheren PEA-Serumkonzentrationen nach Δ^9-THC-Behandlung entsprechen den Ergebnissen von Walter *et al.* (2013). In der zitierten Studie wurden nach einmaliger Gabe von Δ^9-THC (0,3 mg/kg) im humanen Serum höhere Konzentrationen von Anan-damid, 2-AG, OEA und PEA im Vergleich zur Placebogruppe gefunden. Diese Befunde konnten im Rattenserum nach WIN 55,212-Gabe bestätigt werden. Walter *et. al* (2013) führten die erhöhten Analytspiegel nach Δ^9-THC-Gabe mit einer gesteigerten Ausschüttung von Endocannabinoiden und verwandten Fettsäureethanolamiden aus peripherem Muskel- und Fettgewebe zurück. In der zitierten Studie konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der Analyte (Anandamid, 2-AG, OEA und PEA) mit der Zeit stetig abnahmen (Humanstudie: 2-3 h, tierexperimentelle Studie: 1-6 h). Dass eine zeitliche Abnahme der Analytspiegel im Serum in unserer Studie nicht beobachtet wurde, könnte mit dem unterschiedlichen Studiendesign zusammenhängen. Walter *et al.* (2013) bestimmten die Analytkonzentrationen mehrmals im gleichen Subjekt und zwar vor der Gabe und 2 h und 3 h (Humanstudie) bzw. 1 h und 6 h (Tierstudie) nach Δ^9-THC- oder WIN 55,212-Behandlung, während in unserer Studie Finalversuche gemacht wurden. Hinzu kommt, dass die Δ^9-THC-Dosierung in unserer Studie deutlich höher (5 mg/kg vs. 0,3 mg/kg) als in der zitierten Studie von Walter et al. war. In einer kürzlich veröffentlichten Humanstudie von Muhl *et al.* (2014) waren die Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen im Serum von Probanden mit höherfrequentem Cannabiskonsum im Vergleich zu Kontrollen mit keinem oder geringen Konsum erhöht, was die Ergebnisse von Walter *et al.* (2013) im Akutversuch bestätigt. Da neben Anandamid auch die OEA- und PEA-Spiegel höher waren, wurde postuliert, dass dies an einer Verringerung der FAAH-Enzymkonzentration liegen könnte. Eine Verminderung des FAAH-Proteins durch Δ^9-THC wurde auch von El Gohary *et al* (2004) beobachtet, die Probanden mit 6-36 monatigem Cannabiskonsum untersuchten. Es stellt sich die Frage, ob bereits eine akute Gabe von Δ^9-THC, wie in der vorliegenden Arbeit, zu einer Erniedrigung der FAAH-Konzentration führen könnte. Möglich wäre auch eine durch Δ^9-THC vermittelte Hemmung der N-Acylethanolaminsäure-Amidase (NAAA) mit höchster Affinität für PEA, die zur Steigerung der PEA-Spiegel führen würde (siehe 1.2.3.1). Bereits in anderen Studien wurde vermutet, dass Enzyme durch Cannabidieide beeinflusst werden können (Walter et al., 2013). Eine Studie von Ruhaak et al. (2011) zeigt, dass Cannabinoide wie

Δ^9-THC COX-Enzyme *in vitro* hemmen, die unter anderem Anandamid und 2-AG abbauen können (siehe 1.2.3). Darüber hinaus wurde kein Effekt von Δ^9-THC auf Anandamid und 2-AG im Gehirn unabhängig vom Lösungsmittel gefunden. Allerdings wies 2-AG im Serum nach Δ^9-THC-Gabe im wässrigen Lösungsmittel nach 15 min Wirkdauer einen reduzierten Spiegel auf, der sich aber nach 2 h wieder normalisierte und nicht mehr vom Vehikel differierte. Auch für Δ^9-THC in öliger Lösung schien es die Tendenz zu geben, die 2-AG-Serumkonzentrationen zu erniedrigen. Δ^9-THC im wässrigen Solvens erreichte schon nach 15 min Maximalspiegel im Serum, die vermutlich zur beschriebenen Verminderung von 2-AG führten. Im öligen Solvens hingegen kann es sein, dass entweder durch die retardierte Freisetzung noch keine ausreichende Menge von Δ^9-THC im Blut vorhanden war, um einen signifikanten Effekt zu erzeugen oder die Wirkung durch die langsamere Anflutung abgeschwächt wurde. Allerdings fanden Walter *et al.* (2013) eine Abnahme der Analytkonzentrationen nach Δ^9-THC-Gabe, wie oben erwähnt, zu späteren Zeitpunkten (1 h und 6 h bzw. 2 h und 3 h), was der Theorie widerspricht, dass schon nach 15 min maximale Effekte erreicht werden können. Eine Erklärung könnte sein, dass die Δ^9-THC-Wirkung auf die Eicosanoide U-förmig verläuft. Das heißt, dass nach 15 min bereits ein früher Effekt beobachtet werden kann und dann zu einem späteren Zeitpunkt ein weiterer Effekt. Allerdings müsste davon ausgegangen werden, dass den Effekten verschiedene Wirkmechanismen zugrunde liegen. Der Grund für die Erniedrigung von 2-AG im Serum ist unklar und bisher sind diesbezüglich keine Studien in der Literatur zu finden.

Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit fanden Walter *et al.* (2013) 6 h nach akuter Gabe von WIN 55,212, einem synthetischem Cannabinoid-Agonisten (siehe 1.2.1), für alle Analyte (Anandamid, 2-AG, OEA, PEA) eine Konzentrationsabnahme in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte und beschrieben dies für die Endocannabinoide Anandamid und 2-AG als negativen Rückkopplungsmechanismus. Da WIN 55,212 mit Anandamid bzw. 2-AG um die Bindung an den CB-Rezeptoren konkurriert, kann dies zu adaptiven Veränderungen der Endocannabinoidsignalkaskade und zu einer damit verbundenen rezeptorvermittelten Verminderung der Endocannabinoidfreisetzung im Gehirn führen. Δ^9-THC verhindert beispielsweise als natürlich vorkommender Cannabinoid-Agonist nach einmaliger Gabe in hippocampalen Neuronenkulturen von Ratten die Endocannabinoid vermittelte Signaltransduktion (Kelley und Thayer, 2004). In einer *in vivo* Studie von Mato *et al.* (2004) in Mäusen wurde ebenfalls durch einmalige Δ^9-THC-Administration die durch Endocannabinoide vermittelte synaptische Plastizität im Nucleus accumbens und Hippocampus inhibiert. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der OEA- und PEA-Spiegel sahen Walter *et al.* (2013) im Einfluss von WIN 55,212 auf Enzyme, die die Bildung bzw. den Abbau

von OEA bzw. PEA katalysieren. Da in unserer Studie bereits nach 2 h die Organentnahme erfolgte, sind die Ergebnisse nicht unmittelbar vergleichbar. Ob die Abnahme des Analytenspiegels so langsam erfolgt, dass noch nicht 2 h aber 6 h nach Cannabinoid-Agonist-Gabe wie in der Studie von Walter *et al.* (2013) eine Veränderung messbar ist, könnte, in weiteren Studien überprüft werden. Allerdings ist zu beachten, dass das Wirkungsprofil von WIN 55,212 und Δ^9-THC zwar Ähnlichkeiten aufweist, aber nicht identisch ist, was einen Vergleich der beiden Studien zusätzlich erschwert. Während der volle Agonist WIN 55212-2 mit hoher Affinität an den CB_1- und sogar siebenmal stärker an den CB_2-Rezeptor bindet (Showalter et al., 1996), wirkt Δ^9-THC an beiden CB-Rezeptoren als partieller Agonist (siehe 1.2.1).

Es gibt bisher nur wenige Studien, die sich, wie die vorliegende Arbeit, mit dem akuten Einfluss von Δ^9-THC auf das Endocannabinoidsystem beschäftigen. Weitaus mehr wissenschaftliche Arbeiten existieren zur chronischen Δ^9-THC-Wirkung im Gehirn. So zeigte eine Studie in Ratten spezifisch für unterschiedliche Gehirnregion Differenzen in den Endocannabinoidkonzentrationen (Di Marzo et al., 2000). Die Anandamid-konzentration im limbischen Vorderhirn war nach Δ^9-THC-Gabe vierfach höher als bei den Kontrolltieren, während für Anandamid und 2-AG im Striatum genau der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. Gleichzeitig kam es zu einer Herunterregulierung der CB_1-Rezeptorverfügbarkeit, die auch in anderen Studien nach chronischer Δ^9-THC-Gabe selektiv für einzelne Hirnregionen (u.a. präfrontaler Kortex, Hippocampus, Kleinhirn, Basalganglien, Mittelhirn) beobachtet wurde (Breivogel et al., 1999; Rodriguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1995; Romero et al., 1997; Romero et al., 1998; Sim-Selley und Martin, 2002). Chronische Δ^9-THC-Gabe scheint zu einer verminderten Signalübertragung des Endocannabinoidsystems auf Rezeptor-ebene zu führen. Doch auch endogene Liganden des Endocannabinoidsystems scheinen durch eine chronische Δ^9-THC-Administration beeinflusst zu werden. In einer Humanstudie fanden Morgan *et al.* (2013) in CSF von Probanden mit starkem Cannabisgebrauch im Vergleich zu Konsumenten mit deutlich geringerem Konsum niedrigere Anandamidspiegel. Die Herunterregulierung des Endocannabinoidsystems nach starkem Konsum passt zu der oben erwähnten möglichen Abnahme der Rezeptorverfügbarkeit. In einer früheren Humanstudie unserer Arbeitsgruppe wurden CSF und Serum von Schizophreniepatienten mit unterschiedlichem Cannabisgebrauch untersucht (Leweke et al., 2007). In CSF von Erkrankten mit niedrigem Konsum fanden sich 10 fach höhere Anandamidkonzentrationen im Vergleich zu Schizophreniepa-tienten mit höher frequentem Cannabiskonsum sowie zu gesunden Probanden mit niedrigem oder hohem Cannabiskonsum. Diese Studie weist daraufhin, dass frequenter Cannabisgebrauch bei Schizophreniepatienten entweder die Hochregulation

des adaptiven Anandamidsignalsystems vermindert oder eine primäre Störung dieser Funktion mit dem vermehrten Konsum exogener Cannabinoide möglicherweise im Sinne eines Kompensationsversuchs zu verstehen ist. Interessanter- und folgerichtigerweise zeigt sich dieser Effekt bei gesunden Probanden mit hohem Cannabiskonsum nicht. Eine Verminderung der Endocannabinoide, die in den genannten Studien in humanem CSF beobachtet wurde, fanden Walter *et al*. (2013) wie oben erwähnt auch in Gehirnarealen von Ratten nach akuter WIN-55,212-Behandlung. Ungeklärt ist jedoch noch, ob es auch auf der Rezeptorebene bei einmaliger Gabe zu einer Herunterregulierung der CB_1-Rezeptorverfügbarkeit wie nach chronischer Δ^9-THC-Administration (siehe oben) kommt. Die zusätzliche Analyse der CB_1-Rezeptorverfügbarkeit nach akuter Δ^9-THC-Gabe wäre auch im Hinblick auf tierexperimentelle und klinische Studien interessant, vor allem, weil eine bessere Vergleichbarkeit gegeben wäre, als es mit WIN-55,212 der Fall ist.

In der Leber wurde nach Δ^9-THC-Injektion im wässrigen Lösungsmittel nach 2 h ein erhöhter Anandamidspiegel gemessen. Interessanterweise wurde gleichzeitig, wie oben beschrieben, ein verringerter Δ^9-THC-Spiegel beobachtet. Wie bereits erläutert, wird Δ^9-THC in der Leber hauptsächlich durch Cytochrom P-450 Enzyme metabolisiert. Da die Abnahme der Δ^9-THC-Konzentration vermutlich zum zeitgleichen Anstieg der Anandamidspiegel geführt hat, könnte ein Zusammenhang bestehen. Möglich wäre, dass der enzymatische Abbau von Δ^9-THC als präferiertes Substrat den Abbau von Anandamid, das auch über Cytochrom P-450 Enzyme degradiert werden kann (Zelasko et al., 2015), hemmt, so dass es zu der beobachteten AEA Akkumulation kommt. Für OEA und PEA wurde hingegen dieser Anstieg im wässrigen Lösungsmittel nur beobachtet, wenn bereits 15 min nach Injektion die Leber entnommen wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Δ^9-THC in einem bestimmten Konzentrationsbereich, der nach 15 min Wirkdauer erreicht zu sein scheint, Enzyme aktiviert, die OEA bzw. PEA bilden bzw. deren Abbau in der Leber verhindern. Die Δ^9-THC-Behandlung in öliger Lösung zeigte in der Leber hingegen keinen Effekt auf die untersuchten Eicosanoide. Walter *et al.* (2013) fanden keine Unterschiede der Eicosanoidkonzentrationen im Lebergewebe, allerdings verwendeten sie wie bereits erwähnt, statt Δ^9-THC WIN 55,212. Die Diskrepanz in den Ergebnissen mit unserer Studie könnte auch durch die unterschiedlich gewählte Δ^9-THC-Wirkdauer (2 h vs. 6 h) bedingt sein.

Neben den Effekten verschiedener Substanzen auf die Eicosanoide wurde in der vorliegenden Arbeit auch betrachtet, ob ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Endocannabinoiden und verwandten Fettsäureethanolamiden im Serum und Gehirn besteht, der aber nicht festgestellt werden konnte. Das bedeutet, dass die

Fettsäureethanolamide in der Peripherie nicht deren Aktivität im Gehirn reflektierten. In der Studie von Giuffrida *et al.* (2004) wurden ähnliche Beobachtungen im Bezug auf das Endocannabinoid Anandamid gemacht: In dieser Humanstudie wiesen unbehandelte, erstmanifeste paranoid Schizophrene eine Erhöhung der Anandamidspiegel in CSF auf, während im Serum keine Veränderungen festgestellt wurden (siehe 1.3.3). Die Korrelationsanalysen zeigten für die gesunden Kontrollen sowie für alle Patientengruppen keinen Zusammenhang zwischen der Anandamidkonzentration im Serum und dem Anandamidspiegel im Gehirn. Ebenso zeigten sich in CSF von Probanden mit hohem Cannabisgebrauch geringere Anandamidspiegel als bei Konsumenten mit niedrigem Gebrauch während im Serum keine Konzentrationsunterschiede gemessen wurden (Morgan et al., 2013). Auch bei den weiteren Behandlungsgruppen und gesunden Kontrollen der Studie konnten keine Korrelationen zwischen den CSF- und Serum-Anandamidspiegeln beobachtet werden. Es gibt allerdings auch Studien, die von einem Zusammenhang zwischen Endocannabinoidspiegeln im Serum und Gehirn berichten (vgl. Review Hillard et al., 2012). So wird angenommen, dass Endocannabinoide als Stressantwort aus dem Gehirn und aus Immunzellen in die Blutzirkulation gelangen. Der Endocannabinoidtonus im Serum würde demzufolge den Endocannabinoidspiegel im Gehirn reflektieren. Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen Blut- und CSF-/Gehirn-Endocannabinoidspiegeln jedoch bislang nicht gut verstanden und die Bedingungen, unter denen eine Korrelation zu finden ist bzw. nicht beobachtet werden kann, sind derzeit unklar. In diesem Kontext sind die grundlegenden Funktionen der Blut-Hirn- bzw. Blut-CSF-Schranke im Hinblick auf das Endocannabinoidsystem bislang nicht untersucht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass URB 597 seine bekannte Wirkung als FAAH-Inhibitor im Gehirn- und Lebergewebe entfaltet, während für Cannabidiol kein signifikanter Effekt auf die Anandamid-, OEA- und PEA-Spiegel gezeigt werden konnte. Wie erläutert scheint hier die geringe Dosierung ausschlaggebend gewesen zu sein. Interessanterweise wurden im Serum keine erhöhten Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen nach URB 597-Behandlung gefunden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass URB 597, wie in einer *in vitro* Studie beobachtet (Vacondio et al., 2009), durch Serumhydrolasen nach 2 h Wirkdauer soweit abgebaut wird, dass es FAAH im Serum nicht mehr ausreichend inhibieren kann. In der Leber und im Gehirn als lipophilere Kompartimente besitzt URB 597 hingegen längere Halbwertzeiten (Piomelli et al., 2006; Vacondio et al., 2009), was folglich zu einer längeren Wirkung zu führen scheint. Bei detaillierter Analyse der einzelnen Gehirnregionen wurde überraschenderweise weder im Hippocampus noch im präfrontalen Kortex eine

Erhöhung der Anandamidspiegel nach URB 597-Behandlung gefunden, während es einen deutlichen Anstieg der OEA- und PEA-Konzentrationen gab. Ein möglicher Grund könnte sein, dass Anandamid in diesen Regionen neben FAAH vermehrt über andere Enzyme wie bspw. COX-2 abgebaut wird, so dass eventuell die Spiegel durch FAAH-Blockade nicht signifikant ansteigen könnten. Auffällig sind die Anandamidkonzentrationen im Hippocampus und im präfrontalen Kortex, die im Vergleich zu den restlichen Gehirnregionen besonders hoch sind. Es könnte spekuliert werden, dass durch URB 597-Gabe die Spiegel nicht noch mehr erhöht werden können, da möglicherweise durch einen noch unbekannten Rückkopplungsmechanismus die Anandamidsynthese in einem vergleichbarem Maße abnimmt wie der Abbau durch FAAH-Hemmung verzögert wird.

Die einmalige Gabe von Δ^9-THC beeinflusste die Endocannabinoide und verwandten Analyte, wobei vor allem PEA signifikante Unterschiede aufzeigte. Die in der Studie von Walter *et al.* (2013) ermittelten Ergebnisse, die eine Erhöhung der humanen Anandamid-, OEA-, PEA- und 2-AG-Serumspiegel nach akuter Δ^9-THC-Administration zeigten, konnten nur für PEA bestätigt werden. Es wurde im Gegenteil im Serum eine Erniedrigung der 2-AG-Konzentration gefunden. Eine Abnahme der Fettsäureethanolamidkonzentrationen im Rattengehirn (Walter et al., 2013) nach Δ^9-THC bzw. WIN 55,212 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden. Es ist in diesem Zusammenhang nicht geklärt, ob Δ^9-THC neben der bekannten Wirkung auf die CB-Rezeptoren auch auf Enzyme und andere Komponenten des Endocannabinoidsystems einen Effekt hat und dadurch beispielsweise den PEA-Spiegel beeinflusst (Piomelli, 2004). Zu den bekannten Δ^9-THC-Wirkungseffekten zählen möglicherweise adaptive Veränderungen des Endocannabinoidsystems. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, scheint die Pharmakokinetik bei der Wirkungsweise von Δ^9-THC eine entscheidende Rolle zu spielen: beim Vergleich der Lösungsmittel machte sich die langsame Anflutung des Δ^9-THC aus dem Sesamöl vor allem bemerkbar, wenn die Δ^9-THC-Gabe nur 15 min vor der Blut- bzw. Gewebsentnahme erfolgte. Auch die Unterschiede der Fettsäureethanolamidspiegel wurden vorwiegend bei Verwendung von Δ^9-THC im wässrigen Lösungsmittel gemessen, was zu den Bioverfügbarkeitsdaten passt.

Die für jedes Fettsäureethanolamid spezifischen Verteilungsmuster in den untersuchten Gehirnarealen verdeutlichen die Komplexität des Endocannabinoidsystems. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Anandamid die höchsten Spiegel im Hippocampus und präfrontalen Kortex aufwies. In beiden Arealen ist die CB_1-Rezeptor-Dichte besonders hoch. Die höchsten Konzentrationen für OEA und PEA wurden im Mittelhirn und Thalamus gefunden. In diesen Gehirnarealen

kommt auch der PPAR-α-Rezeptor, Zielstruktur beider Fettsäureethanolamide, vermehrt vor. Eine Korrelation zwischen den untersuchten Analyten (AEA, OEA, PEA und 2-AG) im Gehirn und im Serum gab es nicht, so dass die zirkulierenden Eicosanoide nicht die Gehirnaktivität reflektieren.

Insgesamt müssen allerdings folgende Einschränkungen in der Interpretation der vorliegenden tierexperimentellen Studie berücksichtigt werden. Zum einen ist die Datenvarianz eher hoch, was unter anderem wahrscheinlich auf die etwas geringe Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe zurückzuführen ist. Eine große Streuung der Daten bzg. der Δ^9-THC-Konzentrationen wurde zum Beispiel bei öliger i.p. Injektion nach 2 h sowohl im Gehirn als auch in der Leber beobachtet. Unterschiedliche Δ^9-THC-Spiegel könnten zu einer differenten Wirkung auf die Endocannabinoide führen. Doch auch die Endocannabinoidkonzentrationen weisen unabhängig von der Versuchsgruppe eher hohe Standardabweichungen auf, so dass auch hier das Problem der Datenvarianz besteht. Zum anderen besitzt die gewählte Applikationsroute, die i.p. Injektion, wie oben beschrieben, eine relative hohe Fehlerquote von 10-20 %, was auch die Streuung der Daten beeinflussen könnte. Bei den in der tierexperimentellen Studie durchgeführten Finalversuchen können interindividuelle Schwankungen nicht ausgeschlossen werden.

11 Abschließende allgemeine Diskussion

Das in den vergangenen Jahren rasant gestiegene wissenschaftliche Interesse an der Physiologie und Pathophysiologie des Endocannabinoidsystems hat zur umfassenden Erforschung seiner Komponenten, der Rezeptoren, der endogenen Liganden sowie ihrer synthetisierenden und abbauenden Enzyme geführt. Es zeigt sich immer deutlicher, dass das Endocannabinoidsystem eine zentrale Funktion in der Wiederherstellung des Körpergleichgewichts auf ganz verschiedenen Ebenen einnimmt und in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert ist (Maccarrone et al., 2010; Mechoulam und Parker, 2013; Schusdziarra, 2006). Um seine Wirkung bei pathophysiologischen Vorgängen, insbesondere bei psychiatrischen Erkrankungen, verstehen zu können, ist die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende valide Bestimmung der Endocannabinoide im Gewebe sowie in Körperflüssigkeiten von besonderer Bedeutung.

Die Basis zur robusten Bestimmung der beschriebenen Cannabinoide sowie der Endocannabinoide in Gewebeproben bildet die in der vorliegenden Arbeit neu entwickelte Methode, mit der es, im Vergleich zu bisher existierenden Methoden, zum ersten Mal gelungen ist, simultan alle Substanzen valide zu messen. Neben der hohen Sensitivität ist der entscheidende Vorteil des LC-MS/MS-Verfahrens gegenüber bestehenden Methoden somit, dass in einem Messvorgang die sich chemisch ähnlichen Analyten zusammen bestimmt werden anstatt in separaten Methoden. Dies spart Zeit und Probenmaterial. Mit Hilfe des neuen Messverfahrens wurde es möglich, neue Erkenntnisse über die Wirkweise der Cannabinoide sowie des FAAH-Inhibitors URB 597 auf die Endocannabinoide und ihre verwandten Fettsäureethanolamide in verschiedenen Kompartimenten zu erlangen. Hiermit wird eine solide Grundlage für künftige Studien geboten, die zur Aufklärung der Rolle des Endocannabinoidsystems im menschlichen Körper durchgeführt werden sollen. Eine Möglichkeit der Verbesserung der hier etablierten Methode besteht in der Nutzung einer UPLC anstatt der herkömmlichen HPLC, was eine weitere Verkürzung der Messdauer zur Folge hat (Churchwell et al., 2005). Zudem kann bei der Aufbereitung der Proben, die, wie bereits erwähnt, sehr essentiell ist, durch Verwendung von anderen Lösungsmitteln die Ausbeute der Analyte möglicherweise optimiert werden (Zoerner et al., 2011). Allerdings sind Veränderungen in diesem Bereich kritisch, da beobachtet werden konnte, dass die internen deuterierten Standards dabei in Mitleidenschaft gezogen werden können und dadurch eine falsche Quantifizierung möglich ist (Giuffrida, persönliche Mitteilung). Hervorzuheben ist, dass die bestehende Aufbereitung der Proben für den Einsatz von Laborrobotern geeignet und damit auch bei größeren Probenzahlen einsetzbar ist. Eine wissenschaftlich sinnvolle Weiterentwicklung der

Methode liegt sicherlich in einer QTof basierten lipidomischen Profilanalyse und der Identifikation von Vor-, Zwischen- und Abbaustufen der jeweiligen Fettsäureethanolamide, um Störungen der Synthese- bzw. Abbauwege dieser Moleküle zu untersuchen und durch die entsprechenden Pfadanalysen eventuell den Ursachen der veränderten Fettsäureethanolamidkonzentrationen auf die Spur zu kommen. Aus diesem methodischen Zugang könnte die Verfeinerung der hier vorgestellten Methode durch Ausweitung der zu untersuchenden Analyten im Sinne eines „targeted lipidomic" Zugangs entwickelt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Erhöhung der Anandamid- und PEA-Spiegel im Plasma monozygoter Zwillingspaare, die für Schizophrenie diskordant waren, gefunden. Da sowohl im kranken als auch im gesunden Zwilling die Veränderung nachgewiesen wurde, liefert diese Ko-Zwilling Kontrollstudie zum ersten Mal den deutlichen Hinweis, dass die hier untersuchten Messgrößen, die Plasmakonzentrationen der Endocannabinoide und verwandter Fettsäureethanolamide, genetisch beeinflusst werden. Die veränderte Signalwirkung der endogenen Liganden des Endocannabinoidsystems, die auch schon in früheren Studien bei Schizophreniepatienten entdeckt wurde (Giuffrida et al., 2004; Koethe et al., 2009a; Leweke et al., 1999a), könnte für einen neuen intermediären Phänotyp für Schizophrenie stehen.

Besonders erwähnenswert ist, dass für die vorliegende Arbeit dieses exklusive Probenmaterial zur Verfügung stand. Die Rekrutierung der Probanden stellte dabei sicherlich eine große Herausforderung dar, da die Güte der Patienten- und Probandenauswahl einen großen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Dieser Faktor wird in vielen insbesondere humanen Arbeiten, die sich in der Literatur finden lassen, nicht hinreichend berücksichtigt, obwohl er gerade bei den multifaktoriellen psychiatrischen Erkrankungen von besonderer Bedeutung ist.

Eine Beeinflussung des Endocannabinoidsystems kann möglicherweise eine neue Behandlungsstrategie für Schizophrenie darstellen. Deren Auswahl muss aufgrund der Komplexität des Systems jedoch durchdacht und gezielt erfolgen, da Substanzen, die agonistisch bzw. antagonistisch an den zentralen CB_1-Rezeptoren wirken, ein hohes Nebenwirkungs- und Abhängigkeitspotential aufweisen können (Schusdziarra, 2006). Eine alternative, pharmakologische Strategie stellt die Beeinflussung der Enzyme dar, die die Endocannabinoide synthetisieren bzw. abbauen (siehe 1.2.3.3). Diese Methode besitzt den Vorteil, dass nur in Regionen, in denen das Enzym vorkommt, die Endocannabinoidspiegel verändert werden, während CB_1-Rezeptor-Agonisten bzw. Antagonisten gleichzeitig in allen Bereichen mit Rezeptoren wirken. Somit ist die Feinabstimmung wesentlich besser. In der vorliegenden Arbeit wurde das

Phytocannabinoid Cannabidiol als potentieller Kandidat, der auf diese Weise in den Endocannabinoid-Stoffwechsel eingreift (Bisogno et al., 2001; Leweke et al., 2012b), näher betrachtet. Die in präparierten Rattenhirnmembranen gemessene FAAH Enzymblockade durch Cannabidiol, die zu einer Erhöhung der Anan-damid-, OEA- und PEA-Spiegel führte, konnte allerdings *in vivo* in Ratten nicht bestätigt werden, was wahrscheinlich mit einer zu geringen Dosierung begründet werden kann. Obwohl die Dosis an eine durchgeführte, klinische Humanstudie angepasst war (Leweke et al., 2012b), wurden im Gehirn die für eine FAAH-Inhibition notwendigen Cannabidiol-Spiegel nicht erreicht. Neben der Effekte auf die Eicosanoide scheint Cannabidiol in vergleichbarer Dosierung auch andere Rezeptorsysteme wie beispielsweise ddie Serotonin-5-HT_{1A}-Rezeptor oder den humanen Vanilloid-Rezeptor (TRPV1; vgl. Review (Fernandez-Ruiz et al., 2013) zu beeinflussen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Mechanismen zusätzlich zur Wirkung beitragen.

Die akute Wirkung des Phytocannabinoids Δ^9-THC auf das Endocannabinoidsystem ist bislang nicht ausreichend erforscht, so dass die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einen wichtigen Beitrag leisten. Δ^9-THC führte nach akuter Gabe in Ratten zu einer Erhöhung der PEA-Serumkonzentrationen. Für 2-AG wurde im Gegenteil nach 15 min eine Erniedrigung der Konzentration beobachtet, die sich allerdings nach 2 h wieder normalisierte. Bis dato existiert nur eine Studie von Walter et al. (2013), die allerdings nur eingeschränkt vergleichbar ist, da im tierexperimentellen Studienteil anstatt Δ^9-THC WIN 55,212 als CB-Rezeptoragonist verwendet wurde. Dort fand sich für Anandamid, OEA, PEA und 2-AG ein Anstieg der Serumspiegel. Im Gehirn konnte in unserer Studie nach einmaliger Δ^9-THC-Gabe im wässrigen Lösungsmittel interessanterweise eine Zunahme der PEA-Spiegel nach 2 h beobachtet werden, während in der vorher beschriebenen Studie (Walter et al., 2013) eine Abnahme der Eicosanoidspiegel nachgewiesen wurde.

Es ist immer noch unklar, ob Δ^9-THC neben der bekannten partiell agonistischen Wirkung an den CB-Rezeptoren noch mittels anderer Wirkmechanismen Komponenten des Endocannabinoidsystems beeinflussen kann. Auf die metabolisierenden Enzyme FAAH, DGL-α, MGL und NAAA scheint es *in vitro* keinen Effekt zu haben (De Petrocellis et al., 2011). Chronischer Δ^9-THC-Konsum hat laut El-Gohary und Eid (2004) allerdings einen Einfluss auf die FAAH-Konzentration im humanen Serum.

Der Faktor Lösungsmittel schien die Ergebnisse der vorliegenden tierexperimentellen Endocannabinoidstudie zu beeinflussen. Die Bioverfügbarkeit von Δ^9-THC im öligen Solvens war durch die retardierte Freisetzung geringer als im wässrigen Lösungsmittel, was sich auch in der Δ^9-THC-Wirkung auf die Eicosanoidspiegel widerspiegelte. Die verzögerte Δ^9-THC-Freisetzung aus dem öligen Lösungsmittel könnte zu einer

toleranzbedingten Veränderung an den CB_1-Rezeptoren führen, die sich bei den Verhaltensversuchen in einer abgeschwächten Wirkung zeigte (Rohleder, 2012).

Interessanterweise zeigte sich für jedes Fettsäureethanolamid ein unterschiedliches Verteilungsmuster in den einzelnen Gehirnregionen, was vermutlich auch mitunter auf den komplexen Wirkmechanismus des Endocannabinoidsystems zurückzuführen ist. Die beobachteten Effekte resultieren wahrscheinlich aus unterschiedlichen, lokalen CB-Rezeptordichten (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998), die die unterschiedlichen endogenen Ligandenspiegel bedingen. Darüber hinaus spielen möglicherweise auch die unterschiedlichen Neuronenpopulationen eine Rolle. Die Wirkung von URB 597 auf das FAAH Enzym unterschied sich ebenso in den einzelnen Gehirnregionen, wobei hier wahrscheinlich auch die unterschiedlichen Fettsäureethanolamid- und FAAH-Level von Bedeutung sind (Egertova et al., 2003; Wilson et al., 2011). Wenn in einem Gehirnareal geringere Fettsäureethanolamid- und FAAH-Konzentrationen vorkommen, sind im ungünstigsten Fall sehr geringe Veränderungen nicht eindeutig nachweisbar, weil die Methode ggf. nicht sensitiv genug ist. Zum anderen können in bestimmten Gehirnregionen andere Enzyme neben FAAH eine Rolle beim Abbau der Eicosanoide spielen und bei Anstieg der Anandamid-, OEA- und PEA-Konzentrationen stärker aktiv werden, so dass die FAAH-Inhibition durch URB 597 nicht zum erwarteten Anstieg der Fettsäureethanolamide führt (Kozak und Marnett, 2002; Rouzer und Marnett, 2008; Tsuboi et al., 2005).

Da sich keine Korrelationen zwischen den Fettsäureethanolamiden im Gehirn und Serum ergaben, liegt nahe, dass die mit der Gehirnaktivität verbundenen Spiegel von Anandamid, OEA, PEA und 2-AG in unserer tierexperimentellen Endocannabinoidstudie nicht mit der Aktivität im Serum unmittelbar verbunden sind. Letztere ist entweder von peripheren Prozessen dominiert oder überlagert, die das Endocannabinoidsystem und die verwandten Systeme involvieren. Bei gesunden Probanden erscheint es daher plausibel, dass kein direkter Zusammenhang der Fettsäureethanolamidkonzentrationen zwischen den verschiedenen Körperkompartimenten besteht (Giuffrida et al., 2004). Allerdings stellt sich die Frage, ob sich unter pathologischen Bedingungen wie z.B. bei einer länger bestehenden schizophrenen Erkrankung, zentrale Veränderungen in der Peripherie abbilden. So könnte die modifizierte Immunantwort, die im Verlauf verschiedener Schizophrenieformen beobachtet wird, bei den länger Erkrankten im Gegensatz zu erstmanifesten, kürzlich erkrankten Schizophrenen zu veränderten Serumspiegeln der Eicosanoide führen (De Marchi et al., 2003), die mit den Gehirnkonzentrationen zusammenhängen. Grund hierfür könnte eine entzündlich veränderte Blut-Hirn- bzw. Blut-CSF-Schranke sein (Bauer und Kornhuber, 1987; Bechter et al., 2010; Severance et al., 2015).

12 Zusammenfassung

Das Endocannabinoidsystem stellt ein komplexes, neuromodulatorisches Transmittersystem dar, das an verschiedenen, physiologischen Prozessen regulativ beteiligt ist. Es scheint eine wichtige, pathophysiologische Rolle bei Schizophrenie zu spielen. Dabei wird angenommen, dass das Endocannabinoidsystem als inhibitorischer Feedback-Mechanismus dient, der der Dysregulation verschiedener Neurotransmittersysteme bei akuten Psychosen entgegenwirkt und somit einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung schizophrener Erkrankungen besitzt.

Während das psychoaktive Δ^9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC), ein Hauptbestandteil von *Cannabis sativa*, als Risikofaktor für die Entwicklung einer Schizophrenie in vulnerablen Personen angesehen wird, scheint Cannabidiol (CBD), ebenso Hauptbestandteil der Cannabispflanze, über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus in klinischen Studien antipsychotisch zu wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich Veränderungen im Endocannabinoidsystem peripher sowohl im Plasma eines an Schizophrenie erkrankten Zwillings als auch im Plasma des gesunden Ko-Zwilling nachweisen lassen. Tatsächlich wurden bei beiden Zwillingen erhöhte Spiegel von Anandamid (AEA) und Palmitoylethanolamid (PEA) im Vergleich zu gesunden Zwillingspaaren festgestellt. Somit gibt diese Ko-Zwilling Kontrollstudie zum ersten Mal den deutlichen Hinweis, dass die Plasmakonzentrationen der Endocannabinoide sowie die verwandter Lipide genetisch beeinflusst werden. Die veränderten Endocannabinoidspiegel könnten für einen neuen intermediären Phänotyp für Schizophrenie stehen.

Die gewonnenen Daten unterstützen, dass die Beeinflussung des Endocannabinoidsystems einen möglichen Ansatzpunkt neuer Behandlungstrategien der Schizophrenie darstellt. In diesem Zusammenhang wurde in einem translationalen in vitro und in vivo Ansatz in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob Cannabidiol als potentielles Pharmakon einen Einfluss auf die Konzentrationen der Endocannabinoide und verwandten Fettsäureethanolamide besitzt und dadurch seine antipsychotische Wirkung erzielt.

Im Enzymassay blockierte Cannabidiol die FAAH-Hydrolyse in präparierten Rattenhirnmembranpräparaten. Um zu überprüfen, ob es diese Wirkung auch in vivo entfaltet, sollte eine neue, valide LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, um die Endocannabinoide Anandamid und 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG) und verwandten Lipide PEA und Oleoylethanolamid (OEA) sowie die Phytocannabinoide Δ^9-THC und Cannabidiol simultan im Rattengewebe bestimmen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es zum ersten Mal, ein Verfahren zu

etablieren, mit dem simultan alle sechs Analyte gemessen werden konnten. Die neue Methode führte zu einer enormen Reduzierung von benötigten Messzeiten und Probenmengen, was insbesondere für die tierexperiementellen Untersuchungen mit nur geringem Umfang von z. B. cerebralem Untersuchungsmaterial aber auch für die Untersuchung humaner Proben cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) von praktischer wissenschaftlicher Bedeutung ist.

In der sich anschließenden, tierexperimentellen Akutstudie in Ratten konnten die Ergebnisse der vorab im Enzymassay gemessenen FAAH Enzymblockade durch Cannabidiol nicht bestätigt werden. Während URB 597 als selektiver FAAH-Inhibitor zur Hochregulierung der Anandamid- OEA- und PEA-Konzentrationen führte, wurde dies für Cannabidiol nicht beobachtet. Es zeigte sich allerdings, dass mit der gewählten Dosierung, die sich an der humanen Dosis orientierte, im Rattengehirn nur Cannabidiol-Spiegel unterhalb der für eine FAAH-Inhibition erforderlichen Konzentration erreicht wurden. Hierfür sind möglicherweise pharmakokinetische Aspekte wie auch höhere First-Pass-Effekte bei Nagern verantwortlich zu machen, die die Abschätzung von Äquivalenzdosierungen erschweren.

Die Effekte einer akuten Gabe von Δ^9-THC, partieller Agonist an den CB-Rezeptoren, auf die Fettsäureethanolamidspiegel wurden ebenso im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Gehirn, in der Leber und im Serum untersucht. Dabei spielte der Faktor Lösungsmittel eine große Rolle. Der durch das Sesamöl bewirkte langsame Anstieg der Δ^9-THC-Spiegel schien einen Toleranzeffekt auszulösen. Diese Lösungsmittelbedingte Adaption spiegelte sich in den Fettsäureethanolamid-konzentrationen wider. Während diese nach Gabe von Δ^9-THC im öligen Solvens nahezu unverändert blieben, bewirkte Δ^9-THC in wässriger Lösung zum einen eine Hochregulierung der PEA-Serumspiegel nach 2 h und zum anderen eine Erniedrigung der 2-AG-Konzentration nach 15 min, die sich allerdings nach 2 h wieder normalisierte. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu früheren Studien, bei denen nicht nur für PEA sondern auch für Anandamid, OEA, und 2-AG ein Anstieg der Serumspiegel gefunden wurde. Interessanterweise konnte im Gehirn keine Abnahme der Fettsäureethanolamidspiegel, wie sie in früheren Experimenten beobachtet wurde, nachgewiesen werden.

Im Rahmen der tierexperimentellen Studie erfolgte zudem eine detaillierte Analyse der Effekte von URB 597 in verschiedenen Gehirnregionen der Ratten. Es zeigte sich, dass zum einen jedes Fettsäureethanolamid *per se* ein anderes Verteilungsmuster aufweist und zudem URB 597 die Fettsäureethanolamidkonzentrationen in den verschiedenen Arealen unterschiedlich stark beeinflusst. Diese Ergebnisse spiegeln den komplexen Wirkmechanismus des Endocannabinoidsystems wider. Vermutlich

sind lokal unterschiedliche CB-Rezeptordichten mit unterschiedlichen endogenen Ligandenspiegel assoziiert, während die distinkte Verteilung des FAAH-Enzyms dazu beiträgt, dass URB 597 die Fettsäureethanolamidkonzentrationen unterschiedlich stark beeinflussen kann.

Neben den Effekten von Cannabidiol, Δ^9-THC und URB 597 auf die Fettsäure-ethanolamidkonzentrationen wurde auch überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen den Serum- und Gehirnspiegeln gibt. Es bestand allerdings keine Korrelation, so dass die peripheren Fettsäureethanolamide nicht die Fettsäureethanolamidspiegel im Gehirn reflektierten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das Endocannabinoidsystem als protektives System genetisch beeinflusst ist. Die Hochregulierung des Endocannabinoidsystems scheint zwar vor einer schizophrenen Erkrankung schützen zu können, aber wenn sich verschiedene andere Faktoren, die nicht genetischen Ursprungs sind, häufen, reicht dies vermutlich nicht aus, um die Entstehung der Krankheit zu verhindern. Das hier entwickelte Messverfahren erlaubt nicht nur die valide Messung der Endocannabinoide und verwandten Fettsäureethanolamide zur Analyse der Veränderungen bei psychiatrischen Erkrankungen, sondern bietet auch eine valide Basis für zukünftige Experimente, die sich der Aufklärung der Wirkweise von Cannabidiol und Δ^9-THC auf das komplexe Endocannabinoidsystem widmen.

13 Literatur

Adams, R., 1940. Marihuana. Science. 92, 115-9.

Adams, R., Hunt, M., Clark, J.H., 1940. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp.I. Journal of the American Chemical Society. 62, 196-200.

Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J.E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H., Hollister, L., 1986. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. Pharmacological reviews. 38, 21-43.

Ameri, A., 1999. The effects of cannabinoids on the brain. Prog Neurobiol. 58, 315-48.

Andreasson, S., Allebeck, P., Engstrom, A., Rydberg, U., 1987. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. Lancet. 2, 1483-6.

Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., Moffitt, T.E., 2002. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. BMJ. 325, 1212-3.

Ashton, C.H., Moore, P.B., 2011. Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders. Acta psychiatrica Scandinavica. 124, 250-61.

Ashton, J.C., Friberg, D., Darlington, C.L., Smith, P.F., 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. Neurosci Lett. 396, 113-6.

Atwood, B.K., Wager-Miller, J., Haskins, C., Straiker, A., Mackie, K., 2012. Functional selectivity in CB(2) cannabinoid receptor signaling and regulation: implications for the therapeutic potential of CB(2) ligands. Mol Pharmacol. 81, 250-63.

Axelrod, J., Felder, C.C., 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. Neurochem Res. 23, 575-81.

Bacci, A., Huguenard, J.R., Prince, D.A., 2004. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. Nature. 431, 312-6.

Balvers, M.G., Verhoeckx, K.C., Witkamp, R.F., 2009. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 877, 1583-90.

Ban, T.A., 2004. Neuropsychopharmacology and the genetics of schizophrenia: a history of the diagnosis of schizophrenia. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 28, 753-62.

Batkai, S., Jarai, Z., Wagner, J.A., Goparaju, S.K., Varga, K., Liu, J., Wang, L., Mirshahi, F., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., Urbaschek, R., Garcia, N., Jr., Sanyal, A.J., Kunos, G., 2001. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. Nat Med. 7, 827-32.

Bauer, K., Kornhuber, J., 1987. Blood-cerebrospinal fluid barrier in schizophrenic patients. European archives of psychiatry and neurological sciences. 236, 257-9.

Beal, J.E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J.O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T.F., Shepard, K.V., 1995. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. J Pain Symptom Manage. 10, 89-97.

Bechter, K., Reiber, H., Herzog, S., Fuchs, D., Tumani, H., Maxeiner, H.G., 2010. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: identification of subgroups with immune responses and blood-CSF barrier dysfunction. Journal of psychiatric research. 44, 321-30.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science. 277, 1094-7.

Beltramo, M., de Fonseca, F.R., Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M.A., Grammatikopoulos, G., Sadile, A.G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 2000. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 20, 3401-7.

Beltramo, M., Piomelli, D., 2000. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. Neuroreport. 11, 1231-5.

Betäubungsmittelgesetz, (1981). in der Fassung der Bekanntmachung vom 1. März 1994 (BGBl. I S. 358), das durch Artikel 4 Absatz 7 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist. Vol., ed.^eds.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Di Marzo, V., 1999. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. Biochem Biophys Res Commun. 256, 377-80.

Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. Br J Pharmacol. 134, 845-52.

Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., Doherty, P., 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. J Cell Biol. 163, 463-8.

Bisogno, T., Ortar, G., Petrosino, S., Morera, E., Palazzo, E., Nalli, M., Maione, S., Di Marzo, V., 2009. Development of a potent inhibitor of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis with antinociceptive activity in vivo. Biochim Biophys Acta. 1791, 53-60.

Bland, J.M., Altman, D.G., 2009. Analysis of continuous data from small samples. BMJ. 338, a3166.

Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Chem Biol. 14, 1347-56.

Bleuler, M., 1972. Die schizophrenen Geistesstörungen im Lichte langjähriger Kranken- und Familiengeschichten, Vol., Thieme, Stuttgart.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology. 37, 911-7.

Boomsma, D., Busjahn, A., Peltonen, L., 2002. Classical twin studies and beyond. Nature reviews. Genetics. 3, 872-82.

Bordet, R., Ouk, T., Petrault, O., Gele, P., Gautier, S., Laprais, M., Deplanque, D., Duriez, P., Staels, B., Fruchart, J.C., Bastide, M., 2006. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. Biochem Soc Trans. 34, 1341-6.

Bortolato, M., Mangieri, R.A., Fu, J., Kim, J.H., Arguello, O., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2007. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. Biol Psychiatry. 62, 1103-10.

Bosier, B., Muccioli, G.G., Hermans, E., Lambert, D.M., 2010. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. Biochem Pharmacol. 80, 1-12.

Bouaboula, M., Hilairet, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G., Casellas, P., 2005. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Eur J Pharmacol. 517, 174-81.

Brans, R.G., van Haren, N.E., van Baal, G.C., Schnack, H.G., Kahn, R.S., Hulshoff Pol, H.E., 2008. Heritability of changes in brain volume over time in twin pairs discordant for schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 65, 1259-68.

Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Vogt, L.J., Sim-Selley, L.J., 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**,** 2447-59.

Breivogel, C.S., Griffin, G., Di Marzo, V., Martin, B.R., 2001. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. Mol Pharmacol. 60**,** 155-63.

Buczynski, M.W., Parsons, L.H., 2010. Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. Br J Pharmacol. 160**,** 423-42.

Cachope, R., 2012. Functional diversity on synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 367**,** 3242-53.

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**,** 3934-42.

Cadas, H., di Tomaso, E., Piomelli, D., 1997. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. J Neurosci. 17**,** 1226-42.

Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. Nature. 394**,** 277-81.

Casanova, M.L., Blazquez, C., Martinez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernandez-Acenero, M.J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., Guzman, M., 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. J Clin Invest. 111**,** 43-50.

Ceccarini, J., De Hert, M., Van Winkel, R., Peuskens, J., Bormans, G., Kranaster, L., Enning, F., Koethe, D., Leweke, F.M., Van Laere, K., 2013a. Increased ventral striatal CB1 receptor binding is related to negative symptoms in drug-free patients with schizophrenia. NeuroImage. 79**,** 304-12.

Ceccarini, J., Kuepper, R., Kemels, D., van Os, J., Henquet, C., Van Laere, K., 2013b. [F]MK-9470 PET measurement of cannabinoid CB receptor availability in chronic cannabis users. Addiction biology.

Childers, S.R., Breivogel, C.S., 1998. Cannabis and endogenous cannabinoid systems. Drug Alcohol Depend. 51**,** 173-87.

Churchwell, M.I., Twaddle, N.C., Meeker, L.R., Doerge, D.R., 2005. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 825**,** 134-43.

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.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature. 384**,** 83-7.

Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H., 2001. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A. 98**,** 9371-6.

D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y.T., Braley, G., Gueorguieva, R., Krystal, J.H., 2004. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. Neuropsychopharmacology. 29**,** 1558-72.

D'Souza, D.C., Abi-Saab, W.M., Madonick, S., Forselius-Bielen, K., Doersch, A., Braley, G., Gueorguieva, R., Cooper, T.B., Krystal, J.H., 2005. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. Biol Psychiatry. 57**,** 594-608.

De Marchi, N., De Petrocellis, L., Orlando, P., Daniele, F., Fezza, F., Di Marzo, V., 2003. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. Lipids in health and disease. 2, 5.

De Meijer, E.P.M., van der Kamp, H.J., van Eeuwijk, F.A., 1992. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. Euphytica. 62, 187-200.

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allara, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. Br J Pharmacol. 163, 1479-94.

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.

Demjaha, A., MacCabe, J.H., Murray, R.M., 2012. How genes and environmental factors determine the different neurodevelopmental trajectories of schizophrenia and bipolar disorder. Schizophr Bull. 38, 209-14.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., III, Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Molecular Pharmacology. 34, 605-613.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., 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, 1946-9.

Di Carlo, G., Izzo, A.A., 2003. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. Expert opinion on investigational drugs. 12, 39-49.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature. 372, 686-91.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L., 1998. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci. 21, 521-8.

Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., Gonzalez, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., 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, 1627-35.

Di Marzo, V., 2006. Endocannabinoids: synthesis and degradation. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 160, 1-24.

Di Marzo, V., 2009. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. 60, 77-84.

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, 335-40.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 10819-24.

Dominik, A., Steinhilber, D., 1996. Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten, Vol. 1. Auflage, Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer, Ulm; Stuttgart; Jena; Lübeck.

Dow-Edwards, D., Zhao, N., 2008. Oral THC produces minimal behavioral alterations in preadolescent rats. Neurotoxicology and teratology. 30, 385-9.

Duggan, K.C., Hermanson, D.J., Musee, J., Prusakiewicz, J.J., Scheib, J.L., Carter, B.D., Banerjee, S., Oates, J.A., Marnett, L.J., 2011. (R)-Profens are substrate-

selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. Nature chemical biology. 7, 803-9.
Egertova, M., Cravatt, B.F., Elphick, M.R., 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. Neuroscience. 119, 481-96.
Eggan, S.M., Hashimoto, T., Lewis, D.A., 2008. Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 65, 772-84.
El-Gohary, M., Eid, M.A., 2004. Effect of cannabinoid ingestion (in the form of bhang) on the immune system of high school and university students. Human & experimental toxicology. 23, 149-56.
Elsohly, M.A., Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. Life Sci. 78, 539-48.
Emrich, H.M., Leweke, F.M., Schneider, U., 1997. Towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia: cognitive impairments due to dysregulation of the endogenous cannabinoid system. Pharmacol Biochem Behav. 56, 803-7.
Fanelli, F., Di Lallo, V.D., Belluomo, I., De Iasio, R., Baccini, M., Casadio, E., Gasparini, D.I., Colavita, M., Gambineri, A., Grossi, G., Vicennati, V., Pasquali, R., Pagotto, U., 2012. Estimation of reference intervals of five endocannabinoids and endocannabinoid related compounds in human plasma by two dimensional-LC/MS/MS. Journal of lipid research. 53, 481-93.
FDA, 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.
Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2005. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. J Pharmacol Exp Ther. 313, 352-8.
Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L., 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol. 48, 443-50.
Felder, C.C., Glass, M., 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 38, 179-200.
Fernandez-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M.R., Garcia, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., Martinez-Orgado, J., 2013. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? British journal of clinical pharmacology. 75, 323-33.
Field, A., 2009. Discovering statistics using SPSS, Vol. 3, SAGE Publications Ltd.
Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 226, 497-509.
Fontana, A., Di Marzo, V., Cadas, H., Piomelli, D., 1995. Analysis of anandamide, an endogenous cannabinoid substance, and of other natural N-acylethanolamines. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 53, 301-8.
Frauenknecht, S., Lieb, K., Brunnhuber, S., 2008. Therapie psychischer Erkankungen. In: Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie. Vol., K. Lieb, S. Frauenknecht, S. Brunnhuber, ed.^eds. Urban & Fischer, München.
Freedman, R., 2003. Schizophrenia. N Engl J Med. 349, 1738-49.
Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev. 83, 1017-66.
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. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature. 425, 90-3.
Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E., Piomelli, D., 2005. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. Neuropharmacology. 48, 1147-53.

Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., Bandiera, T., Reggiani, A., Mor, M., Cavalli, A., Piomelli, D., 2012. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. Nature neuroscience. 15, 64-9.

Gaebel, W., Müller-Spahn, F., 2002. Diagnostik und Therapie psychischer Störungen, Vol., Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart.

Gaines Das, R., North, D., 2007. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. Laboratory animals. 41, 312-20.

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, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. J Am Chem Soc. 86, 1646-47.

Gensthaler, B., Siebenand, S., 2011. Neu auf dem Markt: Zwei Neulinge im Juli 2011. Pharmazeutische Zeitung. 31.

Gerdeman, G.L., Ronesi, J., Lovinger, D.M., 2002. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. Nature neuroscience. 5, 446-51.

Giang, D.K., Cravatt, B.F., 1997. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 2238-42.

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.

Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D., 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nature neuroscience. 2, 358-63.

Giuffrida, A., Rodriguez de Fonseca, F., Piomelli, D., 2000. Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. Analytical Biochemistry. 280, 87-93.

Giuffrida, A., Leweke, F.M., Gerth, C.W., 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, 2108-14.

Glaser, S.T., Abumrad, N.A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K.M., Deutsch, D.G., 2003. Evidence against the presence of an anandamide transporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 4269-74.

Glass, M., 2001. The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 25, 743-65.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Trezza, V., Goldberg, S.R., Cuomo, V., Piomelli, D., 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 18620-5.

Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R., 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. Brain Res. 1071, 10-23.

Goparaju, S.K., Ueda, N., Yamaguchi, H., Yamamoto, S., 1998. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. FEBS Lett. 422, 69-73.

Gould, T.D., Gottesman, II, 2006. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. Genes, brain, and behavior. 5**,** 113-9.

Grotenhermen, F., 2004. Cannabis und Cannabinoide, Vol., Hans Huber Verlag, Bern.

Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspe, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., Herbert, J.M., Winegar, D.A., Willson, T.M., Fruchart, J.C., Berge, R.K., Staels, B., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. J Biol Chem. 275**,** 16638-42.

Guislain, J., 1833. Traite sur les phrenopathies, ou Doctrine nouvelle des maladies mentales, basee sur des observations pratiques et statistiques, et l'etude des causes, de la nature, des symptomes, du pronostic, du diagnostic et du traitement de ces affections, Vol., Etablissement Encyclographique; a Strassbourg; Paris; Londres: chez Mm. Treuttel et Würtz, Brüssel.

Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boscia, F., Freund, T.F., 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. Eur J Neurosci. 20**,** 441-58.

Guzman, M., Sanchez, C., Galve-Roperh, I., 2002. Cannabinoids and cell fate. Pharmacology & therapeutics. 95**,** 175-84.

Haefner, H., 2005. Das Rätsel Schizophrenie: Eine Krankheit wird entschlüsselt, Vol., Beck Verlag, München.

Haney, M., Rabkin, J., Gunderson, E., Foltin, R.W., 2005. Dronabinol and marijuana in HIV(+) marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. Psychopharmacology (Berl). 181**,** 170-8.

Hardison, S., Weintraub, S.T., Giuffrida, A., 2006. Quantification of endocannabinoids in rat biological samples by GC/MS: technical and theoretical considerations. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 81**,** 106-12.

Harrison, P.J., 2004. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. Psychopharmacology (Berl). 174**,** 151-62.

Hayes, L.N., Severance, E.G., Leek, J.T., Gressitt, K.L., Rohleder, C., Coughlin, J.M., Leweke, F.M., Yolken, R.H., Sawa, A., 2014. Inflammatory molecular signature associated with infectious agents in psychosis. Schizophr Bull. 40**,** 963-72.

Hazekamp, A., Ruhaak, R., Zuurman, L., van Gerven, J., Verpoorte, R., 2006. Evaluation of a vaporizing device (Volcano) for the pulmonary administration of tetrahydrocannabinol. Journal of pharmaceutical sciences. 95**,** 1308-17.

Heckers, S., Rauch, S.L., Goff, D., Savage, C.R., Schacter, D.L., Fischman, A.J., Alpert, N.M., 1998. Impaired recruitment of the hippocampus during conscious recollection in schizophrenia. Nature neuroscience. 1**,** 318-23.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 87**,** 1932-6.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci. 11**,** 563-83.

Hermanson, D.J., Hartley, N.D., Gamble-George, J., Brown, N., Shonesy, B.C., Kingsley, P.J., Colbran, R.J., Reese, J., Marnett, L.J., Patel, S., 2013. Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. Nature neuroscience. 16**,** 1291-8.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2011. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Vol., Thieme, Stuttgart.

Hicks, J.W., Parkes, J., Sadovski, O., Tong, J., Houle, S., Vasdev, N., Wilson, A.A., 2013. Synthesis and preclinical evaluation of [11C-carbonyl]PF-04457845 for neuroimaging of fatty acid amide hydrolase. Nuclear medicine and biology. 40**,** 740-6.

Hillard, C.J., Jarrahian, A., 2000. The movement of N-arachidonoylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. Chem Phys Lipids. 108**,** 123-34.

Hillard, C.J., Weinlander, K.M., Stuhr, K.L., 2012. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. Neuroscience. 204, 207-29.

Hirvonen, J., van Erp, T.G., Huttunen, J., Aalto, S., Nagren, K., Huttunen, M., Lonnqvist, J., Kaprio, J., Hietala, J., Cannon, T.D., 2005. Increased caudate dopamine D2 receptor availability as a genetic marker for schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 62, 371-8.

Hirvonen, J., van Erp, T.G., Huttunen, J., Nagren, K., Huttunen, M., Aalto, S., Lonnqvist, J., Kaprio, J., Cannon, T.D., Hietala, J., 2006. Striatal dopamine D1 and D2 receptor balance in twins at increased genetic risk for schizophrenia. Psychiatry research. 146, 13-20.

Hirvonen, J., Goodwin, R.S., Li, C.T., Terry, G.E., Zoghbi, S.S., Morse, C., Pike, V.W., Volkow, N.D., Huestis, M.A., Innis, R.B., 2012. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. Molecular psychiatry. 17, 642-9.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev. 54, 161-202.

Huber, G., Gross, G., Schuttler, R., Linz, M., 1980. Longitudinal studies of schizophrenic patients. Schizophr Bull. 6, 592-605.

Iversen, L., Chapman, V., 2002. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? Curr Opin Pharmacol. 2, 50-5.

Iversen, L.L., 2000. The Science of Marijuana, Vol., Oxford University Press, New York.

Jarai, Z., Wagner, J.A., Varga, K., Lake, K.D., Compton, D.R., Martin, B.R., Zimmer, A.M., Bonner, T.I., Buckley, N.E., Mezey, E., Razdan, R.K., Zimmer, A., Kunos, G., 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 14136-41.

Jones, P.G., Falvello, L., Kennard, O., Sheldrick, G.M., Mechoulam, R., 1977. Cannabidiol. Acta crystallographica. Section B. 33, 3211-3214.

Jung, K.M., Sepers, M., Henstridge, C.M., Lassalle, O., Neuhofer, D., Martin, H., Ginger, M., Frick, A., DiPatrizio, N.V., Mackie, K., Katona, I., Piomelli, D., Manzoni, O.J., 2012. Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. Nature communications. 3, 1080.

Kaczocha, M., Glaser, S.T., Deutsch, D.G., 2009. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 6375-80.

Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H., Holm, C., 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. J Biol Chem. 272, 27218-23.

Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D., 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nat Med. 9, 76-81.

Kelley, B.G., Thayer, S.A., 2004. Delta 9-tetrahydrocannabinol antagonizes endocannabinoid modulation of synaptic transmission between hippocampal neurons in culture. Neuropharmacology. 46, 709-15.

Knable, M.B., Weinberger, D.R., 1997. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. Journal of psychopharmacology. 11, 123-31.

Knauf, C., Rieusset, J., Foretz, M., Cani, P.D., Uldry, M., Hosokawa, M., Martinez, E., Bringart, M., Waget, A., Kersten, S., Desvergne, B., Gremlich, S., Wahli, W., Seydoux, J., Delzenne, N.M., Thorens, B., Burcelin, R., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose

tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain. Endocrinology. 147, 4067-78.

Koch, M., 2006. Tiermodelle für schizophrene Erkrankungen. In: Forum Neuroscience Schizophrenie. Vol., M. Spitzer, ed.^eds. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Koethe, D., Llenos, I.C., Dulay, J.R., Hoyer, C., Torrey, E.F., Leweke, F.M., Weis, S., 2007. Expression of CB(1) cannabinoid receptor in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. J Neural Transm.

Koethe, D., Giuffrida, A., Schreiber, D., Hellmich, M., Schultze-Lutter, F., Ruhrmann, S., Klosterkotter, J., Piomelli, D., Leweke, F.M., 2009a. Anandamide elevation in cerebrospinal fluid in initial prodromal states of psychosis. The British journal of psychiatry : the journal of mental science. 194, 371-2.

Koethe, D., Schreiber, D., Giuffrida, A., Mauss, C., Faulhaber, J., Heydenreich, B., Hellmich, M., Graf, R., Klosterkotter, J., Piomelli, D., Leweke, F.M., 2009b. Sleep deprivation increases oleoylethanolamide in human cerebrospinal fluid. Journal of neural transmission. 116, 301-5.

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 Sci Appl. 690, 7-13.

Köhler, H.A., 1887. Köhlers Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte. Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America., Vol. 1, Verlag Franz Eugen Köhler, Gera-Untermhaus.

Koolschijn, P.C., van Haren, N.E., Hulshoff Pol, H.E., Kahn, R.S., 2008. Hypothalamus volume in twin pairs discordant for schizophrenia. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 18, 312-5.

Kozak, K.R., Marnett, L.J., 2002. Oxidative metabolism of endocannabinoids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 66, 211-20.

Kreitzer, F.R., Stella, N., 2009. The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors. Pharmacol Ther. 122, 83-96.

Kunos, G., Batkai, S., Offertaler, L., Mo, F., Liu, J., Karcher, J., Harvey-White, J., 2002. The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. Chem Phys Lipids. 121, 45-56.

Lambert, D.M., Di Marzo, V., 1999. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? Curr Med Chem. 6, 757-73.

Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2006. Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. Biochemistry. 45, 4720-6.

Leweke, F.M., Giuffrida, A., Wurster, U., Emrich, H.M., Piomelli, D., 1999a. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. Neuroreport. 10, 1665-9.

Leweke, F.M., Schneider, U., Thies, M., Munte, T.F., Emrich, H.M., 1999b. Effects of synthetic delta9-tetrahydrocannabinol on binocular depth inversion of natural and artificial objects in man. Psychopharmacology (Berl). 142, 230-5.

Leweke, F.M., Schneider, U., Radwan, M., Schmidt, E., Emrich, H.M., 2000. Different effects of nabilone and cannabidiol on binocular depth inversion in Man. Pharmacol Biochem Behav. 66, 175-81.

Leweke, F.M., Gerth, C.W., Klosterkotter, J., 2004a. Cannabis-associated psychosis: current status of research. CNS Drugs. 18, 895-910.

Leweke, F.M., Gerth, C.W., Koethe, D., Klosterkotter, J., Ruslanova, I., Krivogorsky, B., Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2004b. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 254, 4-8.

Leweke, F.M., Giuffrida, A., Koethe, D., Schreiber, D., Nolden, B.M., Kranaster, L., Neatby, M.A., Schneider, M., Gerth, C.W., Hellmich, M., Klosterkotter, J.,

Piomelli, D., 2007. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. Schizophr Res.

Leweke, F.M., Koethe, D., 2008. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. Addiction biology. 13**,** 264-75.

Leweke, F.M., Schneider, M., 2011. Chronic pubertal cannabinoid treatment as a behavioural model for aspects of schizophrenia: effects of the atypical antipsychotic quetiapine. The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum. 14**,** 43-51.

Leweke, F.M., Odorfer, T.M., Bumb, J.M., 2012a. Medical needs in the treatment of psychotic disorders. Handbook of experimental pharmacology. 165-85.

Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012b. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. Translational psychiatry. 2**,** e94.

Li, W., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., 2007. A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. J Am Chem Soc. 129**,** 9594-5.

Lichtenstein, P., Yip, B.H., Bjork, C., Pawitan, Y., Cannon, T.D., Sullivan, P.F., Hultman, C.M., 2009. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. Lancet. 373**,** 234-9.

Lieb, K., 2008a. Affektive Störungen. In: Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie. Vol. 6, K. Lieb, S. Frauenknecht, S. Brunnhuber, ed.^eds. Elsevier Urban & Fischer, München.

Lieb, K., 2008b. Schizophrenien und andere psychotische Störungen. In: Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie. Vol., K. Lieb, S. Frauenknecht, S. Brunnhuber, ed.^eds. Urban & Fischer, München.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.Y., Kunos, G., 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. Proc Natl Acad Sci U S A. 103**,** 13345-50.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., Razdan, R.K., Kunos, G., 2008. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. Neuropharmacology. 54**,** 1-7.

Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D., 2005a. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. Mol Pharmacol. 67**,** 15-9.

Lo Verme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D., 2005b. The search for the palmitoylethanolamide receptor. Life Sci. 77**,** 1685-1698.

Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavon, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., Lichtman, A.H., Cravatt, B.F., 2009. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. Nat Chem Biol. 5**,** 37-44.

LoVerme, J., Russo, R., La Rana, G., Fu, J., Farthing, J., Mattace-Raso, G., Meli, R., Hohmann, A., Calignano, A., Piomelli, D., 2006. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. J Pharmacol Exp Ther. 319**,** 1051-61.

Maccarrone, M., Gasperi, V., Catani, M.V., Diep, T.A., Dainese, E., Hansen, H.S., Avigliano, L., 2010. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. Annual review of nutrition. 30**,** 423-40.

Marczylo, T.H., Lam, P.M., Nallendran, V., Taylor, A.H., Konje, J.C., 2009. A solid-phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple human biomatrices. Anal Biochem. 384**,** 106-13.

Marrs, W.R., Blankman, J.L., Horne, E.A., Thomazeau, A., Lin, Y.H., Coy, J., Bodor, A.L., Muccioli, G.G., Hu, S.S., Woodruff, G., Fung, S., Lafourcade, M.,

Alexander, J.P., Long, J.Z., Li, W., Xu, C., Moller, T., Mackie, K., Manzoni, O.J., Cravatt, B.F., Stella, N., 2010. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. Nature neuroscience. 13, 951-7.

Massa, F., Storr, M., Lutz, B., 2005. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. Journal of molecular medicine. 83, 944-54.

Mato, S., Chevaleyre, V., Robbe, D., Pazos, A., Castillo, P.E., Manzoni, O.J., 2004. A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. Nature neuroscience. 7, 585-6.

McKinney, M.K., Cravatt, B.F., 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. Annual review of biochemistry. 74, 411-32.

Mechoulam, R., Shvo, Y., 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. Tetrahedron. 19, 2073-8.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., 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., Parker, L.A., Gallily, R., 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. J Clin Pharmacol. 42, 11S-19S.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O., 2007. Cannabidiol--recent advances. Chem Biodivers. 4, 1678-92.

Mechoulam, R., Parker, L.A., 2013. The endocannabinoid system and the brain. Annual review of psychology. 64, 21-47.

Meltzer, H.Y., Huang, M., 2008. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. Progress in brain research. 172, 177-97.

Melvin, L.S., Milne, G.M., Johnson, M.R., Subramaniam, B., Wilken, G.H., Howlett, A.C., 1993. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. Mol Pharmacol. 44, 1008-15.

Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., Wahli, W., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacological reviews. 58, 726-41.

Miller, A.M., Stella, N., 2008. CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. Br J Pharmacol. 153, 299-308.

Moore, T.H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R., Jones, P.B., Burke, M., Lewis, G., 2007. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. Lancet. 370, 319-28.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., Ceru, M.P., 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. Neuroscience. 123, 131-45.

Morgan, C.J., Page, E., Schaefer, C., Chatten, K., Manocha, A., Gulati, S., Curran, H.V., Brandner, B., Leweke, F.M., 2013. Cerebrospinal fluid anandamide levels, cannabis use and psychotic-like symptoms. The British journal of psychiatry : the journal of mental science. 202, 381-2.

Muhl, D., Kathmann, M., Hoyer, C., Kranaster, L., Hellmich, M., Gerth, C.W., Faulhaber, J., Schlicker, E., Leweke, F.M., 2014. Increased CB2 mRNA and anandamide in human blood after cessation of cannabis abuse. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 387, 691-5.

Mulder, A.M., Cravatt, B.F., 2006. Endocannabinoid metabolism in the absence of fatty acid amide hydrolase (FAAH): discovery of phosphorylcholine derivatives of N-acyl ethanolamines. Biochemistry. 45, 11267-77.

Muller-Vahl, K.R., Schneider, U., Prevedel, H., Theloe, K., Kolbe, H., Daldrup, T., Emrich, H.M., 2003. Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. J Clin Psychiatry. 64, 459-65.

Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature. 365, 61-5.

Naef, M., Russmann, S., Petersen-Felix, S., Brenneisen, R., 2004. Development and pharmacokinetic characterization of pulmonal and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans. Journal of pharmaceutical sciences. 93, 1176-84.

Navarro, M., Fernandez-Ruiz, J.J., De Miguel, R., Hernandez, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A., 1993. Motor disturbances induced by an acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. Pharmacol Biochem Behav. 45, 291-8.

Nunez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R.M., Romero, J., 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. Synapse. 53, 208-13.

O'Sullivan, S.E., 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. Br J Pharmacol. 152, 576-82.

Oddi, S., Fezza, F., Catanzaro, G., De Simone, C., Pucci, M., Piomelli, D., Finazzi-Agro, A., Maccarrone, M., 2010. Pitfalls and solutions in assaying anandamide transport in cells. Journal of lipid research. 51, 2435-44.

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N., 2004. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. J Biol Chem. 279, 5298-305.

Owen, M.J., Craddock, N., Jablensky, A., 2007. The genetic deconstruction of psychosis. Schizophr Bull. 33, 905-11.

Pacher, P., Batkai, S., Kunos, G., 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacological reviews. 58, 389-462.

Pertwee, R.G., 2007. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? Br J Pharmacol. 152, 984-6.

Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., Stella, N., 1998. Endogenous cannabinoid signaling. Neurobiology of Disease. 5, 462-473.

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.

Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci. 4, 873-84.

Piomelli, D., 2004. The endogenous cannabinoid system and the treatment of marijuana dependence. Neuropharmacology. 47 Suppl 1, 359-67.

Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., Putman, D., 2006. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). CNS drug reviews. 12, 21-38.

Piomelli, D., 2013. More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. Neuropharmacology.

Potvin, S., Kouassi, E., Lipp, O., Bouchard, R.H., Roy, M.A., Demers, M.F., Gendron, A., Astarita, G., Piomelli, D., Stip, E., 2008. Endogenous cannabinoids in patients with schizophrenia and substance use disorder during quetiapine therapy. Journal of psychopharmacology. 22, 262-9.

Pryor, S.R., 2000. Is platelet release of 2-arachidonoyl-glycerol a mediator of cognitive deficits? An endocannabinoid theory of schizophrenia and arousal. Medical hypotheses. 55, 494-501.

Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P., Manzoni, O.J., 2011. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. Nature neuroscience. 14, 1542-7.

Randall, M.D., Harris, D., Kendall, D.A., Ralevic, V., 2002. Cardiovascular effects of cannabinoids. Pharmacol Ther. 95, 191-202.

Richardson, D., Ortori, C.A., Chapman, V., Kendall, D.A., Barrett, D.A., 2007. Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry. Anal Biochem. 360, 216-26.

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, 240-4.

Rodriguez de Fonseca, F., Gorriti, M.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Palomo, T., Ramos, J.A., 1994. Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. Pharmacol Biochem Behav. 47, 33-40.

Rohleder, C., 2012. Verhaltenspharmakologische und Metabolische Untersuchungen akuter und chronischer Modulationen des Endocannabinoidsystems in der Ratte. In: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Vol., ed.^eds. Universität zu Köln, Köln.

Romero, J., Garcia, L., Fernandez-Ruiz, J.J., Cebeira, M., Ramos, J.A., 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, 731-7.

Romero, J., Garcia-Palomero, E., Castro, J.G., Garcia-Gil, L., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., 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, 100-8.

Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Perez, A., Corchero, J., Fuentes, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., 1998. Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. Synapse. 30, 298-308.

Rouzer, C.A., Marnett, L.J., 2008. Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. J Biol Chem. 283, 8065-9.

Ruhaak, L.R., Felth, J., Karlsson, P.C., Rafter, J.J., Verpoorte, R., Bohlin, L., 2011. Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from Cannabis sativa. Biological & pharmaceutical bulletin. 34, 774-8.

Rusjan, P.M., Wilson, A.A., Mizrahi, R., Boileau, I., Chavez, S.E., Lobaugh, N.J., Kish, S.J., Houle, S., Tong, J., 2013. Mapping human brain fatty acid amide hydrolase activity with PET. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 33, 407-14.

Ryan, D., Drysdale, A.J., Pertwee, R.G., Platt, B., 2007. Interactions of cannabidiol with endocannabinoid signalling in hippocampal tissue. Eur J Neurosci. 25, 2093-102.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol. 152, 1092-101.

Schlicker, E., Kathmann, M., 2001. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci. 22, 565-72.

Schmid, H.H., Berdyshev, E.V., 2002. Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 66, 363-76.

Schmidt, R., 2006. LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden. In: Institut für Klinische Pharmakologie. Vol. Ph.D., ed.^eds. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, pp. 161.

Schneider, M., Koch, M., 2003. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the

performance in a progressive ratio task in adult rats. Neuropsychopharmacology. 28, 1760-9.
Schneider, M., Schomig, E., Leweke, F.M., 2008. Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. Addiction biology. 13, 345-57.
Schreiber, D., Harlfinger, S., Nolden, B.M., Gerth, C.W., Jaehde, U., Schomig, E., Klosterkotter, J., Giuffrida, A., Astarita, G., Piomelli, D., Markus Leweke, F., 2007. Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. Anal Biochem. 361, 162-8.
Schusdziarra, V., 2006. Das Endocannabinoid-System: Physiologie und klinische Bedeutung, Vol., Uni-Med.
Senior, J.H., Radomsky, M., 2000. Sustained-Release Injectable Products, Vol., Interpharm/CRC, Boca Raton London New York Washington, D.C.
Severance, E.G., Gressitt, K.L., Alaedini, A., Rohleder, C., Enning, F., Bumb, J.M., Muller, J.K., Schwarz, E., Yolken, R.H., Leweke, F.M., 2015. IgG dynamics of dietary antigens point to cerebrospinal fluid barrier or flow dysfunction in first-episode schizophrenia. Brain, behavior, and immunity. 44, 148-58.
Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., et al., 1991. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. 16, 249-55.
Showalter, V.M., Compton, D.R., Martin, B.R., Abood, M.E., 1996. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. J Pharmacol Exp Ther. 278, 989-99.
Sim-Selley, L.J., Martin, B.R., 2002. Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-b enzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice. J Pharmacol Exp Ther. 303, 36-44.
Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. J Biol Chem. 281, 26465-72.
Skonberg, C., Artmann, A., Cornett, C., Hansen, S.H., Hansen, H.S., 2010. Pitfalls in the sample preparation and analysis of N-acylethanolamines. Journal of lipid research. 51, 3062-73.
Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., Davis, J.B., 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). Br J Pharmacol. 129, 227-30.
Solorzano, C., Zhu, C., Battista, N., Astarita, G., Lodola, A., Rivara, S., Mor, M., Russo, R., Maccarrone, M., Antonietti, F., Duranti, A., Tontini, A., Cuzzocrea, S., Tarzia, G., Piomelli, D., 2009. Selective N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase inhibition reveals a key role for endogenous palmitoylethanolamide in inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 20966-71.
Spencer, D.J., 1971. Cannabis-induced psychosis. The International journal of the addictions. 6, 323-6.
Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D., 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature. 388, 773-8.
Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochem Biophys Res Commun. 215, 89-97.
Sugiura, T., Waku, K., 2002. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. J Biochem. 132, 7-12.

Sullivan, P.F., Kendler, K.S., Neale, M.C., 2003. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. Arch Gen Psychiatry. 60, 1187-92.

Sun, Y., Alexander, S.P., Kendall, D.A., Bennett, A.J., 2006. Cannabinoids and PPARalpha signalling. Biochem Soc Trans. 34, 1095-7.

Sun, Y.X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., Ueda, N., 2004. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. Biochem J. 380, 749-56.

Sundram, S., Copolov, D., Dean, B., 2005. Clozapine decreases [3H] CP 55940 binding to the cannabinoid 1 receptor in the rat nucleus accumbens. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 371, 428-33.

Tan, B., Yu, Y.W., Monn, M.F., Hughes, H.V., O'Dell, D.K., Walker, J.M., 2009. Targeted lipidomics approach for endogenous N-acyl amino acids in rat brain tissue. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 877, 2890-4.

Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G., 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. Br J Pharmacol. 150, 613-23.

Thomas, B.F., Wei, X., Martin, B.R., 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, 1383-90.

Torrey, E.F., E., B.A., Taylor, E.H., Gottesman, I., 1994. Schizophrenia and Manic-Depressive Disorder - The biological roots of mental illness as revealed by the landmark study of identical twins, Vol., BasicBooks, New York.

Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2003. Toxoplasma gondii and schizophrenia. Emerging infectious diseases. 9, 1375-80.

Torrey, E.F., Leweke, F.M., Schwarz, M.J., Mueller, N., Bachmann, S., Schroeder, J., Dickerson, F., Yolken, R.H., 2006. Cytomegalovirus and schizophrenia. CNS Drugs. 20, 879-85.

Tseng, A.H., Harding, J.W., Craft, R.M., 2004. Pharmacokinetic factors in sex differences in Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced behavioral effects in rats. Behav Brain Res. 154, 77-83.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience. 83, 393-411.

Tsuboi, K., Sun, Y.X., Okamoto, Y., Araki, N., Tonai, T., Ueda, N., 2005. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. J Biol Chem. 280, 11082-92.

Ueda, N., Puffenbarger, R.A., Yamamoto, S., Deutsch, D.G., 2000. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). Chem Phys Lipids. 108, 107-21.

Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., 2013. Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. The FEBS journal. 280, 1874-94.

UNODC, 2013. World Drug Report 2013. Vol., ed.^eds., New York.

Vacondio, F., Silva, C., Lodola, A., Fioni, A., Rivara, S., Duranti, A., Tontini, A., Sanchini, S., Clapper, J.R., Piomelli, D., Mor, M., Tarzia, G., 2009. Structure-property relationships of a class of carbamate-based fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors: chemical and biological stability. ChemMedChem. 4, 1495-504.

van der Stelt, M., Di Marzo, V., 2003. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. European journal of pharmacology. 480, 133-50.

van Dongen, J., Slagboom, P.E., Draisma, H.H., Martin, N.G., Boomsma, D.I., 2012. The continuing value of twin studies in the omics era. Nature reviews. Genetics. 13, 640-53.

van Os, J., Bak, M., Hanssen, M., Bijl, R.V., de Graaf, R., Verdoux, H., 2002. Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. Am J Epidemiol. 156, 319-27.

van Rossum, J.M., 1966. The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie. 160, 492-4.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A., 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science. 310, 329-32.

Vandevoorde, S., Tsuboi, K., Ueda, N., Jonsson, K.O., Fowler, C.J., Lambert, D.M., 2003. Esters, retroesters, and a retroamide of palmitic acid: pool for the first selective inhibitors of N-palmitoylethanolamine-selective acid amidase. J Med Chem. 46, 4373-6.

Walsh, D., Nelson, K.A., Mahmoud, F.A., 2003. Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer. 11, 137-43.

Walter, C., Ferreiros, N., Bishay, P., Geisslinger, G., Tegeder, I., Lotsch, J., 2013. Exogenous delta(9)-tetrahydrocannabinol influences circulating endogenous cannabinoids in humans. Journal of clinical psychopharmacology. 33, 699-705.

Watanabe, K., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Yoshimura, H., 1996. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. Biological & pharmaceutical bulletin. 19, 1109-11.

Watt, D.C., Katz, K., Shepherd, M., 1983. The natural history of schizophrenia: a 5-year prospective follow-up of a representative sample of schizophrenics by means of a standardized clinical and social assessment. Psychol Med. 13, 663-70.

Wegener, N., Koch, M., 2009. Neurobiology and systems physiology of the endocannabinoid system. Pharmacopsychiatry. 42 Suppl 1, S79-86.

Wei, B.Q., Mikkelsen, T.S., McKinney, M.K., Lander, E.S., Cravatt, B.F., 2006. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. J Biol Chem. 281, 36569-78.

Williams, J., Wood, J., Pandarinathan, L., Karanian, D.A., Bahr, B.A., Vouros, P., Makriyannis, A., 2007. Quantitative method for the profiling of the endocannabinoid metabolome by LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS. Analytical chemistry. 79, 5582-93.

Wilson, A.A., Garcia, A., Parkes, J., Houle, S., Tong, J., Vasdev, N., 2011. [11C]CURB: Evaluation of a novel radiotracer for imaging fatty acid amide hydrolase by positron emission tomography. Nuclear medicine and biology. 38, 247-53.

Wilson, R.I., Nicoll, R.A., 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature. 410, 588-92.

Wilson, R.I., Nicoll, R.A., 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. Science. 296, 678-82.

Wong, D.F., Kuwabara, H., Horti, A.G., Raymont, V., Brasic, J., Guevara, M., Ye, W., Dannals, R.F., Ravert, H.T., Nandi, A., Rahmim, A., Ming, J.E., Grachev, I., Roy, C., Cascella, N., 2010. Quantification of cerebral cannabinoid receptors subtype 1 (CB1) in healthy subjects and schizophrenia by the novel PET radioligand [11C]OMAR. NeuroImage. 52, 1505-13.

Ye, J.M., Doyle, P.J., Iglesias, M.A., Watson, D.G., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. Diabetes. 50, 411-7.

Yoshino, H., Miyamae, T., Hansen, G., Zambrowicz, B., Flynn, M., Pedicord, D., Blat, Y., Westphal, R.S., Zaczek, R., Lewis, D.A., Gonzalez-Burgos, G., 2011. Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid

suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. The Journal of physiology. 589, 4857-84.

Zajicek, J.P., Sanders, H.P., Wright, D.E., Vickery, P.J., Ingram, W.M., Reilly, S.M., Nunn, A.J., Teare, L.J., Fox, P.J., Thompson, A.J., 2005. Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 76, 1664-9.

Zavitsanou, K., Garrick, T., Huang, X.F., 2004. Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 28, 355-60.

Zelasko, S., Arnold, W.R., Das, A., 2015. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 116-117, 112-23.

Zoerner, A.A., Gutzki, F.M., Batkai, S., May, M., Rakers, C., Engeli, S., Jordan, J., Tsikas, D., 2011. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective. Biochimica et biophysica acta. 1811, 706-23.

Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., Karniol, I.G., 1982. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. Psychopharmacology (Berl). 76, 245-50.

Zuardi, A.W., Morais, S.L., Guimaraes, F.S., Mechoulam, R., 1995. Antipsychotic effect of cannabidiol. J Clin Psychiatry. 56, 485-6.

Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., 2006a. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. Braz J Med Biol Res. 39, 421-9.

Zuardi, A.W., Hallak, J.E., Dursun, S.M., Morais, S.L., Sanches, R.F., Musty, R.E., Crippa, J.A., 2006b. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. J Psychopharmacol. 20, 683-6.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature. 400, 452-7.

14 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 *Cannabis sativa* L. (modifiziert nach Köhler, 1887)

Abbildung 2 Postulierte Synthese- und Abbauwege von Anandamid (Piomelli, 2013)

Abbildung 3 Postulierte Synthese- und Abbauwege von 2-AG (Piomelli, 2013)

Abbildung 4 Vereinfachte Darstellung der CB_1-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsmechanismen an einer präsynaptischen Nervenendigung (Wegener und Koch, 2009)

Abbildung 5 Schematische Darstellung des 2-AG Signalosoms (Piomelli, 2013)

Abbildung 6 Aufbau und Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems (modifiziert nach Schmidt, 2006)

Abbildung 7 Funktionsweise eines Massenspektrometers (Schmidt, 2006)

Abbildung 8 Der Elektrospray-Prozess (Schmidt, 2006)

Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Sagittalschnitt der rechten Hemisphäre eines Rattengehirns (Schnitt 0,4 mm rechts der Längsfurche) (Rohleder, 2012)

Abbildung 10 Aufbau des LC-MS/MS Systems

Abbildung 11 Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 250 pmol/ml Anandamid (AEA)

Abbildung 12 Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 10000 pmol/ml 2-AG

Abbildung 13 Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 1000 pmol/ml OEA

Abbildung 14	Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 1000 pmol/ml PEA
Abbildung 15	Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 2000 pmol/ml Cannabidiol (CBD)
Abbildung 16	Beispielchromatogramm einer Kalibrierprobe der Konzentration 250 pmol/ml Δ^9-THC
Abbildung 17	Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Anandamid (AEA) (a), 2-AG (b), OEA (c) und PEA (d)
Abbildung 18	Box-Whisker-Plot: Zwillinge diskordant für Schizophrenie
Abbildung 19	Box-Whisker-Plot: Zwillinge diskordant für bipolare Erkrankungen
Abbildung 20	Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Anandamid (AEA) (a), 2-AG (b), OEA (c) und PEA (d)
Abbildung 21	Graphische Darstellungen der Kalibriergeraden von Cannabidiol (CBD) (a) und Δ^9-THC (b)
Abbildung 22	Selektive MRM-Übergänge der Endocannabinoide und verwandter Lipide sowie der jeweiligen deuterierten Standards
Abbildung 23	Selektive MRM-Übergänge der Cannabinoide sowie der jeweiligen deuterierten Standards
Abbildung 24	Dosis-Wirkungskurve von Cannabidiol (CBD)/FAAH
Abbildung 25	Eicosanoidkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).
Abbildung 26	Eicosanoidkonzentrationen im Gehirngewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).
Abbildung 27	Eicosanoidkonzentrationen im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597) und dem Lösungsmittel (wässrig, ölig).
Abbildung 28	Beeinflussung der Eicosanoidkonzentrationen nach URB 597-Gabe in verschiedenen Gehirnregionen
Abbildung 29	Interaktionsgraphiken Gehirnregion*Versuchsgruppe für Anandamid

Abbildung 30 Interaktionsgraphiken Gehirnregion* Versuchsgruppe für OEA

Abbildung 31 Interaktionsgraphiken Gehirnregion* Versuchsgruppe für PEA

Abbildung 32 Δ^9-THC-Konzentration im Serum, Gehirn und Leber in Abhängigkeit von der Δ^9-THC Wirkdauer und dem Lösungsmittel.

Abbildung 33 Eicosanoidkonzentrationen im Serum in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h).

Abbildung 34 Eicosanoidkonzentrationen im Gehirngewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h)

Abbildung 35 Eicosanoidkonzentrationen im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Behandlung (THC-wässrig, THC-ölig, Vehikel) und der Wirkdauer (a= 15 min, b= 2 h)

Abbildung 36 Korrelationsgraphiken für Eicosanoidkonzentrationen Serum vs. Gehirn nach Cannabidiol (CBD)- bzw. URB 597-Behandlung im wässrigen Lösungsmittel (“CBD-wässrig”, “URB-wässrig”)

15 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Transit Zwillinge
Tabelle 2	Demographische Daten und klinische Parameter des Studienkollektivs
Tabelle 3	Konzentrationen [pmol] der Substanzen in den Kalibrierproben
Tabelle 4	Natrium-Addukte der Analyten
Tabelle 5	Versuchsgruppen der tierexperimentellen Endocannabinoidstudie
Tabelle 6	Konzentrationen [pmol/ml] der Substanzen in den Kalibrierproben
Tabelle 7	Konzentrationen [pmol/ml] der Analyten in den Qualitätskontrollproben
Tabelle 8	Konzentrationen [pmol/ml] der Substanzen in den Matrixproben
Tabelle 9	Verwendete Masse-Fragmente zur Identifizierung und Quantifizierung der Analyten
Tabelle 10	MRM-Übergänge und Werte für DP, CE und CXP der Analyten und ihrer jeweiligen internen Standards
Tabelle 11	Herstellung der Inkubationsproben
Tabelle 12	Zwillingspaare (25) diskordant für Schizophrenie - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml]
Tabelle 13	Zwillingspaare (7) diskordant für bipolare Erkrankungen - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml]
Tabelle 14	gesunde Kontrollen (8) - gemessene Konzentrationen im Plasma in [pmol/ml]
Tabelle 15	Ergebnisse der Validierung der Präzision und Richtigkeit dreier nacheinander (Intra-day-Analytik) bzw. an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Inter-day-Analytik) gemessener gleicher Konzentrationen für alle vier QC- Level von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC
Tabelle 16	Bestimmungsgrenzen (LLOQs) Validierung
Tabelle 17	Nachweisgrenzen (LODs) Validierung
Tabelle 18	Mittlere Wiederfindung (*recovery*) der Analyten Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC im Rattenhirngewebe

Tabelle 19 Stabilitätsuntersuchung von Anandamid (AEA), 2-AG, OEA, PEA, Cannabidiol (CBD) und Δ^9-THC nach eintägiger Probenlagerung im Autosampler bei 4°C

Tabelle 20 Stabilitätsuntersuchung nach Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur

Tabelle 21 Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Wiederauftauen

Tabelle 22 Stabilitätsuntersuchung nach dreimonatiger Lagerung bei -20°C

Tabelle 23 Messergebnisse Enzymassay

Tabelle 24 Ergebnisse der Korrelationen

16 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe der hier aufgeführten Personen, die auf ganz unterschiedliche Weise dazu beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Markus Leweke für die Möglichkeit danken, diese Arbeit anzufertigen. Ich danke ihm für das mir entgegen gebrachte Vertrauen, für seine fortwährende, wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Dissertation sowie für die anregenden, wissenschaftlichen Diskussionen. Darüber hinaus danke ich ihm für die Ermöglichung eines 9-monatigen Forschungsaufenthalts am Department of Pharmacology, University of California, Irvine, USA zu Beginn meiner Promotionszeit.

Ich möchte allen Kollegen der TRiP research group für die gute Zusammenarbeit danken. Ein besonders herzliches Dankeschön gilt meinen lieben Kolleginnen Frau Dr. Cathrin Rohleder und Frau Dr. Carola Schäfer für ihre Unterstützung, ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft und die großartige Zusammenarbeit, die weit über das Fachliche hinausging. Ich danke Frau Dr. Carola Schäfer für die zahlreichen, fachlichen Diskussionen, die vielen Stunden im Labor mit „the machine“ und für die heitere Atmosphäre in unserem Raum. Ich danke Frau Dr. Cathrin Rohleder für die Einführung in die Verhaltensbiologie der Ratten, für die vielen, wertvollen Diskussionen und für Ihre Geduld bei der Korrektur des Manuskripts. Ein weiterer Dank gilt Frau Privatdozent Dr. Dagmar Koethe für ihre mitreißende Begeisterung für die Psychiatrie und ihr stets offenes Ohr bei allen medizinischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationskolleginnen der AG Radiochemie und molekulare Bildgebung der Nuklearchemie der Universität zu Köln für ihre Unterstützung und für die schöne Zeit. Frau Privatdozent Dr. Heike Endepols danke ich für ihre kompetenten Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen und für ihre Korrekturen zu diesem Manuskript. Insbesondere Frau Dr. Elena Kordys danke ich sehr für ihre Unterstützung bei der statistischen Analyse der tierexperimentellen Studie und ihr aufmerksames Korrekturlesen der Dissertation. Darüber hinaus gilt Frau Dr. Elena Kordys und Frau Dr. Fabienne Jung mein Dank für die Unterstützung bei der tierexperimentellen Studie.

Die Arbeiten zur Zwillingsstudie sowie der FAAH Enzymassay mit Cannabidiol wurden am Department of Pharmacology, University of California, Irvine, USA durchgeführt. Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Daniele Piomelli für die freundliche Aufnahme in seine internationale Arbeitsgruppe und die Gelegenheit, in seinem Labor zu arbeiten. Die zahlreichen Diskussionen wissenschaftlicher Fragestellungen mit ihm waren sehr inspirierend. Ich danke Frau Dr. Regina Mangieri für ihre Hilfe bei der

Aufbereitung der Plasmaproben sowie Herrn Dr. Giuseppe Astarita für seine kompetente Unterstützung bei LC-MS Fragen im Rahmen der Zwillingsstudie. Mein Dank gilt Frau Azar Ghomian und Herrn Dr. Jason Clapper, die mir bei der Durchführung des FAAH Enzymassays zur Seite standen. Außerdem danke ich allen weiteren Wissenschaftlern und Mitarbeitern aus Prof. Piomellis Labor für die unvergessliche Zeit in Orange County. Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Ana Guijarro, die mich nicht nur fachlich unterstützte, sondern auch als Freundin immer wieder zum Lachen brachte.

Mein Dank gilt Herrn Dr. E. Fuller Torrey, Stanley Medical Research Institute, Bethesda, USA für die Bereitstellung der Plasmaproben der Zwillingsstudie.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Hellmich herzlich für seine freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Zwillingsstudie.

Die Arbeiten zur tierexperimentellen Endocannabinoidstudie erfolgten am Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Fuhr für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Kooperation. Ich danke allen Mitarbeitern der AG Fuhr für die freundschaftliche Atmosphäre, insbesondere Herrn Dr. Dennis Rokitta für sein immer offenes Ohr bei allen LC-MS/MS-Fragen sowie Frau Lisa Junge, Frau Dr. Daria Kraus und Frau Dr. Paola Di Gion für ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft und für die heiteren Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andrea Giuffrida für seine zahlreichen, hilfreichen Antworten und kompetenten Ratschläge bei allen analytischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich sehr für die freundliche Betreuung und Unterstützung sowie die Stellungsnahme zu dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Torsten Noack-Schönborn für seine Unterstützung beim Layout der Dissertation.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich an dieser Stelle von ganzem Herzen für Ihren immerwährenden Glauben in mich und ihre stets vorhandene Unterstützung in jeglichen Belangen. Herrn Stefan Mommertz danke ich ebenso für seine Mithilfe. Meinen Töchtern gilt ein ganz besonderer Dank für das geduldige Ertragen meiner Abwesenheit und dafür, dass sie mir zeigen, was wirklich wichtig im Leben ist. Meinen Freunden danke ich für ihr immer offenes Ohr und ihre emotionale Unterstützung.