

Aus dem Institut
für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Die Wirkung von Cannabinoiden auf das Herz-Kreislauf-System und die Atmung von Ratten



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Torsten Pfitzer
geboren in Kirchheim/Teck

2005

Dekan:	Prof. Dr. H. Hillebrecht
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. G. E. Schulz
Leiter der Arbeit:	Prof. Dr. Bela Szabo
Referent:	Prof. Dr. Rolf Schubert
Korreferent:	Prof. Dr. Bela Szabo

Tag der mündlichen Prüfung:	31. Januar 2005
Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:	03. Februar 2005

Herrn Prof. Dr. Bela Szabo möchte ich besonders danken für die Überlassung des interessanten Themas auf einem aktuellen Forschungsgebiet. Sein stetes Interesse und Engagement, zahlreiche wertvolle Anregungen und vor allem die ständige Bereitschaft zu Diskussion und Kritik haben zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Nathalie Niederhoffer gilt mein herzlicher Dank für die Einführung in die experimentelle Methodik, die intensive Betreuung und fachkundige Unterstützung. Die ausgesprochen gute und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor hat meine Zeit als Doktorand bereichert und wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert danke ich für die Gelegenheiten, meine Ergebnisse in seinem überaus sympathischen Arbeitskreis vorstellen zu dürfen und für die freundliche Übernahme und zügige Erstellung des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. Klaus Starke möchte ich für die Aufnahme in seine Abteilung und sein Interesse an unseren Fragestellungen danken.

Frau Birgit Engler, Herrn Dr. Markus Glänzel, Herrn Werner Klebroff sowie allen anderen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Freundlichkeit. Insbesondere Frau Claudia Schurr für die Bestimmungen der Plasmanoradrenalin-Konzentrationen sowie Herrn Dr. Markus Glänzel für die anregenden Diskussionen während der Zeit des 'Zusammenschreibens'.

Herrn Christian Geiger bin ich für die Unterstützung bei der Umkristallisierung von WIN55212-2 sehr dankbar.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden möchte ich besonders für die Unterstützung und Begleitung während des Studiums und der Doktorarbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Teile vorliegender Arbeit wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ni 644/1-1; Sz 72/5-1) unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

PFITZER T, NIEDERHOFFER N & SZABO B (2004). Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *Br. J. Pharmacol.* 142:943-952

PFITZER T, NIEDERHOFFER N & SZABO B (2004). Search for an endogenous cannabinoid-mediated effect in the sympathetic nervous system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* Im Druck

Kongressbeiträge:

SZABO B, PFITZER T & NIEDERHOFFER N (2002). Central respiratory effects of cannabinoids in rats. *2002 Symposium on the Cannabinoids*, International Cannabinoid Research Society, Burlington, Vermont, S157

PFITZER T, NIEDERHOFFER N & SZABO B (2003). Respiratory effects of cannabinoids in rats: comparison with opioids. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367:R105

PFITZER T & SZABO B (2004). Search for an endogenous cannabinoid-mediated effect in the sympathetic nervous system. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369:R25

„Heute wissen Ärzte, Psychologen und Pharmakologen über Cannabis nicht viel mehr als damals (1971). Aber das ist – so paradox es klingt – ein beträchtlicher Fortschritt.“

(„Von der Aussteiger- zur Alltagsdroge“, Bericht über die Fachkonferenz zu Risiken des Cannabis-Gebrauchs, FAZ , 2. Dezember 2004)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
	1.1 Cannabis – ein historisches Heilmittel	1
	1.2 Pharmakologie der Cannabinoide	4
	1.2.1 Rezeptoren und deren Verteilung	4
	1.2.2 Signaltransduktion	6
	1.2.3 Liganden an Cannabinoidrezeptoren und das Endocannabinoid-System	7
	1.3 Kardiovaskuläres System & Cannabinoide	12
	1.4 Respiratorisches System & Cannabinoide	15
	1.5 Wirkung von Cannabinoiden und deren therapeutischer Nutzen	17
	1.6 Pharmazeutisches Recht & Cannabinoide	19
	1.7 Ziele der Arbeit	21
	1.7.1 Bestimmung der Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System	22
	1.7.2 Bestimmung der Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung	23
	1.7.3 Bestimmung der Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung	23
2	METHODEN UND MATERIAL	25
	2.1 Versuchstiere	25
	2.2 Anästhesie	25
	2.2.1 Experimente mit anästhesierten Tieren	25
	2.2.2 Experimente mit despinalisierten Tieren	26

2.3 Chirurgische Präparation	26
2.3.1 Katheterisierung der Luftröhre	26
2.3.2 Implantation des Intracisternal-Katheters	27
2.3.3 Katheterisierung der Femoralgefäße	30
2.3.4 Katheterisierung der Carotisarterien und Jugularvenen	31
2.3.5 Vorbereitung zur spinalen Stimulation	31
2.3.6 Implantation des renalen Durchflussmessers und der renalen Stimulationselektrode	32
2.4 Messung der Parameter	34
2.4.1 Körpertemperatur	34
2.4.2 Arterieller Blutdruck und Herzfrequenz	34
2.4.3 Plasmanoradrenalin-Konzentration	34
2.4.3.1 Probengewinnung	34
2.4.3.2 Probenaufbereitung	36
2.4.3.3 HPLC	36
2.4.3.4 Analytische Trennung und quantitative Bestimmung	37
2.4.4 Atmung	39
2.4.4.1 Messkette	39
2.4.4.2 Prinzip des Pneumotachometers	39
2.4.5 Nierenblutfluss und renaler vaskulärer Widerstand	41
2.4.5.1 Messprinzip des Durchflussmessers	41
2.4.5.2 Verhinderung der Störanfälligkeit	42
2.5 Versuchsabläufe und -protokolle	43
2.5.1 Experimente zur Bestimmung der Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System	43
2.5.2 Experimente zur Bestimmung der Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung	44
2.5.2.1 Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus	44
2.5.2.2 Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus und i.v.-Infusion	45
2.5.2.3 Despinalisierte Ratten mit einer blutdrucksteigernden Infusion von Noradrenalin	45

2.5.3	Experimente zur Bestimmung der Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung	46
2.5.4	Verifizierung der adrenerg vermittelten Wirkung bei postganglionärer Stimulation des Nierensympathikus	47
2.5.5	Verifizierung der präganglionären Stimulation	47
2.6	Materialien	48
2.6.1	Substanzen	48
2.6.2	Geräte	51
2.7	Statistik	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System	53
3.1.1	Referenzwerte (PRE-Werte)	53
3.1.2	Kontroll-Experimente	55
3.1.3	Wirkungen von WIN55212-2 und WIN55212-3	58
3.1.4	Wirkungen von DAMGO	60
3.1.5	Interaktion zwischen WIN55212-2 und Rimonabant oder Naloxon	61
3.1.6	Verifizierung der korrekten Lokalisation des Katheters in der Cisterna magna	63
3.2	Die Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikus-Regulierung	64
3.2.1	Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus	64
3.2.1.1	Wirkungen von Rimonabant auf die sympathische Neuro-Effektor-Transmission	64
3.2.1.2	Wirkungen von WIN55212-2 auf die sympathische Neuro-Effektor-Transmission	70
3.2.2	Verifizierung der präganglionären Stimulation	72
3.3	Die Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung	73
3.3.1	Referenzwerte (PRE-Werte)	73

3.3.2	Basal-Werte	75
3.3.3	Kontroll-Experimente	78
3.3.4	Wirkungen von WIN55212-2	80
3.3.5	Interaktion zwischen WIN55212-2 und Rimonabant	81
3.3.6	Verifizierung der adrenerg vermittelten Wirkung bei postganglionärer Stimulation des Nierensympathikus	81
3.3.7	Verifizierung der präganglionären Stimulation	84
4	DISKUSSION	85
4.1	Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System	85
4.1.1	Respiratorische Wirkungen	85
4.1.2	Kardiovaskuläre Wirkungen	87
4.2	Die Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung	89
4.3	Die Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung	92
4.4	Allgemeines	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Δ^9 -THC	(-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
°C	Grad Celsius
Abb.	Ab bildung
BP	<i>blood pressure</i> (pulsierender arterieller Blutdruck)
bpm	<i>beats per minute</i> (Schläge pro Minute)
CB ₁	Typ-1-Cannabinoidrezeptor
CB ₂	Typ-2-Cannabinoidrezeptor
cm	C entimeter
DMSO	D imethylsulfoxid
g	G ramm
GABA	γ -Amino-buttersäure
h	Stunde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR	<i>heart rate</i> (Herzfrequenz)
Hz	H ertz
i.c.	<i>intracisternal</i> (in die Cisterna magna)
i.v.	<i>intravenös</i> (in die Vene)
kg	K ilogramm
kHz	K ilohertz
K _i	inhibitorische K onstante
l	L iter
mA	M illiampere
MAP	<i>mean arterial pressure</i> (mittlerer arterieller Blutdruck)
mg	M illigramm
MHz	M egahertz
ml	M illiliter
μ l	Mikroliter
mm	M illimeter
mmHg	M illimeter Quecksilbersäule
mmH ₂ O	M illimeter Wassersäule
mol	Stoffmenge in Mol

MRF	<i>mean renal flow</i> (mittlerer renaler Blutfluss)
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
n	Anzahl der Experimente
NaCl-Lsg.	Natriumchlorid-Lösung
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NX	Naloxon
P	<i>P</i> -Wert (in der Statistik)
pg	Picogramm
pH	<i>potential of Hydrogen</i> (negativer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration in mol pro l)
PIF	<i>peak inspiratory flow</i> (Peak-Luftstrom während der Einatmung)
PL-NA	Plasmanoradrenalin
PNS	Peripheres Nervensystem
PRE	Referenzwerte, auf die sich statistische Auswertungen beziehen
PRF	<i>pulsating renal flow</i> (pulsierender renaler Blutfluss)
PTM	Pneumotachometer
RIM	Rimonabant (SR141716A)
rn	renale Stimulation
RR	<i>respiratory rate</i> (Atemfrequenz)
RVR	<i>renal vascular resistance</i> (renaler vaskulärer Widerstand)
s	Sekunde
SAL	NaCl-Lsg. (Lösungsmittel)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardabweichung des Mittelwertes)
SOL	<i>solvent</i> (Lösungsmittel der Cannabinoide)
sp	spinale Stimulation
SR141716A	N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorphenyl)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid-HCl; (Rimonabant)
V	Volt
V_E	Atemminutenvolumen
V_T	<i>tidal volume</i> (Atemzugvolumen)
vs.	<i>versus</i> (gegenüber)

WIN55212-2 (WIN-2)	R(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanon mesylat
WIN55212-3 (WIN-3)	S(-)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanon mesylat
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Cannabis – ein historisches Heilmittel

Allgemein gilt, dass die Heimat der Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. (Familie *Cannabaceae*; **Abbildung 1.1**) in Zentralasien zu suchen ist. Exakte Angaben über den Zeitpunkt und die Herkunft sind schwierig. 8000 v. Chr. dienten die Fasern der Pflanze vor allem zur Herstellung von Textilien und Seilen, daneben fand der Samen als Nahrungsmittel und Öllieferant Verwendung. Die Bezeichnung „Cannabis“ geht auf die Assyrer (circa 1700 v. Chr.) zurück, die in ihren Schriften die Hanfpflanze als „Qunnu-Bum“ (würzige Rohrpflanze) bezeichneten.



Abbildung 1.1: Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L.

1. Spitze der blühenden männlichen Pflanze. 2. Spitze der fruchttragenden weiblichen Pflanze. 3. Sämling. 4. Teilblatt eines großen, elfteiligen Blattes. 5. Teil des männlichen Blütenstandes mit Knospen und ausgereifter männlicher Blüte. 6. Weibliche Blüten mit aus dem Deckblatt herausragenden Narben. 7. Frucht, in ausdauerndem behaartem Deckblatt eingeschlossen. 8. Seiten- und Kantenansicht der Frucht. 9. Drüsenhaar. 10. Nichtdrüsiges Haar.

Neben seiner Bedeutung als Nutzpflanze besitzt der Hanf auch eine lange Tradition als Heilpflanze. Das erste fragmentarische Dokument über Cannabis als Medizin erschien vor ungefähr 5000 Jahren in China, wo es gegen Malaria,

Darmträgheit, rheumatische Schmerzen sowie bei der Entbindung und, mit Wein gemischt, als Analgetikum für Operationen empfohlen wurde. Von China scheint die Pflanze um 800 vor Christus nach Indien gelangt zu sein. Nachfolgende Aufzeichnungen geben Hinweise über deren Verwendung in Asien, dem mittleren Osten, Südafrika und Südamerika.

In der Antike war den Griechen und Lateinern Cannabis sowohl als Faserlieferant als auch als vielfältiges Heilmittel ein Begriff. Der römische Arzt Galen beschrieb bereits im 2. Jahrhundert nach Christus neben der „Förderung der Fröhlichkeit“ auch die medizinische Wirkung des Brennesselgewächses. Mit der Überlieferung der klassisch-antiken Medizinkonzepte in die arabische Welt wiesen bereits um 1000 nach Christus einige Gelehrte auf einen großen Missbrauch von Haschisch hin.

Schon seit dem 6. Jahrhundert gilt Cannabis als Heilmittel bei Appetitlosigkeit, Asthma oder Migräne und beeinflusst damit die europäische Medizin seit mittlerweile 16 Jahrhunderten.

Die weltweite Verbreitung der Pflanze im 18. und 19. Jahrhundert basierte vor allem auf der praktischen Nutzung der Hanffasern für Textilien und Schiffstapen.

Wie bereits in den vorangegangenen Epochen wurde auch im 18. Jahrhundert von der Arzneipflanze *Cannabis sativa* L. fast ausschließlich, wie in der Volksmedizin üblich, der Samen in Form des Öls oder einer Emulsion medizinisch verwendet. *Cannabis sativa* L. war eines der ersten homöopathischen Arzneimittel überhaupt und wurde von Samuel Hahnemann bereits 1811 in seiner „Reinen Arzneimittellehre, Erster Theil“ erwähnt. Im Jahr 1839 setzt der in Indien stationierte irische Arzt O`Shaughnessy diverse Hanfpräparate mit zum Teil großem Erfolg bei Indikationen wie Rheumatismus, Tollwut, Cholera, Starrkrampf, Krämpfe und Delirium tremens ein. Ebenfalls in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts fanden Zubereitungen aus Hanf Eingang in die Arzneibücher sowohl Europas als auch Amerikas. Das Ergänzungsbuch zum 6. Deutschen Arzneibuch aus dem Jahre 1941 enthielt „Tinctura Cannabis indicae“ – Indischhanftinktur.

Mitte des 19. Jahrhunderts gehörte Cannabis dank der Arbeit des deutschen Bernhard Fronmüller (\"Klinische Studien über die schlafmachende Wirkung der narkotischen Arzneimittel\") in Westeuropa in jede Hausapotheke – als wirksames Mittel gegen Müdigkeit und Schlafstörungen. Diese Zeit führte zur ersten fabrikmäßig hergestellten Cannabiszubereitung, dem „Cannabin“, sowie der Asthmazigarette und

dem bekannten Schlafmittel „Bromidia“. Weltweit begannen viele Unternehmen, darunter die Firma E. Merck in Darmstadt, hochwertige Rohstoffe und Fertigarzneien zu produzieren, die bei Indikationen wie Schmerzzustände, Keuchhusten, Asthma, Schlaf- und Ruhelosigkeit, Appetitlosigkeit, Depressionen und einigen mehr verwendet wurden. Der sogenannte „Indian Hemp Report“ der Engländer von 1894 lieferte einen außerordentlich wichtigen wissenschaftlichen Beitrag zur Cannabisforschung. Hierin ging es darum, die Gewinnung, den Handel und die Auswirkung von Drogen aus Cannabis auf die Bevölkerung zu untersuchen. So kann die Zeitspanne von 1880 bis 1900 als Höhepunkt der Verwendung der Hanfpräparate sowie als beträchtlicher Fortschritt der Cannabisforschung bezeichnet werden.

Im 20. Jahrhundert modernisierte der rasante naturwissenschaftliche Fortschritt die Pharmakologie. Während die Cannabispräparate um die Jahrhundertwende noch häufig benutzt wurden, verschwanden sie gegen Mitte des 20. Jahrhunderts vollständig. Neue, synthetisch hergestellte Arzneimittel wie Acetylsalicylsäure eroberten den Markt und drängten die medizinische Bedeutung von Hanf zurück. Weitere Gründe waren die Schwierigkeit der Standardisierung, wirtschaftliche Aspekte und rechtliche Einschränkungen.

Da nun der Gebrauch als Rauschdroge stark zunahm, wurde die Pflanze in vielen Ländern den Betäubungsmittelgesetzen unterstellt, so in Deutschland 1951 (von 1982 bis 1996 herrschte hier sogar ein Anbauverbot). Als 1964 die Aufklärung der chemischen Struktur des blass-gelben Harzes (-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) gelang (Gaoni & Mechoulam 1964), waren Hanfzubereitungen aus den Arzneibüchern der westlichen Industrieländer weitgehend wieder verschwunden. Auch der Faserhanf wurde zurückgedrängt von billigeren Fasern wie Sisal, Baumwolle oder Jute.

In den letzten 50 Jahren bewahrte die Wissenschaft zwar ihr Interesse an Cannabis, therapeutische Erfahrungen aus dieser Zeit wurden jedoch überwiegend außerhalb der medizinischen Fachliteratur erörtert. Seit einigen Jahren drängen jedoch immer mehr Wissenschaftler und Ärzte darauf, deutlicher zwischen der Rausch- und der Heilwirkung zu unterscheiden. In Studien wird derzeit geprüft, ob die Heilwirkungen von Cannabis streng kontrollierten, klinischen Bedingungen Stand halten können.

1.2 Pharmakologie der Cannabinoide

1.2.1 Rezeptoren und deren Verteilung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden große Fortschritte bei der Identifizierung und Charakterisierung der Cannabinoidrezeptoren und des endogenen Cannabinoidsystems (Endocannabinoidsystems) gemacht.

Da Cannabinoide sehr lipophil und nicht wasserlöslich sind, dachte man lange, ihre pharmakologischen Eigenschaften beruhen auf ihrer Fähigkeit, die Struktur der Phospholipidbestandteile von biologischen Membranen zu beeinflussen (Pertwee 1988). Obwohl diese Art der Wirkung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, ist nun klar, dass der wichtigste Mechanismus vieler Effekte der Cannabinoide wesentlich spezifischer ist: Cannabinoide üben ihre biologische Wirkung über Rezeptor-vermittelte Mechanismen aus (Howlett 1995; Pertwee 1997). Der erste Beweis für Cannabinoidrezeptoren wurde 1986 gefunden (Howlett *et al.* 1986). Forscher berichteten, dass Cannabinoide die Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) hemmten, was auf einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus hindeutete. Zwei Subtypen von Cannabinoidrezeptoren, CB₁ und CB₂, wurden bisher eindeutig identifiziert. Es bestehen jedoch Hinweise auf die Existenz weiterer Cannabinoidrezeptor-Subtypen (Shire *et al.* 1995; Di Marzo *et al.* 2000; Breivogel *et al.* 2001).

1990 klonierten Forscher den CB₁-Cannabinoidrezeptor, identifizierten seine DNS-Sequenz und bestimmten seine Lokalisation im Gehirn (Herkenham *et al.* 1990; Matsuda *et al.* 1990). Es wurde herausgefunden, dass die Aminosäuresequenz des CB₁-Cannabinoidrezeptors mit einer für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typischen Tertiärstruktur übereinstimmt. In der Tat hemmen Cannabinoidrezeptor-Agonisten über Aktivierung von CB₁-Rezeptoren die Adenylatzyklaseaktivität konzentrationsabhängig, stereoselektiv und in Pertussistoxin-sensitiver Weise (Matsuda *et al.* 1990). Sowohl der CB₁- als auch der drei Jahre später entdeckte CB₂-Rezeptor (Munro *et al.* 1993) gehören somit zur Klasse der heptahelikalen G_vo-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Zwischen der Aminosäuresequenz der beiden Cannabinoidrezeptor-Subtypen besteht eine Homologie von 44% insgesamt und von 68% innerhalb der transmembranären Domäne, die an der Ligandenerkennung maßgeblich beteiligt ist (Fichera *et al.* 2000). Vergleicht man die Rezeptoren verschiedener Spezies, so findet man weitgehende Homologien. So zeigt der

CB₁-Rezeptor bei Mensch und Ratte z.B. eine Homologie von 97,3% insgesamt und sogar 100% innerhalb der transmembranären Regionen (Gerard *et al.* 1991).

Der CB₁-Rezeptor wurde ursprünglich im Gehirn der Ratte beschrieben (Devane *et al.* 1988) und als der „zentrale Cannabinoidrezeptor“ bezeichnet. Jedoch wurden ein paar Jahre später Cannabinoid-CB₁-Bindungsstellen (Pertwee 1997) und Immunreaktivität (Kulkarni-Narla & Brown 2000) auch in peripheren Geweben gefunden, wo kurz zuvor auch von Cannabinoid-CB₁-Transkripten berichtet wurde (Bouaboula *et al.* 1993, Galiègue *et al.* 1995). So treten sie in der Peripherie an sensorischen Neuronen sowie endokrinen Drüsen, Leukozyten, Milz, Herz und einigen Abschnitten des Reproduktions-, Harn- und Gastrointestinaltraktes auf (Pertwee 1997). Einige CB₁-Rezeptoren befinden sich auch auf zentralen und peripheren Nervenendigungen (Ong & Mackie 1999; Pertwee 1997; Tsou *et al.* 1998), wo sie vermutlich die Neurotransmitterfreisetzung modulieren. Innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) können die ungleichmäßigen Verteilungsmuster der CB₁-Rezeptoren einige pharmakologische Eigenschaften von Cannabinoiden erklären (Breivogel & Childers 1998). So sind die Großhirnrinde und die Basalganglien, besonders Substantia nigra pars reticulata und Globus pallidus, sowie die Molekularschicht des Cerebellums besonders reich an CB₁-Cannabinoidrezeptor-Bindungsstellen. Über diese Rezeptoren vermitteln CB₁-Rezeptor-Agonisten ihre bekannte Fähigkeit der Veränderung motorischer Funktionen (DeSanty & Dar 2001). Auch der Hippokampus, der eine zentrale Rolle für Gedächtnis- und Lernvorgänge spielt, weist eine hohe Dichte an CB₁-Rezeptoren auf (Herkenham *et al.* 1990; Hampson & Deadwyler 1999). Demgegenüber findet man in der Medulla oblongata und der Brücke, in denen lebenswichtige Kreislauf- und Atemregulationszentren lokalisiert sind, etwas weniger CB₁-Rezeptoren (Herkenham 1990; Mailleux & Vanderhaegen 1992; Tsou *et al.* 1998; Padley *et al.* 2003).

1993 wurde ein Cannabinoidrezeptor außerhalb des Gehirns entdeckt – der CB₂-Rezeptor (Munro *et al.* 1993). Er ist bislang weniger gut beschrieben, wird aber nicht mit neuronalem Gewebe in Zusammenhang gebracht und scheint ein peripherer Rezeptor zu sein. CB₂-Rezeptoren werden vor allem von Zellen des Immunsystems, beispielsweise Leukozyten, in der Milz und in Tonsillen exprimiert (Pertwee 1997). Das läßt vermuten, dass Cannabinoide naturgemäß als Immunmodulatoren wirken. Jedoch ist die genaue Rolle der CB₂-Rezeptoren bisher nicht geklärt.

1.2.2 Signaltransduktion

Sowohl der CB₁- als auch der CB₂-Rezeptor sind in Zellmembranen eingebettet. Bindet ein Cannabinoid-Agonist an den Rezeptor, läuft eine Reihe von Reaktionen ab. Zuerst werden G_{α_{i/o}}-Proteine aktiviert, was zu verschiedenen intrazellulären Veränderungen führt (Howlett *et al.* 2002). Zum Beispiel wird das Enzym Adenylatzyklase gehemmt und folglich die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erniedrigt (Howlett *et al.* 1986; Felder *et al.* 1995). Die verminderte cAMP-Konzentration führt zu Veränderungen im Phosphorylierungsmuster zellulärer Effektorproteine, die Zellprozesse steuern. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen CB₁- (nicht jedoch CB₂-) induzierte Veränderungen der Leitfähigkeiten verschiedener Ionenkanäle. CB₁-Rezeptoren sind negativ an N- und P/Q-Typ-Kalziumkanäle (Caulfield & Brown 1992; Mackie & Hille 1992; Mackie *et al.* 1995) sowie positiv an sowohl A-Typ auswärtsgerichtete (Deadwyler *et al.* 1993) als auch einwärtsgerichtete Kaliumkanäle gekoppelt (Henry & Chavkin 1995; Mackie *et al.* 1995). CB₁-Rezeptoren können zudem Arachidonsäure mobilisieren und schließen 5-HT₃-Rezeptor-Ionenkanäle (Barann *et al.* 2002; für ein Review siehe Pertwee 1997). Außerdem aktivieren sie unter bestimmten Bedingungen die Adenylatzyklase über G_s-Proteine (Calandra *et al.* 1999; Glass & Felder 1997). Darüber hinaus sind einige CB₁-Rezeptoren nach einer jüngeren Beobachtung negativ an M-Typ-Kaliumkanäle gekoppelt (Schweitzer 2000). Es gibt zudem Hinweise aus Experimenten an Katzen, dass CB₁-Rezeptoren negativ an Dihydropyridin-sensitive L-Typ-Kalziumkanäle auf glatten Muskelzellen von Hirnarterien gekoppelt sind (Gebremedhin *et al.* 1999).

Diese Veränderungen der Leitfähigkeiten verschiedener Ionenkanäle bewirken eine Modulation der Transmitterfreisetzung (für eine Übersicht s. Wallmichrath & Szabo 2004). So wurde postuliert, dass eine Aktivierung präsynaptischer Cannabinoidrezeptoren über eine Erniedrigung der Kalziumleitfähigkeit die Transmitterfreisetzung hemmt (Guo & Ikeda 2004; Engler *et al.* unveröffentlichte Daten) (**Abbildung 1.2**, S. 7). Ähnlich könnten Cannabinoide durch eine Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle das Membranpotential erniedrigen und so die Generation und Fortleitung von Aktionspotentialen unterdrücken (Mackie *et al.* 1995; Guo & Ikeda 2004) (**Abbildung 1.2**). Eine weitere Möglichkeit der durch Cannabinoide vermittelten Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung wäre eine

Interaktion mit den für die Vesikel/Zellmembran-Verschmelzung verantwortlichen SNARE-Proteinen (**Abbildung 1.2**).

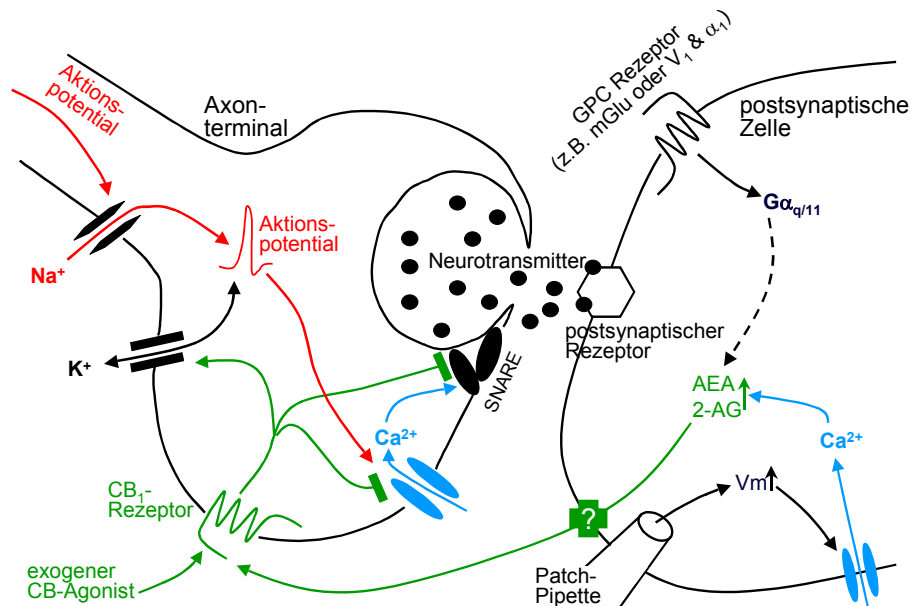


Abbildung 1.2: Signaltransduktion an präsynaptischen CB_1 -Rezeptoren und retrograde Signalübertragung durch Endocannabinoide.

2-AG: 2-Arachidonoylglycerol; α_1 : α_1 -adrenerger Rezeptor; AEA: Anandamid; GPC receptor: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; mGlu: metabotroper Glutamat-Rezeptor; V_1 : Vasopressin-Typ-1-Rezeptor; $Vm\uparrow$: Depolarisation.

1.2.3 Liganden an Cannabinoidrezeptoren und das Endocannabinoid-System

Chemisch werden Cannabinoide definiert als eine Gruppe von C_{21} -Verbindungen der Cannabispflanze, deren Carboxylsäuren, Analoga und Transformationsprodukte. Der erweiterte biochemisch-funktionelle Begriff beinhaltet zusätzlich alle Substanzen, die an Cannabinoidrezeptoren binden. Das sind sowohl eine Vielzahl charakteristischer und spezifischer Inhaltsstoffe der Cannabispflanze als auch endogene oder auf synthetischem Weg gewonnene Liganden. Im weitesten Sinne zählen auch Fettsäureamidhydrolasehemmer, die die Anhäufung von endogenen Cannabinoiden fördern, zu den Cannabinoiden.

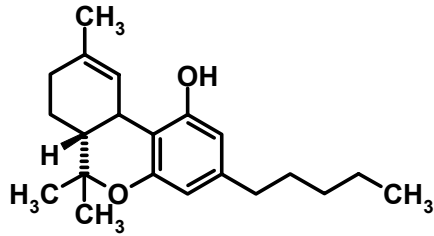
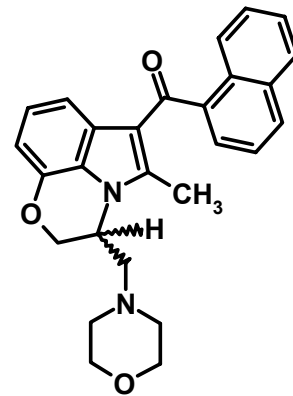
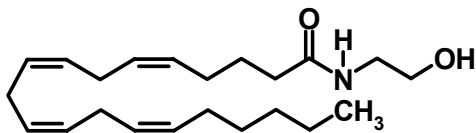
Phytocannabinoide. Erst um 1850 wurden in Europa nähere Untersuchungen vorgenommen, um die Wirkstoffe der Hanfpflanze zu analysieren. Nahezu 500 Inhaltsstoffe finden sich in einer Hanfpflanze, rund 66 kommen ausschließlich darin

vor. Die Cannabinoide stecken vor allem in den weiblichen Pflanzen, die deshalb als Rausch- und Heilmittel bevorzugt werden. Verwenden lassen sich die getrockneten Blätter und Blüten (Marihuana), aber auch das von Drüsen abgesonderte Harz (Haschisch) oder Hanföl. Die natürlichen Cannabinoide gehören zur Obergruppe der Terpene. Der C₂₁-Grundkörper der natürlichen Cannabinoide enthält als wesentliche Bausteine ein Phenol und ein Monoterpen (Mechoulam 1973). Zu den wichtigsten klassischen Cannabinoiden, die in der Hanfpflanze vorkommen, gehören das psychotrop wirkende Δ^9 -THC (**Abbildung 1.3**, S. 9; **Tabelle 1**), der Hauptwirkstoff des Hanfs, und das Cannabidiol, eine antibiotisch wirksame biosynthetische Vorstufe des Δ^9 -THC. Cannabidiol und Cannabinol, ein Oxidationsprodukt des Δ^9 -THCs, wirken nicht psychotrop (Hollister 1974). Das ebenfalls aktive Isomer Δ^8 -THC trägt wegen seiner geringen Menge nur wenig zur psychotropen Wirkung des Pflanzenextrakts bei.

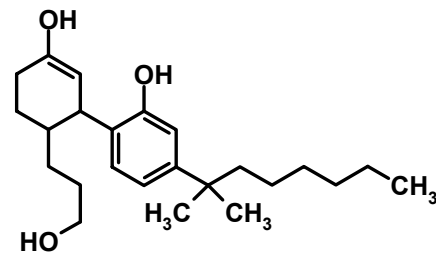
Tabelle 1: Affinitäten verschiedener Liganden an den Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂.

	CB₁-Rezeptor K_i [nM]	CB₂-Rezeptor K_i [nM]
Δ^9-THC	40.7	36.4
Anandamid	89	371
CP55940	0.58	0.69
R(+)-WIN55212-2	1.89	0.28
S(+)-WIN55212-3	> 3500 ^a	> 1000 ^a
Rimonabant (SR141716A)	12.3	702

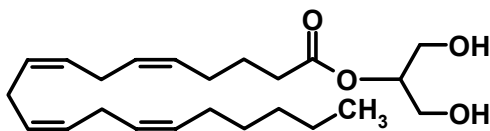
nach Showalter *et al.* 1996 und ^aPertwee 1999; K_i: inhibitorische Konstante

 Δ^9 -THCR(+)-WIN55212-2
S(-)-WIN55212-3

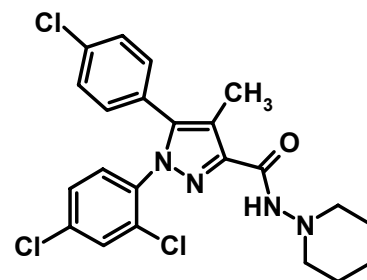
Anandamid



CP55940



2-Arachidonoylglycerol



Rimonabant (SR141716A)

Abbildung 1.3: Strukturformeln

des klassischen Cannabinoids Δ^9 -THC, der endogenen Cannabinoide Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol, der synthetischen Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 und CP55940 und des synthetischen Cannabinoid-Antagonisten Rimonabant (SR141716A).

Endocannabinoidsystem. Die Existenz von Cannabinoidrezeptoren legt nahe, dass endogene (körpereigene) Cannabinoide existieren. 1992 entdeckten Wissenschaftler einen ersten endogenen Cannabinoid-Liganden (Devane *et al.* 1992), der ähnliche Effekte wie Δ^9 -THC aufweist. Sie benannten dieses Endocannabinoid „Anandamid“ (Arachidonoylethanolamid; AEA) (**Abbildung 1.3**, S. 9; **Tabelle 1**, S. 8), nach „ananda“, dem sanskritischen Wort für Glückseligkeit (Devane *et al.* 1992). Die Entdeckung des Eicosanoids Anandamid im Zusammenwirken mit den zwei Cannabinoidrezeptoren war entscheidend für das Aufdecken eines endogenen Cannabinoid-Systems. Drei Typen endogener Cannabinoide wurden bislang identifiziert: die Amide (z.B. Anandamid), die Glycerole (z.B. 2-Arachidonoylglycerol) (**Abbildung 1.3**) und die Ether (Noladinether) (Hanus *et al.* 2001). Alle bekannten Endocannabinoide sind Metabolite der Arachidonsäure, einer endogenen Fettsäure. Sie werden in Neuronen, im Gefäßendothel, in zirkulierenden Makrophagen, Monozyten und Blutplättchen gebildet (Wagner *et al.* 1998; Hillard 2000).

Die Endocannabinoide können offenbar als Neuromodulatoren fungieren. In den letzten drei Jahren wurden Forschungsergebnisse publiziert, die einen Einblick in die molekularen Mechanismen dieser Funktion an zentralen (v.a. GABAergen) Neuronen gewähren (Wilson & Nicoll 2002; Freund *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass endogene Cannabinoide bei Bedarf durch postsynaptische Depolarisation von Neuronen (Wilson & Nicoll 2001; Wallmichrath & Szabo 2002) sowie über Aktivierung $G_{\alpha_q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren (z.B. Maejima *et al.* 2001; Kim *et al.* 2002) synthetisiert, über einen noch unbekanntem Mechanismus freigesetzt werden und anschließend über eine retrograde Transmission an präsynaptischen CB_1 -Rezeptoren hemmend auf die Neurotransmitterfreisetzung wirken (**Abbildung 1.2**, S. 7). Dieser Mechanismus wird an GABAergen Neuronen als „depolarisation-induced suppression of inhibition“ (DSI) bezeichnet (Wilson & Nicoll 2001; Wallmichrath & Szabo 2002). Eine entsprechende präsynaptische Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch Endocannabinoide wird an sympathisch adrenergen Neuronen diskutiert (Christopoulos *et al.* 2001; Schlicker *et al.* 2003; s. Kapitel 1.7.2, Abschnitt 2). Außer CB_1 - und CB_2 -Rezeptoren können auch andere Rezeptoren im Gehirn und an Gefäßen, z.B. Vanilloid-Rezeptoren (VR_1), die Wirkungen der Endocannabinoide vermitteln (Zygmunt *et al.* 1999; Szallasi & Di Marzo 2000; Hillard *et al.* 2000).

Einmal freigesetzt, werden die Endocannabinoide schnell aus dem Extrazellularraum entfernt. Für Anandamid hängt dieses Entfernen von einem Carrier-vermittelten Aufnahmeprozess in Nervenzellen und Astrozyten ab (Di Marzo *et al.* 1998; Piomelli *et al.* 2000). In der Zelle werden sowohl Anandamid als auch 2-Arachidonoylglycerol durch das mikrosomale Enzym Fettsäureamidhydrolase zu Arachidonsäure und Ethanolamin hydrolysiert (Di Marzo *et al.* 1998; Piomelli *et al.* 2000).

Synthetische Cannabinoide. Die Entdeckung dieses neuen Neurotransmitter-/Neuromodulatorsystems verstärkte das Interesse an der pharmakologisch-toxikologischen und klinischen Erforschung der Cannabinoide. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der klassischen Cannabinoide, die zu experimentellen Schwierigkeiten führen kann, wurde eine Vielzahl weniger hydrophober, höher-affiner sowie zum Teil selektiver Cannabinoidrezeptor-Liganden synthetisiert. Häufig verwendet als experimentelle Werkzeuge zur Erforschung Cannabinoidrezeptor-vermittelter Wirkungen werden die synthetischen Cannabinoidrezeptor-Liganden CP55940 und WIN55212-2 (Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002) (**Abbildung 1.3**, S. 9; **Tabelle 1**, S. 8). Letzteres ist ein 1991 von der Firma Sterling-Winthrop zufällig bei der Suche nach neuen Indometacinderivaten entdecktes Aminoalkylindol mit geringer Selektivität für CB₂-Rezeptoren (Howlett 1995) (**Tabelle 1**). Das nicht-klassische Cannabinoid CP55940 wurde, von der Struktur des Δ^9 -THC ausgehend, Mitte der 80er Jahre von der Firma Pfizer synthetisiert (Howlett 1995). Hinsichtlich der Fähigkeit, Cannabinoidrezeptoren zu aktivieren, sind CP55940 und WIN55212-2 an beiden Rezeptorsubtypen signifikant potenter als Δ^9 -THC oder Anandamid (**Tabelle 1**). Der Einsatz von WIN55212-2 und seines inaktiven Stereoisomers WIN55212-3 (Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002) (**Abbildung 1.3**, S. 9 ; **Tabelle 1**) ermöglicht eine Differenzierung in rezeptorvermittelte und unspezifische Effekte.

Die Synthese der ersten Cannabinoidrezeptor-Antagonisten gelang Mitte der 90er Jahre. 1994 wurde von der Firma Sanofi-Research unter der Bezeichnung SR141716A der erste CB₁-Rezeptor-selektive Antagonist entwickelt, der heute auch unter dem Namen Rimonabant bekannt ist (Rinaldi-Carmona *et al.* 1994; Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002; Fernandez & Allison 2004) (**Abbildung 1.3** und **Tabelle 1**). Es handelt sich um einen kompetitiven Antagonisten mit schwacher in-vers-agonistischer Wirkung (MacLennan *et al.* 1998; Pertwee 1999; Kathmann *et al.*

2004). Rimonabant wurde in vorliegender Arbeit zur Identifizierung CB₁-Rezeptor-vermittelter Wirkungen verwendet.

Tonische Aktivität des Endocannabinoid-Systems. Das invers-agonistische Verhalten der Cannabinoidrezeptor-Antagonisten in einigen Bioassay-Systemen – sie verursachen entgegengesetzte Wirkungen zu denen der Agonisten Δ^9 -THC und Anandamid, z.B. Hyperalgesie oder Erbrechen – legt zumindest in einigen Geweben und Regionen eine tonische Aktivität des endogenen Cannabinoidsystems nahe. Diese tonische Aktivität wird auf zwei mögliche Mechanismen zurückgeführt: auf einen

- primär aktivierten Zustand einiger Cannabinoidrezeptoren und/oder auf eine
- andauernde Freisetzung von Endocannabinoiden.

Eine tonische Aktivität des Cannabinoidsystems wurde klinisch nachgewiesen für die Schmerzleitung im Hinterhorn des Rückenmarks, für die Kontrolle der Spastik in einem Tiermodell der multiplen Sklerose, für die Kontrolle des Appetits (s. Kapitel 1.5, letzter Abschnitt) sowie für emetische Regelkreise des Gehirns. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Endocannabinoidspiegel oder die Zahl der Cannabinoidrezeptoren in der Reaktion auf einige pathologische Zustände oder Stimuli (Schmerzreize) erhöht waren (Siegling *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2003).

1.3 Kardiovaskuläres System & Cannabinoide

Cannabinoide verursachen deutliche und komplexe kardiovasuläre Veränderungen, über deren Mechanismus relativ wenig bekannt ist (für Reviews s. Hillard 2000; Kunos *et al.* 2000; Ralevic *et al.* 2002; Randall *et al.* 2004).

Allgemeine kardiovaskuläre Wirkungen von Cannabinoiden. Im Menschen umfassen kardiovaskuläre Reaktionen auf akute Gabe von Δ^9 -THC eine ausgeprägte, reversible und dosisabhängige Tachykardie sowie einen geringen Anstieg des diastolischen Blutdrucks (im Liegen) mit erhöhtem Sauerstoffbedarf (Clark 1975; Tashkin *et al.* 1977; Huestis *et al.* 1992; Jones 2002). Diese Reaktionen werden durch eine Herabsetzung des Parasympatikonus unter Beteiligung von

CB₁-Rezeptoren erklärt (Clark 1975; Huestis *et al.* 2001). Aufgrund der Toleranzentwicklung (s. Kapitel 1.5, Abschnitt 4) kann Langzeitgebrauch zu Bradykardie führen (Benowitz & Jones 1975 und 1981; Jones 2002). Bei höherer Dosierung kann ein orthostatischer Blutdruckabfall mit Schwindelerscheinungen durch eine Erweiterung der Blutgefäße auftreten. Diese Erweiterung der Blutgefäße wird auch für die Rötung der Bindehaut (Kapitel 1.5, Abschnitt 4) verantwortlich gemacht.

In narkotisierten Tieren verschiedener Spezies vermindern systemisch gegebene Cannabinoide üblicherweise den Blutdruck und die Herzfrequenz (Hund: Cavero *et al.* 1973a,b; Katze: Vollmer *et al.* 1974; Ratte: Graham & Li 1973, Lake *et al.* 1997, Niederhoffer *et al.* 2003). Diese kardiovaskulär-depressive Wirkung der Cannabinoide hängt dabei wesentlich vom Zustand der Atemfunktion und des Bewusstseins ab (Niederhoffer *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003). In wachen Tieren lösen Cannabinoide entweder eine moderate kardiovaskuläre Depression oder, häufiger, keinen Effekt oder Bluthochdruck und Tachykardie aus (Kaninchen: Stark & Dews 1980; Ratte: Lake *et al.* 1997; Gardiner *et al.* 2002). In den meisten dieser Untersuchungen war eine Zuordnung der Effekte zu peripheren oder zentralen Anteilen des kardiovaskulären Systems aufgrund der lipophilen Eigenschaften und der damit verbundenen guten ZNS-Gängigkeit der Cannabinoide nicht möglich.

Periphere kardiovaskuläre Wirkungen von Cannabinoiden. Studien mit despinalisierten Tieren ermöglichen die Untersuchung peripherer Wirkkomponenten von Cannabinoiden (s. Kapitel 2.3.5). In despinalisierten Ratten und Kaninchen mit präganglionärer elektrischer Stimulation des Sympathikus verminderten die Cannabinoidrezeptor-Agonisten WIN55212-2 und CP55940 deutlich die Noradrenalinfreisetzung aus postganglionär-sympathischen Neuronen, was zu erniedrigtem Blutdruck führte (Malinowska *et al.* 1997; Niederhoffer & Szabo 1999; Niederhoffer *et al.* 2003). Sie veränderten jedoch nicht die blutdrucksteigernde Reaktion auf exogen zugeführtes Noradrenalin, was gegen einen direkten Effekt von Cannabinoiden auf die Gefäße spricht (Malinowska *et al.* 1997; Niederhoffer & Szabo 1999). Allerdings wurde der Gefäßwiderstand koronarer und cerebraler Arterien in Studien an Katzen und Ratten vorwiegend über eine direkte Aktivierung von vaskulären CB₁-Cannabinoidrezeptoren durch entsprechende endogene und synthetische Agonisten herabgesetzt (Gebremedhin *et al.* 1999; Wagner *et al.* 2001b).

Wirkungen von Cannabinoiden an kardiovaskulären regulatorischen Zentren. Bisher wurden die Wirkungen der Cannabinoidrezeptor-Liganden auf kardiovaskulär-regulatorische Zentren in der Medulla oblongata nur in wenigen Studien beschrieben. Unter Verwendung des Kopf-Cross-Zirkulationsmodells bei Hunden kamen Caverio *et al.* (1973a,b) zu dem Schluss, dass die zentralen Wirkungen von Δ^9 -THC eine Blutdruck- sowie Herzfrequenzminderung zur Folge hatten und diese Reaktionen sowohl Sympathikus- als auch Parasympathikus-abhängig wären. In narkotisierten Katzen lösten Injektionen von Δ^9 -THC in den lateralen cerebralen Ventrikel ebenfalls Senkungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz aus (Vollmer *et al.* 1974); diese Effekte wurden einer zentral vermittelten Sympathikushemmung zugesprochen. Bei wachen Kaninchen steigerte intracisternale Applikation der Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 und CP55940 den Blutdruck, die Feuerfrequenz der renalen postganglionär-sympathischen Neurone und die Plasmanoradrenalin-Konzentration, was auf eine zentrale Sympathikusaktivierung hinweist (Niederhoffer & Szabo 1999 und 2000). Zusätzlich wurde eine deutliche, durch Atropin antagonisierbare Bradykardie hervorgerufen, wodurch auf eine zentrale Stimulation der kardialen Vagusaktivität geschlossen wurde. Da all diese Wirkungen durch Vorbehandlung mit dem CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten SR141716A abgeschwächt wurden, spricht dies für eine Beteiligung von CB₁-Rezeptoren.

Von obigen Experimenten ausgehend bleibt der genaue Wirkort der Cannabinoide in der Medulla oblongata jedoch unklar. Denn in die Cisterna magna injiziert, können Substanzen auf nahezu alle kardiovaskulär-modulierenden Kerne in der Medulla oblongata und der Brücke wirken; das sind der Nucleus tractus solitarii (NTS), der dorsale motorische Nucleus des Vagus (DMV), der Nucleus ambiguus (NA), die rostrale ventrolaterale Medulla oblongata (RVLM) und die kaudale ventrolaterale Medulla oblongata (CVLM). Direkte Mikroinjektionen von WIN55212-2 in die RVLM narkotisierter Ratten wurden von Padley *et al.* (2003) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine über CB₁-Rezeptoren vermittelte Sympathikusaktivierung mit Blutdruckanstieg. Inwieweit die zentral vermittelten Wirkungen an den Effekten systemisch applizierter Cannabinoide Anteil haben, wurde von Niederhoffer *et al.* (2003) anhand von sowohl Mikroinjektionen und systemischer Applikation bei anästhesierten Ratten als auch i.v.-Injektionen bei despinalisierten Ratten gezeigt. Sie kamen zu dem Schluss, dass der Hauptwirkort der Cannabinoid-induzierten kardiovaskulären Depression das sympathische Nervensystem sei.

Die angesprochenen sowie mögliche weitere kardiovaskuläre Wirkungen können teilweise ein Risiko für Cannabiskonsumenten mit bereits existierenden Herzkrankheiten darstellen. Über akute und manchmal tödliche Vorfälle wurde schon berichtet.

1.4 Respiratorisches System & Cannabinoide

Es ist schon seit vielen Jahren bekannt, dass Cannabinoide nicht nur einen großen, komplexen Einfluss auf das kardiovaskuläre System, sondern auch auf die Atemfunktion haben.

Bisherige Studien über die Wirkung von Δ^9 -THC auf die Atemregulation beim Menschen ergaben uneinheitliche Ergebnisse. So wurden eine Abnahme oder Zunahme, aber auch keine Veränderung bei sowohl der Atemfrequenz als auch dem Atemzugvolumen registriert (Malit *et al.* 1975; Mathew *et al.* 1992). Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden auch innerhalb einzelner Studien als individuelle Reaktionsweisen beobachtet (Bellville *et al.* 1975).

Bei Versuchstieren verursacht Δ^9 -THC im Gegensatz zum Menschen üblicherweise eine ausgeprägte Atemdepression, die sich meist in Form einer dosisabhängigen Verminderung der Atemfrequenz äußert (Cavero *et al.* 1972; Graham & Li 1973; Moss & Friedman 1976; Doherty *et al.* 1983; Estrada *et al.* 1987). Bei narkotisierten Katzen war die Reduktion der Atemfrequenz sogar bis zum Eintreten des Atemstillstands zu steigern (Doherty *et al.* 1983). Entgegen diesen Beobachtungen zeigte sich in einer anderen Studie bei narkotisierten Hunden nach Δ^9 -THC-Gabe eine Verminderung der Tiefe der Atemzüge (Atemzugvolumen), begleitet von einer vorübergehenden Steigerung der Atemfrequenz (Cavero *et al.* 1972).

Die Aufklärung der Angriffspunkte und Mechanismen der Interaktion von Cannabinoiden mit dem respiratorischen System konnte erst nach Entwicklung spezifischer Cannabinoidrezeptor-Agonisten und -Antagonisten in den 90er Jahren (s. Kapitel 1.2.3, Abschnitt 7) beginnen. Ein Nachweis der Beteiligung spezifischer Cannabinoid-CB₁-Rezeptoren wurde erstmals von Vivian *et al.* (1998) erbracht. In deren Studie an Rhesusaffen lösten sowohl Δ^9 -THC als auch der synthetische Agonist WIN55212-2 eine dosisabhängige Reduktion des Atemminutenvolumens und

des Atemzugvolumens aus. Vorbehandlung mit SR141716A, einem CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten, hob diese atemdepressiven Effekte auf. Erst kürzlich wurde in einer weiteren Untersuchung gezeigt, dass systemisch appliziertes WIN55212-2 bei narkotisierten Ratten zu einer starken Abnahme der Atemfrequenz mit nachfolgender Hypoxie, Hyperkapnie sowie Azidose führt, die ebenfalls durch SR141716A antagonisierbar war (Schmid *et al.* 2003). Einseitige Mikroiinjektionen von WIN55212-2 in die RVLN narkotisierter, beatmeter Ratten resultierte in einer Abnahme der Feuerfrequenz des Nervus phrenicus, welche durch Vorbehandlung mit einem CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten verhindert wurde (Padley *et al.* 2003).

Es ist nicht bekannt, ob Cannabinoide die Atemfunktion über einen zentralen oder peripheren Wirkort hemmen. Jedoch scheint ein Angriffspunkt an respiratorischen Zentren des Hirnstamms wahrscheinlich (Moss & Friedman 1976; Doherty *et al.* 1983; Padley *et al.* 2003). Möglicherweise spielt auch eine Verschiebung des CO₂-Sollwertes zentraler Chemorezeptoren zu höheren Werten ein Rolle (Doherty *et al.* 1983). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Δ^9 -THC die Mechanismen zur Kompensation hoher alveolärer und arterieller CO₂-Konzentrationen beeinträchtigt. Normalerweise wird eine Hyperkapnie mit einer Steigerung der Atemfrequenz und des Atemzugvolumens beantwortet. Diese Reaktionen fielen bei narkotisierten Hunden unter Δ^9 -THC-Behandlung jedoch deutlich geringer aus, was auf eine herabgesetzte CO₂-Empfindlichkeit hinweist (Moss & Friedman 1976).

Bei der Beurteilung von Cannabiswirkungen in der Lunge ist die Applikationsform zu beachten. Nach dem Rauchen natürlicher Cannabiszubereitungen konnten bronchiale Irritationen und entzündliche Veränderungen beobachtet werden, die sowohl bei Marihuana- als auch bei Tabakkonsum auftraten. Ein akuter Effekt von Marihuana auf die alveoläre Permeabilität konnte nicht nachgewiesen werden (Tashkin *et al.* 1987; Gil *et al.* 1995). Gong *et al.* (1984) zeigten, dass die orale Gabe von Δ^9 -THC und, wenngleich in geringerem Ausmaß, von Δ^8 -THC, nicht aber von Cannabidiol oder Cannabinol, akut bronchodilatatorisch wirkt. Eine Toleranz entwickelte sich trotz täglichen Gebrauchs von Δ^9 -THC nicht. Andererseits fand man bei Langzeitbeobachtungen intensiver Marihuana-Raucher eine leichte Obsruktion der Atemwege (Tashkin *et al.*

1976), die allerdings auch als Folge einer Entzündungsreaktion durch den reizenden Rauch interpretiert werden kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Versuchstiere einheitlich mit einer Atemdepression auf Cannabinoid-Gabe reagieren, wohingegen beim Menschen deutlich unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Reaktionen auftreten. Auch wenn vieles auf einen vorwiegend zentralen Wirkort hinweist, bleibt dennoch der exakte Angriffspunkt ebenso wie der Mechanismus, mit dem Cannabinoide die Atemregulation beeinflussen, abschließend zu klären.

1.5 Wirkung von Cannabinoiden und deren therapeutischer Nutzen

Cannabinoiden beeinflussen entsprechend der breiten Verteilung von Cannabinoidrezeptoren im Körper eine Vielzahl verschiedener Funktionen des Organismus. Sie kombinieren viele der Effekte von Alkohol, Tranquillizern, Opiaten und Halluzinogenen; so haben Cannabinoide anxiolytische, sedative, analgetische und psychische, außerdem appetitsteigernde sowie viele systemische Wirkungen. Dabei ist ihre akute Toxizität extrem niedrig: noch nie wurde über einen direkt auf die reine, akute Cannabiswirkung zurückzuführenden Todesfall bei vorher gesunden Konsumenten berichtet. Im Folgenden wird eine Auswahl an Cannabinoid-Wirkungen beschrieben. Kardiovaskuläre und respiratorische Effekte sind Gegenstand vorliegender Arbeit und werden daher in den Kapiteln 1.3 bzw. 1.4 näher beleuchtet.

Das Hauptmerkmal des als Freizeitdroge gerauchten Cannabis ist der euphorisierende Effekt, auch als „High“ bezeichnet. Es beinhaltet eine Intensivierung der Sinneseindrücke, die von einem veränderten Zeitgefühl begleitet wird, eine Sedierung, ein gesteigertes Wohlbefinden und eine angstmindernde Komponente. Das Ausmaß des „High“ ist abhängig vom Δ^9 -THC/Cannabidiol-Verhältnis. Es setzt bei Inhalation innerhalb weniger Minuten ein, erreicht ein Maximum nach 15 bis 30 Minuten und lässt dann innerhalb von zwei bis drei Stunden nach. Diese Effekte fallen individuell sehr unterschiedlich aus, unter anderem abhängig von Dosierung oder psychischer Verfassung des Konsumenten. Dementsprechend kann Cannabis auch zu dysphorischen Reaktionen wie Angst, Panik, Paranoia und Psychosen führen. Eine Beeinträchtigung kognitiver und psychomotorischer Funktionen durch Cannabis kann sich in Form von Konzentrationsstörungen und Störungen des

Kurzzeitgedächtnisses sowie in verlangsamten Reaktionen und beeinträchtigter motorischer Koordination äußern (Kleiber & Kovar 1998). Diese Wirkungen werden durch andere zentral-dämpfende Substanzen wie z.B. Alkohol oder Benzodiazepine verstärkt. Das „High“ und die psychisch dämpfende Wirkung bezeichnet man zusammen als „psychotropen Effekt“.

Nach oraler Applikation von Δ^9 -THC (Dronabinol ist der internationale Freiname für Δ^9 -THC) setzt die Wirkung innerhalb von 30 bis 60 Minuten ein, das Wirkungsmaximum liegt bei 2 bis 4 Stunden. Die psychotropen Effekte haben eine Dauer von 4 bis 6 Stunden, der appetitstimulierende Effekt kann bis zu 24 Stunden und länger anhalten. Daneben besitzen Cannabinoide mögliche therapeutische Wirkungen bei Asthma, Glaukom, Schmerzzuständen (chronische und therapieresistente Schmerzen, Migräne), Erkrankungen mit Muskelspasmen (Multiple Sklerose, Querschnittslähmung), neurologischen Erkrankungen (Alzheimer, Epilepsie, Tourette-Syndrom) und anderen Indikationsgebieten (Kalant 2001, Kumar *et al.* 2001; Grotenhermen 2003).

Bei Dauerkonsum von Δ^9 -THC nehmen bestimmte Wirkungen allmählich ab; es entwickelt sich eine Toleranz bzw. Tachyphylaxie. Dies betrifft vor allem die Wirkungen auf die Psyche, das Herzkreislaufsystem und den Augeninnendruck, während andere Wirkungen, wie die Anregung des Appetits, keinen Toleranzeffekten unterliegen. Diese Toleranzentwicklung ist nicht sehr stark ausgeprägt und verläuft langsam. Akute körperliche Nebenwirkungen sind Tachykardie (s. Kapitel 1.3) sowie Mundtrockenheit und konjunktivale Rötung (Kumar *et al.* 2001; Grotenhermen 2003). Cannabis kann außerdem Hypothermie induzieren, und in seltenen Fällen treten Übelkeit und Erbrechen auf. Die Effekte auf den Blutdruck sind individuell unterschiedlich, meistens kommt es jedoch zu orthostatischer Dysregulation (s. Kapitel 1.3).

Auch wenn Cannabis kein ernsthaftes Gesundheitsrisiko für Gelegenheitsraucher darstellt (die in der Regel jung und gesund sind), können negative Folgen durch andauernden Cannabiskonsum bei kranken Patienten oder bei Risikogruppen nicht ausgeschlossen werden. Mögliche Langzeiteffekte durch Cannabiskonsum auf die Psyche, das Gedächtnis, die Wahrnehmung, das Immunsystem und andere Funktionen werden deshalb kontrovers diskutiert (z.B. Hall & Solowij 1998; Grotenhermen 2003). Das Rauchen von Marihuana oder Haschisch hat langfristig die gleichen nachteiligen Auswirkungen auf die Lunge wie das

Rauchen von Tabak (Tashkin *et al.* 1987; Gil *et al.* 1995; Kapitel 1.4, vorletzter Abschnitt). Diese negativen Folgen des Marihuanarauchens könnten durch Verabreichung oraler Präparate des Δ^9 -THC (Dronabinol-Rezepturen, Marinol[®] und Cesamet[®]) zumindest teilweise eingeschränkt werden. So ist das Pharmaunternehmen Bayer gerade dabei, ein orales Spray auf den Markt zu bringen (s. Kapitel 1.6, Abschnitt 3).

Zusätzlich zum Δ^9 -THC sind verschiedene synthetische Cannabinoid-Analoga ohne psychotrope Effekte und Modulatoren des endogenen Cannabinoid-Systems (wie Wiederaufnahmehemmer und Cannabinoidrezeptor-Antagonisten) vielversprechende Kandidaten für die klinische Forschung und für einen möglichen therapeutischen Einsatz. So zeigt die Blockade von Cannabinoidrezeptoren mittels synthetischer Antagonisten im Tierexperiment gedächtnissteigernde und appetitreduzierende Wirkungen (Terranova *et al.* 1996; Colombo *et al.* 1998; Le Fur 2004). Die appetitzügelnde Wirkung des Antagonisten Rimonabant (**Abbildung 1.3**, S. 9) wird daher momentan von dem Unternehmen Sanofi-Synthelabo in einer klinischen Phase III-Studie untersucht (Le Fur 2004). Interessanterweise verdoppelte Rimonabant gleichzeitig nach ersten Ergebnissen der Studie die Chance für Raucher, sich von ihrer Sucht nach Nikotin zu lösen (Fernandez & Allison 2004). Klinische Studien der Phase II werden für Rimonabant zur Zeit ergänzend gegen Alkoholismus durchgeführt. Viele historische Hinweise auf weitere Indikationen (s. Kapitel 1.1) wurden noch nicht in klinischen Studien überprüft.

1.6 Pharmazeutisches Recht & Cannabinoide

Haschisch, Marihuana sowie Cannabis-Extrakt stehen in der Anlage I des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) und sind deshalb in Deutschland nicht verkehrs- und nicht verschreibungsfähig. Daher kann zwar Cannabis selbst nicht, wohl aber dessen wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoff Δ^9 -THC (Dronabinol, Anlage III BtMG) in der Apothekenrezeptur nach dem Neuen Rezeptur-Formularium als Dronabinol-Kapseln (Rezeptur 22.7) oder ölige Dronabinol-Tropfen (Rezeptur 22.8) sowie auch als alkoholische Lösung zur Inhalation verarbeitet werden. Seit Juli 2000 können Apotheken Dronabinol als Rezeptursubstanz in pharmazeutischer Qualität in den Mengen 0.25, 0.5 und 1.0 g (zu 100, 180 und 350 Euro; Stand November 2004; THC-Pharm GmbH, Frankfurt/Main) oder als Set zur Herstellung ölgiger Tropfen von

Delta 9 Pharma GmbH in Neumarkt erwerben. Die gesetzlich vorgeschriebene Identitätsprüfung der Rezeptursubstanz ist gemäß der Monographie D100THC des Deutschen Arzneimittel-Codex im Rahmen des üblichen Apothekenbetriebs mit Dünnschichtchromatographie und Farbreaktionen möglich.

Der Arzt kann gemäß Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung (BtMVV §2) Arzneimittel mit dem Inhaltsstoff Dronabinol auf Betäubungsmittelrezept unter Beachtung der Höchstmenge von 500 mg über einen Zeitraum von 30 Tagen für einen Patienten verordnen. Ist in begründeten Einzelfällen eine Überschreitung der festgesetzten Höchstmenge erforderlich, muss dies auf dem Betäubungsmittelrezept durch den Buchstaben "A" gekennzeichnet sein (BtMVV §2 (2)). Eine Meldung an die zuständige Überwachungsbehörde ist seit Inkrafttreten der 10. Betäubungsmittelrechts-Änderung am 1. Februar 1998 nicht mehr notwendig. Bei der Verschreibung von Dronabinol hat der Gesetzgeber keine Indikationsgebiete vorgesehen, was den therapeutischen Einsatz erleichtert. Der Arzt kann im Rahmen seiner Therapiefreiheit mit Dronabinol einen Heilversuch unternehmen. Die Apotheke darf Dronabinol nur innerhalb von sieben Tagen ab Ausstellung des BtM-Rezeptes an den Patienten abgeben.

Fertigarzneimittel stehen lediglich als Import zur Verfügung. Ein Fertigarzneimittel mit dem Handelsnamen Marinol[®] aus den USA (synthetisch hergestelltes Dronabinol; Roxane Laboratories, Columbus, Ohio, USA) besitzt dort bereits seit 1985 für die Indikation "Übelkeit und Erbrechen bei Chemotherapie" sowie seit 1992 für die Indikation "Anorexie mit Gewichtsverlust bei AIDS-Patienten" zur Gewichtssteigerung eine Zulassung. Der deutsche Pharmakonzern Bayer kommt demnächst mit einem auf Cannabis basierenden oralen Spray (Sativex[®]; Δ^9 -THC und Cannabidiol) auf den Markt. In Großbritannien und Canada soll es 2005 mit den Erstindikationen "Multiple Sklerose" sowie "neuropathische Schmerzen" zugelassen werden. Dabei ist besonders pikant, dass es einst der Konzern Bayer selbst war, der maßgeblich Cannabis als Heilmittel in die Illegalität drängte und die Kriminalisierung dieser Heilpflanze über das Betäubungsmittelgesetz durchsetzte. Marinol[®], Sativex[®] und das ebenfalls in Großbritannien im Verkehr befindliche Cesamet[®] (Nabilon; synthetisches Δ^9 -THC-Analogon) können auf Grundlage einer ärztlichen Verordnung über Importeure, die eine Einfuhrerlaubnis der Bundesopiumstelle besitzen, nach Deutschland eingeführt werden. Da der Import ausländischer Fertigarzneien gemäß §73 Absatz 3 Arzneimittelgesetz aus den USA bis zu zwei Wochen dauert, die

Präparate sehr teuer (60 Kapseln Marinol® à 2,5 mg kosten 817 Euro; Stand November 2004) und nur für einen eingeschränkten Indikationsbereich zugelassen sind, spart die Eigenherstellung Dronabinol-haltiger Arzneimittel in der Apotheke Zeit, ist kostengünstiger und kann zudem breitgefächerter eingesetzt werden.

In Deutschland hat 1991/92 die Cannabisdebatte erneut in den Massenmedien Schlagzeilen gemacht, als der vorsitzende Richter am Lübecker Landgericht, Neskovic, die vorhandenen Cannabisgesetze kritisierte. Seitdem unterliegen die juristisch als „nicht geringe Mengen“ angesehenen Quantitäten an Cannabis in jedem Bundesland erheblichen Schwankungen. Der Begriff „nicht geringe Mengen“ entscheidet juristisch, mit welcher Härte bestraft wird und schwankt zwischen weniger als einem Gramm in Bayern sowie bis zu 30 Gramm in Schleswig-Holstein. Entgegen der vielerorts verbreiteten Meinung ist der Besitz von geringen Mengen Cannabis in Deutschland jedoch nicht legalisiert worden.

Die Handhabung von Cannabis in Europa ist sehr unterschiedlich und reicht von prohibitiv, wie z.B. in Skandinavien oder Großbritannien, über zurückhaltend, wie z.B. in Deutschland, bis hin zu liberal und toleriert in geringen Mengen, wie z.B. in Holland. Es ist zu erwarten, dass sich die juristischen Aspekte in Europa in den kommenden Jahren ändern werden. Ob dies jedoch eine Auswirkung auf den bereits sehr verbreiteten Gebrauch haben wird, muss abgewartet werden.

1.7 Ziele der Arbeit

Die markanten kardiovaskulären Wirkungen, z.B. eine starke Tachykardie beim Menschen (s. Kapitel 1.3), und die respiratorischen Effekte (s. Kapitel 1.4) von Cannabinoiden sind bislang nur unvollständig erforscht. Das Ziel dieser Arbeit war es, die primären Wirkorte von Cannabinoiden auf die Kreislauf- und Atmungsregulation zu identifizieren. Die Wirkungen von Cannabinoiden auf die glatte Gefäßmuskulatur und die verschiedenen Elemente der Bahnen, die für die Aufrechterhaltung des Sympathikustonus und der Atemfunktion verantwortlich sind, d.h. regulatorische Kerne in der Medulla oblongata, prä- und postganglionäre Neurone, sollten in funktionellen Experimenten an lebenden Tieren untersucht werden. Die Ergebnisse sollten helfen dazu beizutragen, gefährliche Kreislaufwirkungen von Cannabinoiden zu verstehen.

1.7.1 Bestimmung der Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System

Respiratorische Wirkungen. Bis heute ist nicht bekannt, ob Cannabinoide die in Kapitel 1.4 beschriebene Atemdepression direkt an respiratorischen Zentren des Hirnstamms auslösen, oder ob sie an peripheren Wirkorten angreifen.

Deshalb war das erste Ziel dieser Experimentenreihe festzustellen, ob Cannabinoide in der Lage sind, die Atmung über eine Wirkung im Hirnstamm zu dämpfen. Zu diesem Zweck wurde der gemischte CB₁-/CB₂-Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN55212-2 (**Abbildung 1.3**, S. 9) in die Cisterna magna anästhesierter Ratten injiziert (d.h. in die unmittelbare Umgebung der die Atmung regulierenden Zentren im Hirnstamm), und die Veränderungen der respiratorischen Parameter Atemfrequenz (RR), Peak-Flow während Einatmung (PIF), Atemzugvolumen (V_T) und Atemminutenvolumen (V_E) wurden beobachtet.

Mehrere kürzlich veröffentlichte Studien deuten darauf hin, dass an manchen Cannabinoid-Wirkungen, wie Antinocizeption oder Abhängigkeit, endogene Opiode und Opioidrezeptoren beteiligt sind (Tanda *et al.* 1997; Valverde *et al.* 2000; Lichtman *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2001). Das zweite Ziel dieser Experimentenreihe war es deshalb herauszufinden, ob das gleiche auch auf die atemdepressive Wirkung der Cannabinoide zutrifft. Dafür wurden die Wirkungen von WIN55212-2 auf die respiratorischen Parameter mit denen des μ -Opioidrezeptor-Agonisten [*D*-Ala²,*N*-Me-Phe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin (DAMGO) verglichen und die Interaktion zwischen WIN55212-2 und dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon getestet.

Kardiovaskuläre Wirkungen. Cannabinoide bewirken unterschiedlichste kardiovaskuläre Veränderungen (siehe Kapitel 1.3). Die Rolle von Cannabinoid-Wirkungen auf kardiovaskuläre Zentren bei diesen komplexen Veränderungen ist noch nicht geklärt. Obwohl das Hauptaugenmerk der vorliegenden Studie auf den respiratorischen Wirkungen von WIN55212-2 lag, sollten daher auch der Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration aufgenommen werden. Diese Ergebnisse sollten einen Beitrag zum Verständnis der zentralen Wirkungen von Cannabinoiden auf die Herzkreislauf-Regulation liefern.

1.7.2 Bestimmung der Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung

Anatomische Studien weisen darauf hin, dass CB₁-Cannabinoidrezeptoren im Zentralen und Peripheren Nervensystem weit verbreitet sind (s. Kapitel 1.2.1). Die am häufigsten beobachtete Folge einer Aktivierung dieser CB₁-Rezeptoren ist eine präsynaptische Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung (für Reviews siehe Schlicker & Kathmann 2001; Freund *et al.* 2003 und Szabo & Schlicker 2005). Dementsprechend werden sowohl die Neurotransmission im Zentralen Nervensystem (z.B. Levenes *et al.* 1998; Wallmichrath & Szabo 2002; Szabo *et al.* 2004) als auch die Neuro-Effektor-Transmission im peripheren Nervensystem (z.B. Pertwee *et al.* 1992; Malinowska *et al.* 1997, 2001b; Izzo *et al.* 1998; Niederhoffer & Szabo 1999; Niederhoffer *et al.* 2003; Schlicker *et al.* 2003) gehemmt.

Im Zentralen Nervensystem führen neben exogenen Cannabinoiden auch Endocannabinoide zu einer präsynaptischen Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung (s. Kapitel 1.2.3). Im Gegensatz hierzu gibt es im sympathischen Nervensystem, mit Ausnahme des Vas deferens (Christopoulos *et al.* 2001; Schlicker *et al.* 2003), noch keine Anzeichen für eine Endocannabinoid-vermittelte präsynaptische Hemmung. Das Ziel dieser Studie war es dementsprechend, nach solch einer Endocannabinoid-vermittelten präsynaptischen Hemmung im sympathischen Nervensystem zu suchen. Hierfür sollte untersucht werden, ob der CB₁-Rezeptor-Antagonist Rimonabant (**Abbildung 1.3**, S. 9) den Sympathikotonus in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus erhöht. Zudem sollte die Wirkung von Rimonabant in Anwesenheit von Arginin-Vasopressin (Vasopressin) und Phenylephrin untersucht werden. Die Hypothese dahinter war, dass die Endocannabinoid-Synthese während der Aktivierung vaskulärer G_{αq/11} Protein-gekoppelter Vasopressin V1-Rezeptoren sowie α₁-Adrenoceptoren erhöht ist.

1.7.3 Bestimmung der Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung

Es existieren wenige *in vivo*-Studien über kardiovaskuläre Wirkungen von Cannabinoiden in der Peripherie (s. Kapitel 1.3). Da in diesen Studien ausschließlich präganglionäre Stimulation verwendet wurde, konnte bislang nicht geklärt werden, ob Cannabinoide die Sympathikusfunktion auf dem Level der sympathischen Ganglien

oder präsynaptisch an Axonterminalen postganglionär-sympathischer Neurone hemmen.

Eine präsynaptische CB₁-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung von postganglionären sympathischen Neuronen wird von einigen *in vitro*-Beobachtungen gestützt (Herz: Ishac *et al.* 1996; Molderings *et al.* 1999; Malinowska *et al.* 2001b; Lunge: Vizi *et al.* 2001; mesenteriale Blutgefäße: Ralevic & Kendall 2002; Vas deferens: Pertwee *et al.* 1996; Trendelenburg *et al.* 2000; Schlicker *et al.* 2003). In despinalisierten Kaninchen mit elektrischer Stimulation kardialer postganglionärer sympathischer Neurone hemmten Cannabinoide die ausgelöste Herzbeschleunigung (Szabo *et al.* 2001b). Allerdings war das Ausmaß der Hemmung in den untersuchten Geweben generell relativ gering. Interessanterweise wurde in einigen Studien an peripheren Geweben überhaupt keine Hemmung beobachtet (Arterien: Malinowska *et al.* 1997; Lay *et al.* 2000; Herz: Trendelenburg *et al.* 2000). Da Cannabinoide die Sympathikusfunktion in Präparaten mit präganglionärer Nervenstimulation stark herabsetzten, in Präparaten mit postganglionärer Nervenstimulation jedoch nur schwach oder sogar nicht wirksam waren, ist ein ganglionärer Effekt möglich. Zwei frühere Untersuchungen konnten jedoch bisher keinen Beweis für eine Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung liefern (Vollmer *et al.* 1974; Varga *et al.* 1996). Allerdings wurden in diesen beiden Studien die ganglionären Effekte auch nicht ausführlich untersucht.

Das Ziel der dritten Experimentenreihe war es daher, den Einfluss von WIN55212-2 auf die sympathisch-ganglionäre Übertragung bezüglich der Niere zu klären. Anstiege des renalen vaskulären Widerstands sollten durch elektrische Stimulation entweder prä- oder postganglionär-sympathischer, die Niere innervierender Nerven ausgelöst und die Wirkung von WIN55212-2 darauf untersucht werden. Es waren grundsätzlich drei unterschiedliche Ergebnisse möglich: erstens, wenn Cannabinoide nur präsynaptisch an postganglionären sympathischen Neuronen wirken, dann sollte WIN55212-2 denselben Einfluss auf die durch prä- und postganglionäre Stimulation hervorgerufenen Antworten haben. Zweitens, wenn Cannabinoide nur auf Ebene der Ganglien wirken, dann sollte WIN55212-2 die Antwort auf die Stimulation präganglionärer Neurone reduzieren, nicht aber die auf Stimulation postganglionärer Neurone. Drittens waren natürlich auch gleichzeitige Wirkungen auf beiden genannten Ebenen möglich.

2 METHODEN UND MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Die Wistar Ratten wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bzw. dem Tierstall der Universität Freiburg bezogen. Sie wurden in klimatisierten Räumen bei 22 °C und unter einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten, mit Standardfutter gefüttert und hatten nach Belieben Zugang zu Wasser. Um geschlechtsspezifische haemodynamische und respiratorische Unterschiede zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit grundsätzlich nur männliche Tiere verwendet.

2.2 Anästhesie

2.2.1 Experimente mit anästhesierten Tieren

(betrifft das Kapitel 2.5.1)

Die Ratten wurden zunächst durch Inhalation von Halothan (4 %) in einer Narkosekammer betäubt, um bei Bewusstlosigkeit problemlos eine intraperitoneale Narkose mit Urethan (1.5 g kg^{-1}) in den linken unteren Quadranten des Abdomens setzen zu können (**Abbildung 2.1**).



Abbildung 2.1: Intraperitoneale Injektion zur Narkose.

Diese Injektionsmethode zeigt eine stabile und langanhaltende, jedoch auch langsam eintretende Wirkung des Narkotikums mit Erhaltung guter kardiovaskulärer Reflexe (Buelke-Sam *et al.* 1978; DeWildt *et al.* 1983). Die Narkosedosis wurde aufgeteilt in zwei Drittel (1.0 g kg^{-1}) zu Beginn und ein Drittel (0.5 g kg^{-1}) nach 30 Minuten.

Sobald die Ratten immobilisiert waren, wurden sie gewogen. Etwa 1.5 Stunden nach der initialen Injektion waren die Tiere in ausreichender Narkosetiefe, die anhand von fehlenden Reaktionen auf Schmerzreize, wie das Kneifen in die Schwanzspitze und in die Pfoten, und auf Reflexreize, wie das Berühren des Augapfels, sichergestellt wurde. Um die Narkose während des Experiments zu verlängern, wurde intravenös (i.v.) Urethan (0.2 g kg^{-1}) injiziert.

2.2.2 Experimente mit despinalisierten Tieren

(betrifft die Kapitel 2.5.2 und 2.5.3)

Die Ratten wurden zunächst durch Inhalation von Halothan (4 %) in einer Narkosekammer betäubt, um bei Bewusstlosigkeit problemlos gewogen werden zu können. Anschließend wurde die Anästhesie über eine Atemmaske im chirurgischen Narkosestadium (1.5 - 2.5 %) gehalten. Fehlende Reaktionen auf Schmerz- und Reflexreize, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, dienten zur Sicherstellung der ausreichenden Narkosetiefe. Unmittelbar vor der Despinalisierung wurde die Narkose beendet.

2.3 Chirurgische Präparation

Die Tiere wurden an den Operationsstellen rasiert und in Rückenlage an den Hinterpfoten mit Klebeband auf der Unterlage fixiert.

2.3.1 Katheterisierung der Luftröhre

(betrifft die Kapitel 2.5.1 - 2.5.3)

Mit einem medianen Hautschnitt und einer Längsinzision der Muskelschichten erfolgte die Freilegung der Trachea (**Abbildung 2.2**). Dann wurde zwischen zwei Ringknorpeln (**Abbildung 2.2b**) quer ein kleiner Halbeinschnitt gemacht und ein

Polyethylentubus (Länge 5 cm; Innendurchmesser 1.6 mm; Außendurchmesser 2.1 mm) ca. 1 cm tief kaudal in die Trachea eingeführt und mit chirurgischem Nahtmaterial an dieser fixiert. So blieben die Atemwege bei Versuchen mit spontan atmenden Ratten frei, und das Pneumotachometer zur Bestimmung der Atmungsparameter konnte angeschlossen werden. In den anderen Versuchsgruppen mit despinalisierten Tieren war auf diese Weise eine künstliche Beatmung möglich.

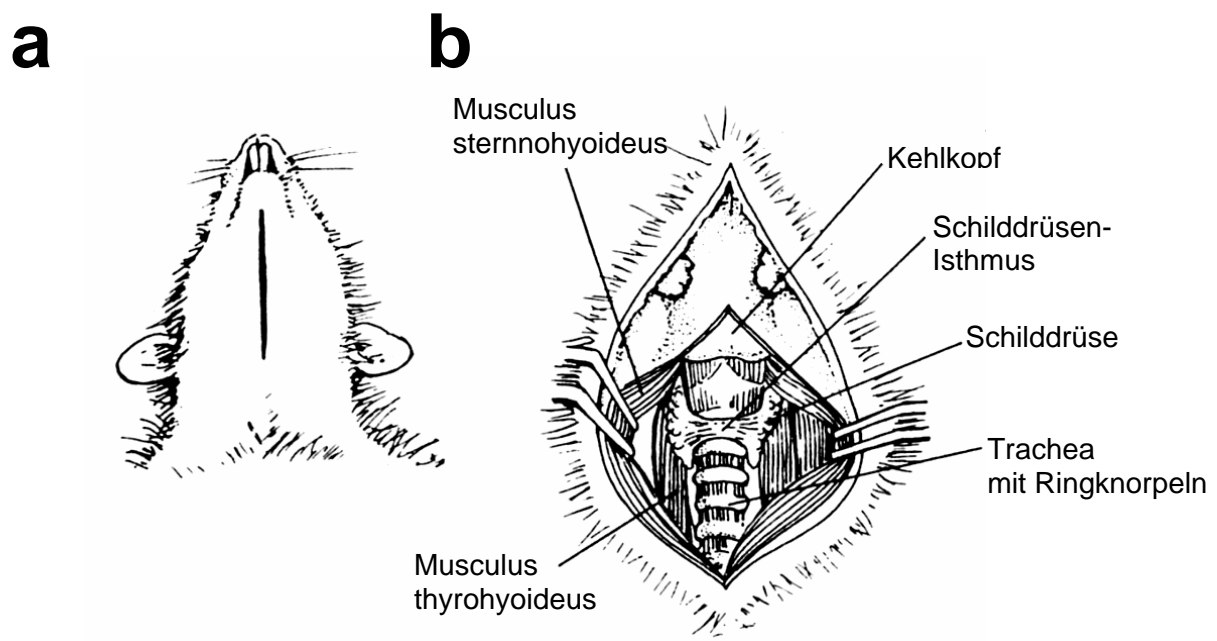


Abbildung 2.2: Freilegung der Trachea.

a Lokalisation des Hautschnitts und **b** die Trachea mit ihrer anatomischen Umgebung.

2.3.2 Implantation des Intracisternal-Katheters

(betrifft das Kapitel 2.5.1)

In einigen Versuchsgruppen wurde ein weiterer Katheter in die Cisterna magna implantiert, um intracisternale (i.c.) Gabe von Substanzen zu ermöglichen. Dazu wurde unter künstlicher Beatmung mit Raumluft (Atemzugvolumen 10 ml kg^{-1} ; Atemfrequenz 50 min^{-1} ; rodent ventilator 7025; Biological Research Apparatus, Ugo Basile, Comerio, Italien) (Niederhoffer *et al.* 2003) der Kopf der Ratte in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) (**Abbildung 2.3**) fixiert.

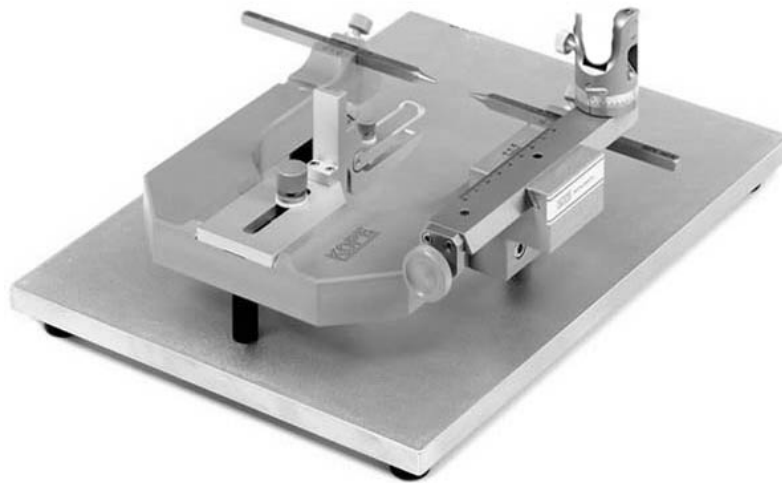


Abbildung 2.3: Stereotaktisches Instrument (nach David Kopf).

Das Instrument besteht aus einem stabilen „U“-Rahmen, zwei Ohrstäben und dem Schneidezahnbalken (der Manipulator wurde abgeschraubt). Diese dienen zur Fixierung des Kopfes in der richtigen Position, so dass die Operation und die Einführung des i.c.-Katheters exakt ausgeführt werden konnten.

Nach einem ca. 3 cm langen, mittigen, längsverlaufenden Hautschnitt am Nacken wurden die darunterliegenden Muskeln stumpf getrennt, um die atlanto-occipitale Membran offenzulegen. Unter Vergrößerung mittels eines Stereomikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde dann mit Hilfe einer Kanüle (Durchmesser 0.3 mm) ein kleines Loch in diese Membran gestochen und ein Polyethylen-Katheter (Innendurchmesser 0.28 mm; Außendurchmesser 0.61 mm; Länge 6 cm) 1 mm tief in die Cisterna magna eingeführt (**Abbildung 2.4a,b**). Dieser wurde mit Cyanoacrylat (Loctite 414; Loctite, München, Deutschland) an die atlanto-occipitale Membran geklebt und das freie Ende mit einem Stöpsel verschlossen (**Abbildung 2.4a**). Anschließend wurden die Muskeln und die Haut um das freie Ende des Katheters zusammengenäht, die Tiere aus dem stereotaktischen Rahmen genommen und die künstliche Beatmung beendet.

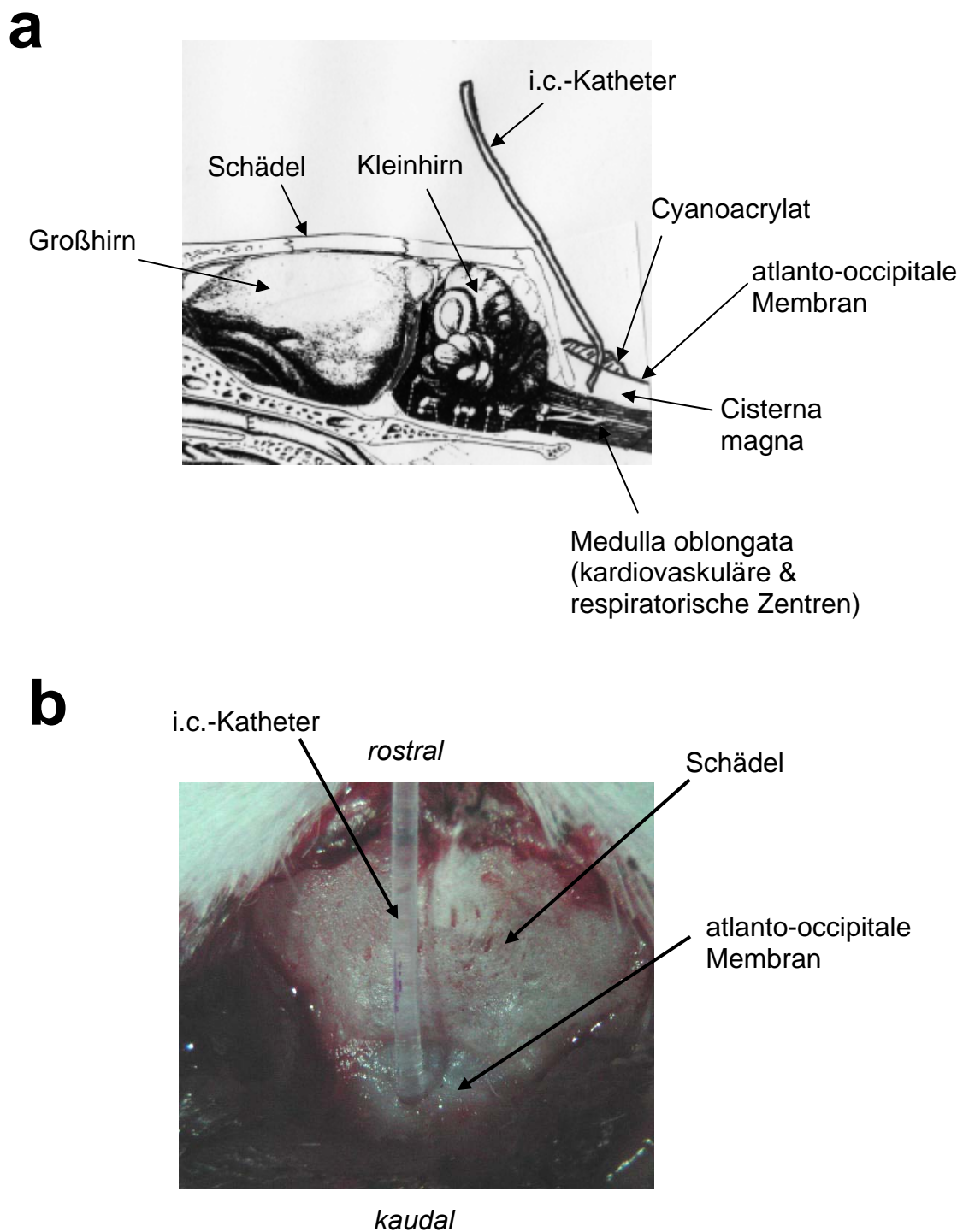


Abbildung 2.4: Intracisternaler Katheter.

a Schematischer Längsschnitt durch den Schädel einer Ratte mit Positionierung des intracisternalen (i.c.) Katheters. **b** Aufsicht nach dorsal auf die atlanto-occipitale Membran mit Positionierung des i.c.-Katheters.

2.3.3 Katheterisierung der Femoralgefäße

(betrifft das Kapitel 2.5.1)

Bei den Versuchsgruppen mit i.c.-Applikation erfolgte die Freilegung der Arteriae und Venae femoralis durch einen 2 - 3 cm langen Hautschnitt im Bereich der Leisten (**Abbildung 2.5a**), gefolgt von einer stumpfen Isolierung der Gefäße vom umgebenden Gewebe. Diese Gefäße wurden distal abgebunden und etwa 1 cm hiervon Richtung proximal wurde jeweils ein zweiter Faden locker um die Gefäße gelegt (**Abbildung 2.5b**), der unter Spannung kurzfristig den Blutfluss in diesem Bereich unterdrückte.

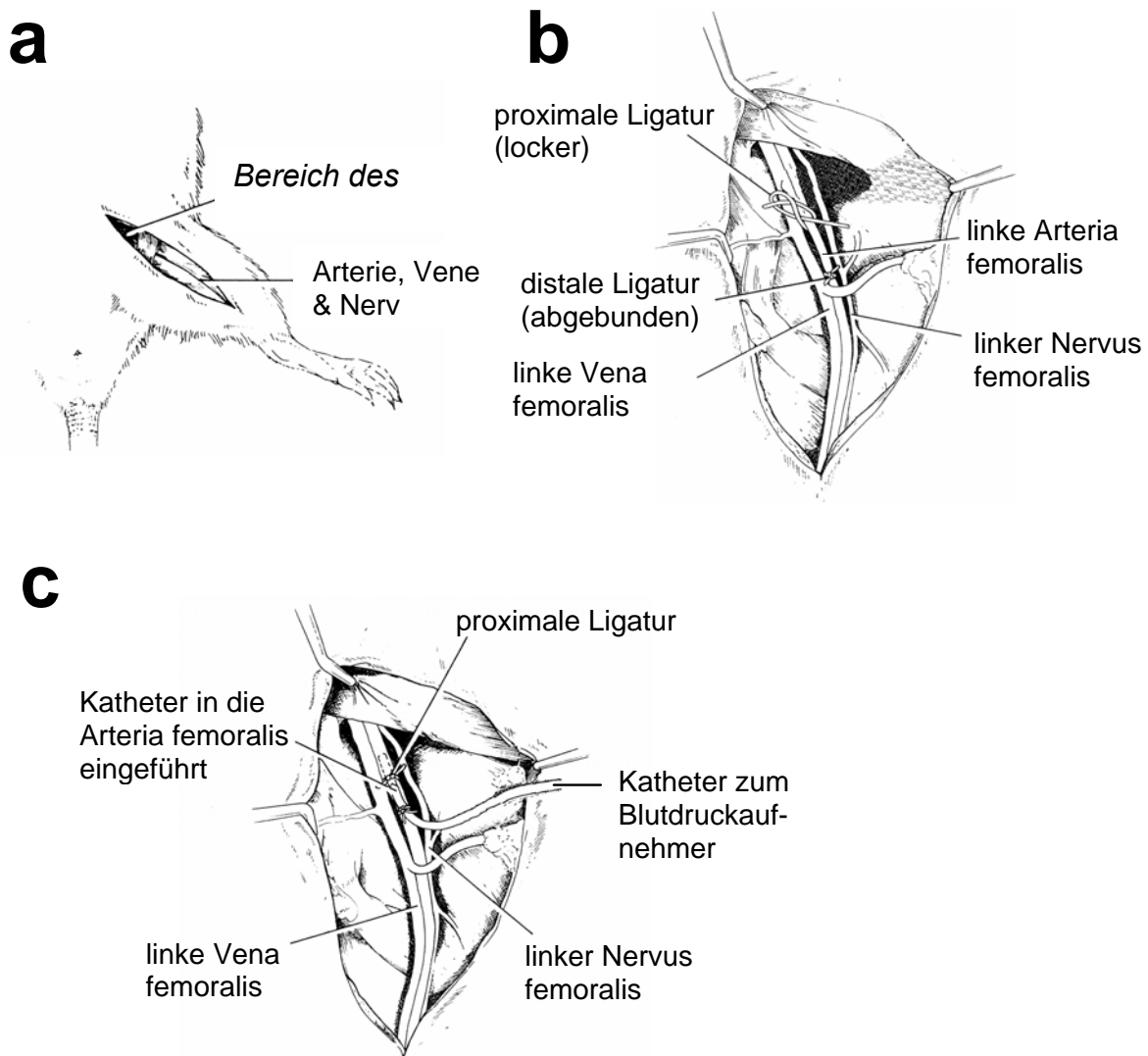


Abbildung 2.5: Implantation eines Katheters in die Arteria femoralis.

a Lokalisation des Hautschnitts, **b** Platzierung der Ligaturen und **c** Platzierung des Katheters in die Arteria femoralis.

Durch einen kleinen Halbeinschnitt mit einer mikrochirurgischen Schere zwischen den beiden Ligaturen wurde der Zugang zum Gefäßlumen geschaffen. In diesen wurde dann ein Polyethylen-Schlauch (Innendurchmesser 0.5 mm; Außendurchmesser 1 mm), gefüllt mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung), etwa 1.5 cm weit eingeschoben. Die beiden vorher gelegten Fäden dienten an dieser Stelle weiterhin zur Fixierung des Katheters am Gefäß (**Abbildung 2.5c**).

Aspiration von Blut verifizierte die korrekte Position der Katheter. Der Arterien-Katheter enthielt zusätzlich Heparin (10 IE/ml 0.9 %ige NaCl-Lsg.), um eine Thrombenbildung zu vermeiden, die die Übertragung der Druckpulsation zum Druckaufnehmer stark dämpfen und somit die Herzfrequenzmessung stören würde.

Der Arterien-Katheter diente für die Blutentnahmen zur Plasmanoradrenalin-Bestimmung und zur Registrierung des pulsierenden Blutdrucks. Applikation von Substanzen erfolgte über den venösen Zugang. Nach Vernähen der Operationsstelle wurden die Kanülen durchgespült, und der Arterien-Katheter wurde an den Blutdruckmessfühler angeschlossen.

2.3.4 Katheterisierung der Carotisarterien und Jugularvenen

(betrifft die Kapitel 2.5.2 und 2.5.3)

Bei den Versuchsgruppen mit despinalisierten Ratten erfolgte über den Zugang zur Trachea die stumpfe Freilegung der beiden Arteriae caroticae und der beiden Venae jugulares. Diese Gefäße wurden katheterisiert, indem sie rostral abgebunden wurden und etwa 1 cm hiervon Richtung kaudal jeweils ein zweiter Faden locker um die Gefäße gelegt wurde, der unter Spannung kurzfristig den Blutfluss in diesem Bereich unterdrückte. Die weitere Präparation verlief wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

Hier diente der linke Arterien-Katheter zur Registrierung des pulsierenden Blutdrucks; die rechte Arteria carotica wurde für Blutentnahmen zur Plasmanoradrenalin-Bestimmung kanuliert. Intravenöse Applikationen erfolgten über die Zugänge der Venae jugulares.

2.3.5 Vorbereitung zur spinalen Stimulation

(betrifft die Kapitel 2.5.2 und 2.5.3)

Nach Abnahme der Halothan-Narkosemaske wurden die Ratten sofort in Bauchlage despinalisiert. Diese komplette Zerstörung des ZNS wurde mit einem

rostfreien Stahlstab (Durchmesser 2 mm; Länge 18 cm; isoliert für 2 cm am sakralen Ende und 6.5 cm am kranialen Ende) vorgenommen, indem dieser durch die Orbita eingeführt und etwa 15 cm den Spinalkanal hinuntergeschoben wurde (Gillespie *et al.* 1970). Die korrekte Richtung des Vorstoßes konnte über Muskelzuckungen durch Reizung motorischer Nerven beobachtet werden, und die Zerstörung des Rückenmarks wurde durch eine den Experimenten nachfolgende Sektion nochmals überprüft. Direkt im Anschluss an die Despinalisierung begann die künstliche Beatmung mit Raumluft (Atemzugvolumen 10 ml kg^{-1} ; Atemfrequenz 50 min^{-1}). Es folgte eine subkutane Implantation und Befestigung einer 8 cm langen Kupfer-Referenzelektrode, die über einen Schnitt am Nacken der Tiere unter die Haut nach kaudal geschoben wurde.

Durch eine solche Zerstörung des ZNS können periphere Wirkungen von zentral vermittelten Wirkungen isoliert und ein künstlicher Sympathikustonus kann über elektrische Stimulation erzeugt werden.

Letztlich wurden die Nervi vagi beidseitig der Trachea durchtrennt, um vagale Einflüsse auf das Herz zu unterbinden. Nach Vernähen der Hautschnitte wurden alle Kanülen durchgespült, und der linke Arterien-Katheter wurde an den Blutdruckmessfühler angeschlossen (siehe auch **Abbildung 2.6**, S. 33).

2.3.6 Implantation des renalen Durchflussmessers und der renalen Stimulationselektrode

(betrifft das Kapitel 2.5.3)

Nach der Präparation wie in den Kapiteln 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben, wurden bei Versuchsgruppen mit Messung der arteriellen Nierendurchblutung über einen retroperitonealen Zugang (d.h. unter Umgehung des Bauchfells) die linksseitigen Nierengefäße freigelegt. Hierzu erfolgte eine 6 - 7 cm lange, längsgerichtete Inzision der Haut und Muskeln im Bereich der linken Flanke. Dabei dienten zwei Klemmen dazu, das Operationsgebiet zugänglich zu halten und die Nierengefäße leicht unter Spannung zu bringen (**Abbildung 2.6**). Unter Vergrößerung mittels eines Mikroskops wurde dann die linke Arteria renalis vorsichtig vom umgebenden Gewebe isoliert.

Anschließend wurde die Messmanschette eines Ultraschall-Doppler-Durchflussmessers (Modell 545C-4; Lumen 1 mm; Frequenz 20 MHz; Titronics Medical Instruments, Iowa, USA) um die Arterie gelegt, und der Blutfluss der linken Arteria renalis wurde kontinuierlich aufgezeichnet (Haywood *et al.* 1981). Eine

bipolare Stahldraht-Elektrode, die nierenseitig zum Durchflussmesser um die Arterie gelegt wurde, diente zur direkten Stimulation des perivaskulär verlaufenden Nierensympathikus (siehe mikroskopische Aufnahme in **Abbildung 2.6**).

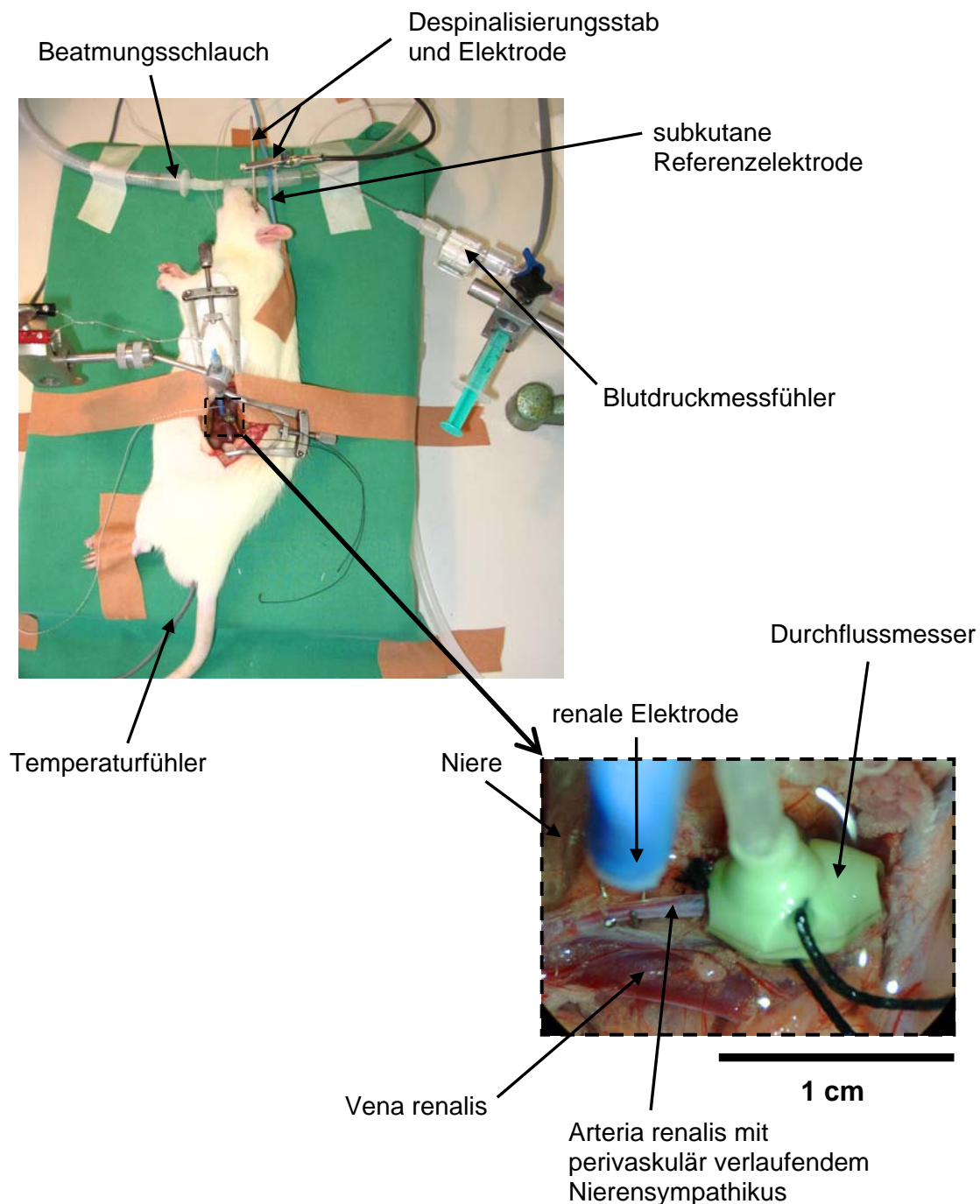


Abbildung 2.6: Versuchsmodell und mikroskopische Darstellung der Nierengefäße.

2.4 Messung der Parameter

2.4.1 Körpertemperatur

Während des Experiments wurde mit einem rektalen Thermometer die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und über eine Heizmatte auf konstant 37 - 38 °C gehalten (temperature controller [TR100]; Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland).

2.4.2 Arterieller Blutdruck und Herzfrequenz

Der pulsierende arterielle Blutdruck wurde mit Hilfe eines Blutdruckmessfühlers (Baxter, Bentley Laboratories, Uden, Niederlande), der an einen Brückenverstärker (Elektro-Manometer; Hugo Sachs, Hugstetten, Deutschland oder Grass-Telefactor AC/DC Strain Gage Amplifier, Astro-Med, Rodgau, Deutschland) angeschlossen war, registriert. Über die pulsierenden Blutdrucksignale wurde die Herzfrequenz mit Hilfe eines Kardiotachometers (HRM Typ 669; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) ermittelt.

2.4.3 Plasmanoradrenalin-Konzentration

Als zuverlässige und empfindliche Methode zur Bestimmung von Katecholaminen im Plasma hat sich die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion etabliert (Szabo *et al.* 2001a).

Ihre Wiederfindungsrate lag bei 70 - 90 % bezogen auf einen internen Standard (DHBA). Die untere Nachweisgrenze lag bei 35 pg ml⁻¹ Blutplasma.

2.4.3.1 Probengewinnung

Blut (500 µl) wurde über den arteriellen Katheter abgenommen und unverzüglich zentrifugiert (12000 x g; 3 min; 0 °C; Rotanda/RP; Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen), um daraus 200 µl Plasma zu gewinnen. Das Plasma wurde in Eppendorfreaktionsgefäßen, die 10 µl Na₂SO₃ (12.5 %) und 10 µl Na₂EDTA (10 %) enthielten, bei -20 °C eingefroren. Die abgesetzten Erythrozyten wurden mit 200 µl 0.9 %iger Kochsalzlösung resuspendiert und direkt nach der nächsten Blutentnahme zurückinjiziert.

Nach jedem Experiment wurden direkt im Anschluss an die letzte Blutentnahme zwei weitere Blutproben (e und f) entnommen. Dem Plasma der einen Probe wurden zusätzlich 10 μl eines Standards zugegeben, der aus jeweils 100 ng ml^{-1} Adrenalin, Noradrenalin (NA) und Dopamin bestand (Plasmaprobe f) (**Abbildung 2.7**). Dem Plasma der anderen Probe wurden zum Zwecke der Volumenabgleichung 10 μl Perchlorsäure zugesetzt (Plasmaprobe e). Die Differenz der analysierten Werte dieser beiden Plasmaproben ergab damit eine bestimmte Plasmanoradrenalin-Konzentration, welche die Korrektur eines Verlustes von Katecholaminen durch die Aufbewahrung und Aufbereitung der Proben ermöglichte (**Gleichung 2.1**).

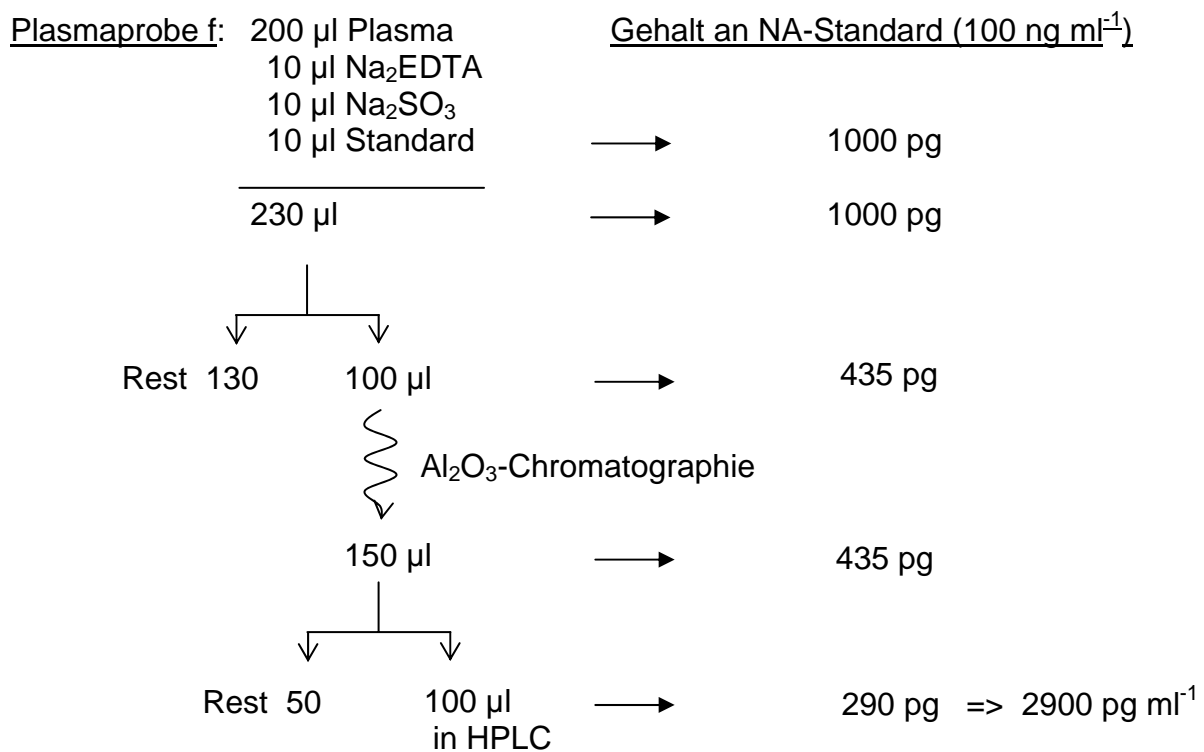


Abbildung 2.7: Aufarbeitung der Plasmaprobe f zur Ermittlung des Korrekturfaktors.

$$R_{\text{NA}} = \frac{[\text{NA}]_f - [\text{NA}]_e}{2900} \quad \text{(Gleichung 2.1)}$$

2.4.3.2 Probenaufbereitung

Am Tag der Analyse wurden die Proben (220 μl) aufgetaut. Nach Zentrifugation (2500 x g; 15 min; 4 °C) wurden je 100 μl Plasma in eine Filtereinheit (C4; Sartorius, Göttingen) gegeben. Das Plasma wurde im nächsten Schritt mit 25 μl Na_2SO_3 (1 %), 25 μl Na_2EDTA (1.25 %), 100 μl Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (2 mol l^{-1} ; mit konzentrierter HCl auf pH = 8,3 eingestellt) und 10 mg Al_2O_3 gemischt.

Jeder Probe wurden zudem 10 μl eines internen Standards (200 ng ml^{-1} DHBA) zugesetzt. Mit Hilfe der bekannten Menge des Standards und des durch die Anlage gemessenen Wertes war die Wiederfindungsrate des HPLC-Systems bekannt, und ein zweiter Korrekturfaktor konnte errechnet werden.

Nach fünfminütigem Schütteln wurde das Gemisch zentrifugiert (1000 x g; 3 min; 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zentrifugat enthielt das Aluminium, an das die Katecholamine gebunden waren. Dann wurde das Aluminium zweimal mit je 100 μl destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurden die Katecholamine zweimal mit jeweils 75 μl HClO_4 (0.1 mol l^{-1}) eluiert. Auf jeden dieser vier Vorgänge folgte erneute Zentrifugation. Am Ende dieser Arbeitsschritte lagen die Katecholamine in 150 μl Perchlorsäure gelöst vor.

2.4.3.3 HPLC

Aufbau. Die HPLC-Anlage war aus einer Waters „514 Pumpe“ (Waters, Eschborn), einem „Waters 717plus sample injector“, einer C-18 reversed phase „Prontosil“-Säule (125 x 4 mm; Teilchengröße 3 μm ; Bischoff, Leonberg), einem „Intro electrochemical detector“ (Antec Leyden, Leiden, Niederlande) und einem Datenerfassungssystem (Software „Millenium“ von Waters) aufgebaut (**Abbildung 2.8**).

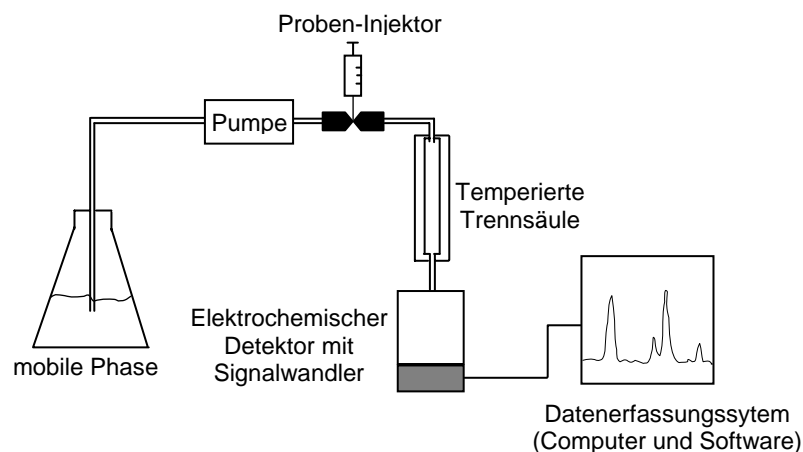


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.

Prinzip. Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) macht man sich das unterschiedliche Verhalten von Stoffen bei Phasenübergängen zwischen einer mobilen und einer stationären Phase zunutze. Die mobile Phase stellt eine Flüssigkeit dar, während die stationäre Phase häufig ein modifiziertes Kieselgel ist (z.B. mit alkylierten Silanol-Gruppen), das dicht gepackt in einer Trennsäule vorliegt. Da dem Durchfließen der mobilen Phase durch die hohe Packungsdichte der stationären Phase ein sehr hoher Widerstand entgegengesetzt wird, verwendet man Hochdruckpumpen, die das Elutionsmittel aus dem Vorratsgefäß mit hohem Druck durch die Trennsäule pressen.

Mobile Phase. Die Zusammensetzung der wässrigen mobilen Phase ist **Tabelle 2.1** zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der mobilen Phase für die HPLC.

Substanz	Menge / Volumen
1-Octansulfonsäure	1.40 g
Citronensäure-Monohydrat	13.42 g
EDTA-Dinatriumsalz	0.98 g
Natriumacetat	14.70 g
Wasser bidest.	1914 ml

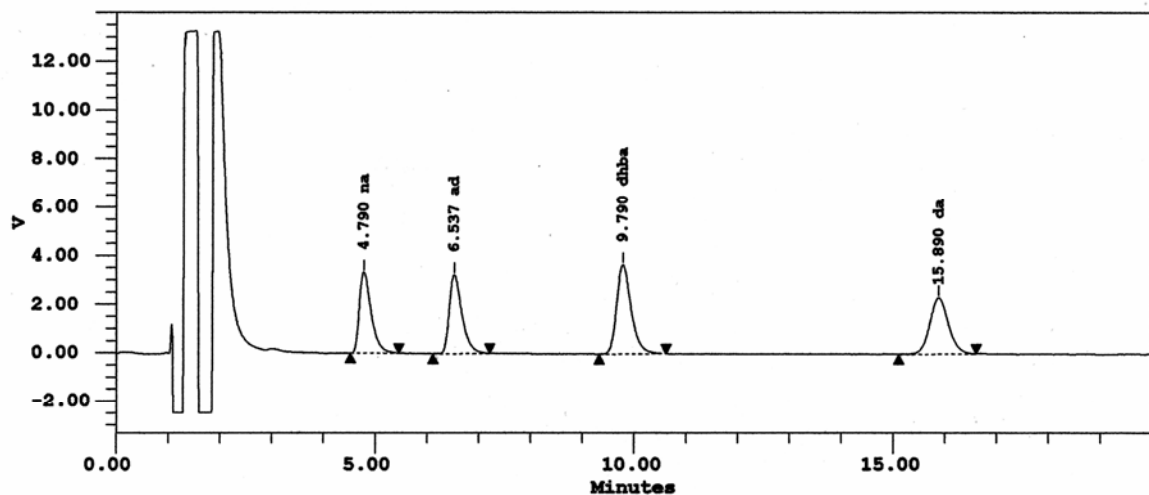
Nach 30-minütigem Rühren wurde die Lösung mit NaOH (10 molar) auf einen pH-Wert von 5.3 - 5.35 eingestellt. Zuletzt wurden noch 160 ml Methanol dazugegeben. Vor der Verwendung wurde diese Lösung nochmals filtriert.

2.4.3.4 Analytische Trennung und quantitative Bestimmung

100 µl der in Perchlorsäure gelösten Katecholamine wurden zur Trennung über den Probeneinlass in das HPLC-System gegeben, mit der mobilen Phase bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ über die auf konstant 38 °C temperierte Säule geleitet und hier durch unterschiedliche, v.a. hydrophobe Wechselwirkungen

mit der stationären Phase voneinander getrennt. Zur Detektion der verschiedenen Katecholamine diente eine elektrochemische Zelle, die den Oxidationsstrom an der Arbeitselektrode, der durch Abgabe von Elektronen bei einer Spannung von 0.6 V erzeugt wurde, misst. Dieser Strom wurde über einen Signalumwandler in Form von Peaks im Chromatogramm registriert und ist direkt proportional zur jeweiligen Menge der Katecholamine (Integral einer Peakfläche) (**Abbildung 2.9**).

Zur Bestimmung der Retentionszeiten und zur Kalkulationskontrolle wurde vorab ein sogenannter Plasma-Kalibrator in das HPLC-System eingespritzt (**Abbildung 2.9**). Die Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software „Millenium“ von Waters ausgewertet und schließlich unter Berücksichtigung der beiden Korrekturfaktoren (s. Kapitel 2.4.3.1 und 2.4.3.2) berichtigt.



Peak Results

	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1	na	4.790	5266200	333171	10000.000	BB
2						
3	ad	6.537	5494781	323911	10000.000	BB
4	dhba	9.790	7144969	367204	10000.000	BB
5	da	15.890	5759955	230745	10000.000	BB

Abbildung 2.9: Musterchromatogramm des aufgearbeiteten Plasma-Kalibrators.

Ret Time = Retentionszeiten; na: Noradrenalin; ad: Adrenalin; dhba: Dihydroxybenzylamin (interner Standard); da: Dopamin.

2.4.4 Atmung

2.4.4.1 Messkette

Der tracheale Katheter wurde an einen Pneumotachometer (Typ 378/1.2; Hugo Sachs, Hugstetten, Deutschland) mit Differenzdruckaufnehmer (Validyne; Hugo Sachs, Hugstetten, Deutschland) angeschlossen, der an eine Trägerfrequenz-Messbrücke (CFBA, Hugo Sachs, Hugstetten, Deutschland) gekoppelt war. So konnte der Luftstrom kontinuierlich aufgezeichnet werden. Aus dem Luftstromsignal wurde mit Hilfe einer Software (Polyview; Grass Instruments, Astro-Med, Rodgau, Deutschland) die Atemfrequenz (RR), der Peak-Luftstrom während der Inspiration (im folgenden Peak-Luftstrom oder PIF) und das Atemzugvolumen (V_T) ermittelt (das Atemzugvolumen wurde aus der Fläche unter der Luftstromkurve während der Einatmung berechnet) (**Abbildungen 3.4**, S. 58 und **3.5**, S. 59). Das Atemminutenvolumen (V_E) wurde als Produkt der Atemfrequenz (RR) und des Atemzugvolumens (V_T) berechnet:

$$V_E = RR \cdot V_T \quad \text{(Gleichung 2.2)}$$

2.4.4.2 Prinzip des Pneumotachometers

Der Pneumotachometer (PTM) ist ein Messwertaufnehmer zur Messung des Atem-Luftstroms (**Abbildung 2.10**). Der PTM ist aus transparentem Plexiglas hergestellt, so dass der Messkanal während des Experiments gut zu kontrollieren ist. Schleim, der während des Experiments in der Trachea auftritt und in den PTM gelangen kann, lässt sich gut beobachten. Man kann rechtzeitig eingreifen, um größere Messfehler zu vermeiden, welche durch einen erhöhten Luftstromwiderstand entstehen würden, der durch die Verengung im PTM-Messkanal hervorgerufen werden könnte. Zudem besitzt Plexiglas eine geringe Wärmeleitfähigkeit. Die Neigung zur Kondensationsbildung im PTM durch die feuchte Ausatemluft ist deshalb gering.

Technische Daten

Typ 378/1.2 für Ratten

Kennzeichnung:	378/12
Empfindlichkeit:	10 mmH ₂ O bei 27 ml·s ⁻¹
Nominaler Messbereich:	27 ml/s
Flusswiderstand:	0.4 mmH ₂ O·s·ml ⁻¹
Totvolumen:	ca. 50 µl

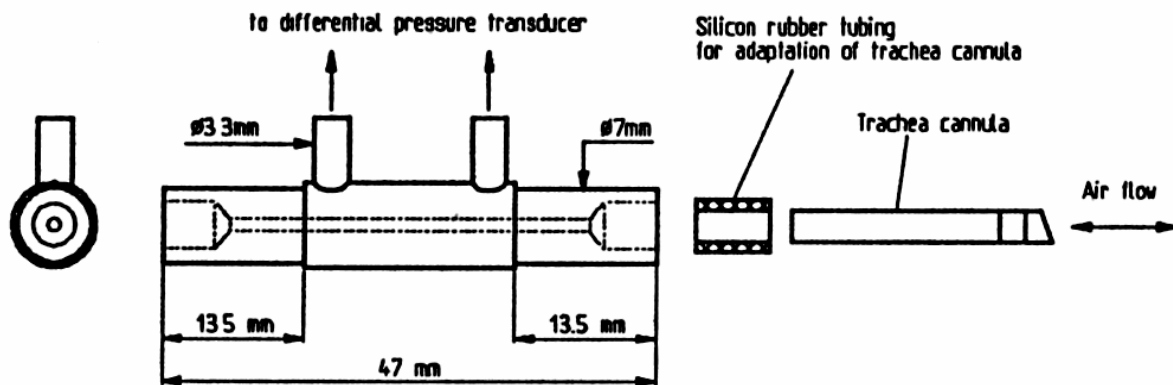


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung eines Pneumotachometers mit den wichtigsten technischen Daten.

Das Grundprinzip des PTM ist die Erzeugung einer geringen Druckdifferenz (bis ± 10 mmH₂O), die sich proportional zum Luftstrom verhält (**Abbildung 2.11**), von einem Differenzdruckaufnehmer registriert und an die Trägerfrequenz-Messbrücke weitergeleitet wird.

Vor dem Einsatz wurde eine Volumenkalibrierung des PTM durchgeführt. Hierzu wurden mit Hilfe des Beatmungsgerätes definierte Luftvolumina (ein Hub des Kolbens stellte das Atemzugvolumen einer Ratte dar) durch das PTM geführt und die mit dem Softwareprogramm Polyview aufgenommenen Luftstromsignale integriert. Bei Abweichungen der ermittelten mit den tatsächlichen Luftvolumina erfolgte eine Anpassung der Softwareeingaben.

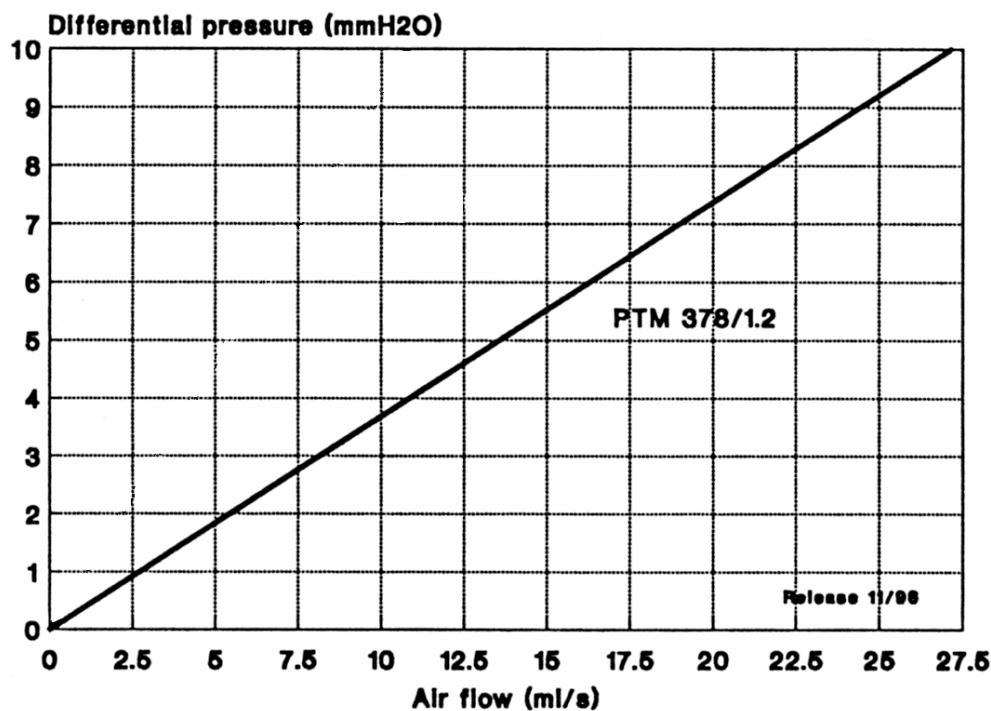


Abbildung 2.11: Kennlinie Luftstrom/Druckdifferenz.

378/1.2: Typ des Pneumotachometers

2.4.5 Nierenblutfluss und renaler vaskulärer Widerstand

2.4.5.1 Messprinzip des Durchflussmessers

Das Detektionssystem des Durchflussmessers (**Abbildung 2.6**, S. 33) besteht aus einem piezoelektrischen Kristall, der ein 20 MHz Ultraschall-Signal aussendet. Derselbe Kristall empfängt das durch im Gefäß vorbeiströmende Blutkörperchen reflektierte Signal in den Intervallen zwischen den Ultraschall-Pulsen (**Abbildung 2.12**). Verschiebungen der zurückkommenden Frequenz, Doppler-Shift genannt, sind proportional zu der Geschwindigkeit der Blutkörperchen in dem Gefäß und somit zum Blutfluss. Der Doppler-Shift (kHz) ist daher ein relativer Index des Blutflusses (ml min^{-1}). Eine lineare Beziehung zwischen Doppler-Shift und Blutvolumenfluss besteht, solange Winkel und Abstand des piezoelektrischen Kristalls zur Mitte des Gefäßes konstant bleiben.

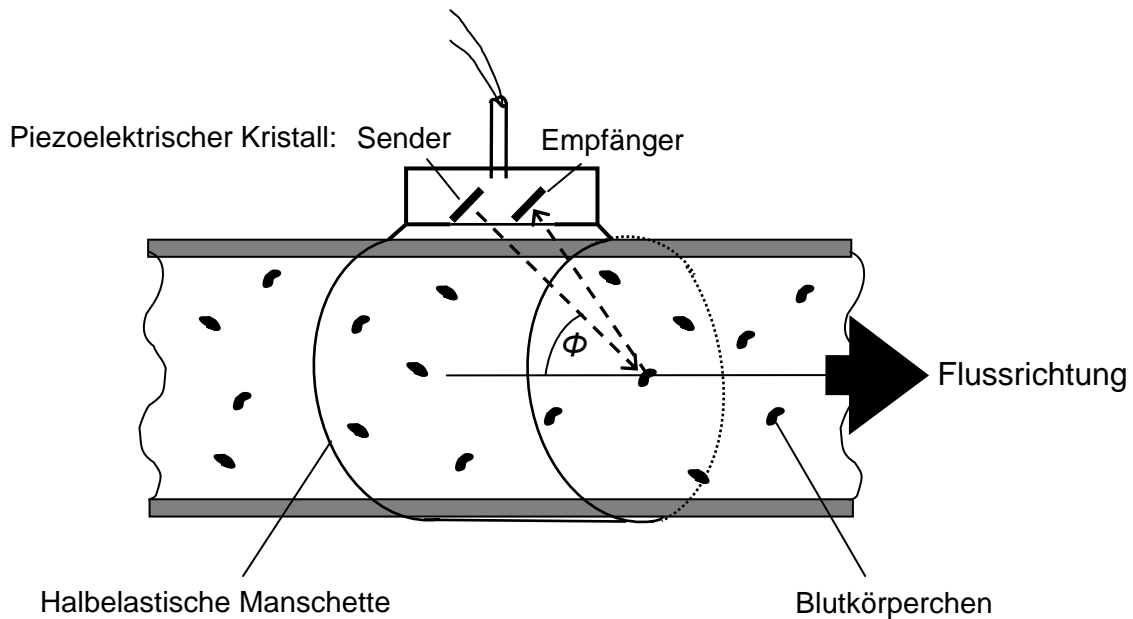


Abbildung 2.12: Prinzip eines Doppler-Durchflussmessers.

Ausgehend vom pulsierenden Blutfluss wurde mit Hilfe der Software Polyview der mittlere renale Blutfluss (MRF) dargestellt. Der renale vaskuläre Widerstand (RVR) wurde ermittelt als Quotient aus dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und dem mittleren renalen Blutfluss:

$$RVR = MAP / MRF \quad \text{(Gleichung 2.3)}$$

2.4.5.2 Verhinderung der Störanfälligkeit

Luft bildet eine effektive Barriere für Ultraschall im Frequenzbereich von 1 bis 20 MHz. Schon eine winzige Luftblase auf der Oberfläche einer Kristalleinheit kann das Signal blockieren oder dämpfen. Um eine adäquate Messung zu gewährleisten, wurde deshalb die Wundhöhle mit schallleitender Agar-Masse blasenfrei ausgegossen, die dann ebenso den Raum zwischen Arterie und Flussmesser ausfüllte. Zum einen diente dies der besseren Übertragung des Ultraschall-Signals, zum anderen, durch die gelartige Festigkeit, der Fixierung und damit einer Stabilisierung des Arterienmessers gegenüber Gefäßbewegungen durch Blutdruckpulse und Atembewegungen.

Hergestellt wurde das gummiartige Gel, indem 0.55 g Agar unter Rühren in 25 ml kochendes Wasser gegeben und 5 min im Wasserbad gekocht wurden. Nach anschließendem Abkühlen auf etwa 40 °C war die Agar-Masse gebrauchsfertig. Nachdem sie in die Wundhöhle gegossen wurde, erreichte sie innerhalb von 10 - 15 Minuten ihre gummiartige Festigkeit.

2.5 Versuchsabläufe und -protokolle

Im Folgenden sind grundsätzliche Abläufe beschrieben, die für alle Versuchsreihen Gültigkeit besitzen, sofern in den Kapiteln nichts anderes angegeben ist.

Die Messung der Parameter begann im Anschluss an die chirurgische Präparation. Nachdem sich die Parameter stabilisiert hatten, wurde die Zeit auf Null gesetzt ($t = 0$ min). Während der nächsten 15 Minuten wurden Referenzwerte, sogenannte PRE-Werte, für die Parameter bestimmt. Diese PRE-Periode ist in den entsprechenden Abbildungen dargestellt. Die zu bestimmenden Parameter wurden mit der Software Polyview vom Zeitpunkt $t = 0$ min bis zum Ende des Experiments kontinuierlich aufgezeichnet und alle zwei Minuten ausgewertet. Die Plasma-noradrenalin-Konzentration wurde zweimal während der PRE-Periode (bei $t = 0$ und 15 min) sowie 15 Minuten nach jeder Substanzinjektion bestimmt.

2.5.1 Experimente zur Bestimmung der Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System

Nach der PRE-Periode wurden das Lösungsmittel ($25 \mu\text{l kg}^{-1}$) oder ansteigende Dosen der Cannabinoide WIN55212-2 (1, 3, 10 und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) und WIN55212-3 (1, 3, 10 und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) oder des μ -Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO ($0.1, 0.3, 1$ und $3 \mu\text{g kg}^{-1}$) bei $t = 20, 40, 60$ und 80 min intracisternal (i.c.) verabreicht (für das Versuchsprotokoll siehe **Originalabbildung 3.4**, S. 58). In zwei weiteren WIN55212-2 Gruppen wurden die Tiere entweder mit dem CB_1 -Cannabinoidrezeptor-Antagonisten Rimonabant (2 mg kg^{-1} i.v.) oder dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon (0.2 mg kg^{-1} i.v.) jeweils zum Zeitpunkt $t = -20$ min vorbehandelt. Naloxon (0.2 mg kg^{-1} i.v.) wurde ebenfalls in einer weiteren DAMGO Gruppe zum Zeitpunkt $t = -20$ min verabreicht.

2.5.2 Experimente zur Bestimmung der Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung

2.5.2.1 Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus

Bei diesen Versuchsgruppen wurde eine Injektion von Methylatropin (1 mg kg^{-1}) verabreicht, um muskarinische Acetylcholinrezeptoren zu blockieren. Die Versuchstiere wurden dann mit Pancuronium (2 mg kg^{-1}) paralyisiert, bevor das gesamte sympathische Nervensystem kontinuierlich über den Despinalisierungsstab mit Hilfe eines Stimulators (Typ 215/II; Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) gereizt wurde (mit 40 mA , 0.5 ms Rechteckpulsen bei 1 Hz , oder mit 80 mA , 0.5 ms Rechteckpulsen bei 3 Hz). Zusätzliches Pancuronium (0.25 mg kg^{-1}) wurde verabreicht, wenn es nötig war.

Bei $t = 20$ und 40 min wurden entweder das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder zwei Dosen Rimonabant (0.5 und 2 mg kg^{-1}) oder WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg^{-1}) injiziert (**Abbildung 2.13**).

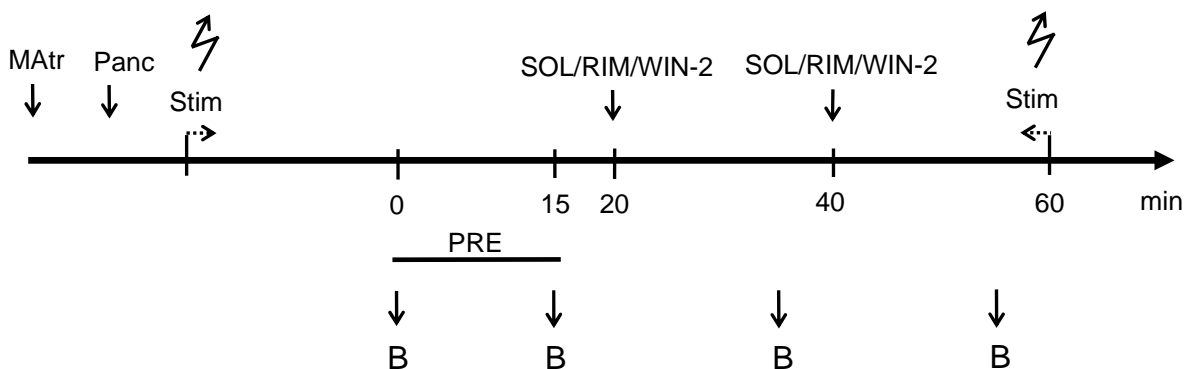


Abbildung 2.13: Versuchsprotokoll.

Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus.

B: Blutentnahmen; MAtr: Methylatropin; Panc: Pancuronium; PRE: Referenzwerte; RIM: Rimonabant; SOL: Lösungsmittel; Stim: Stimulation; WIN-2: WIN55212-2.

2.5.2.2 Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus und i.v.-Infusion

Die Tiere wurden zunächst, wie in Kapitel 2.5.2.1 Abschnitt 1 beschrieben, für die Sympathikusstimulation vorbereitet. Danach unterschied sich das Versuchsprotokoll von den vorigen wie folgt:

Nach dem Start der Stimulation und Stabilisierung der Parameter wurde mit einer Infusion von Vasopressin ($4 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) oder Phenylephrin ($10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) begonnen. Nachdem sich die Parameter erneut stabilisieren konnten, wurde die Zeit auf Null gesetzt ($t = 0$), und die aufgrund der zusätzlichen Infusion lediglich 10-minütige PRE-Periode für die Referenzwerte begann. Das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder Rimonabant (2 mg kg^{-1}) wurden zum Zeitpunkt $t = 15 \text{ min}$ injiziert.

Die Plasmanoradrenalin-Konzentration wurde zweimal während der Stimulation vor Infusion, zweimal während der PRE-Periode (bei $t = 0$ und 10 min) sowie 5 und 10 Minuten nach der Substanzinjektion bestimmt (für das Versuchsprotokoll siehe **Originalabbildung 3.11**, S. 68).

2.5.2.3 Despinalisierte Ratten mit einer blutdrucksteigernden Infusion von Noradrenalin

In diesen Tieren wurde der Sympathikotonus nicht elektrisch stimuliert. Stattdessen bekamen sie nach der Präparation eine kontinuierliche Infusion von Noradrenalin ($1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), um den vaskulären Tonus zu erhöhen.

Nach Stabilisierung der Parameter begann die PRE-Periode. Bei $t = 20$ und 40 min wurden entweder das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder zwei Dosen WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg^{-1}) injiziert (**Abbildung 2.14**).

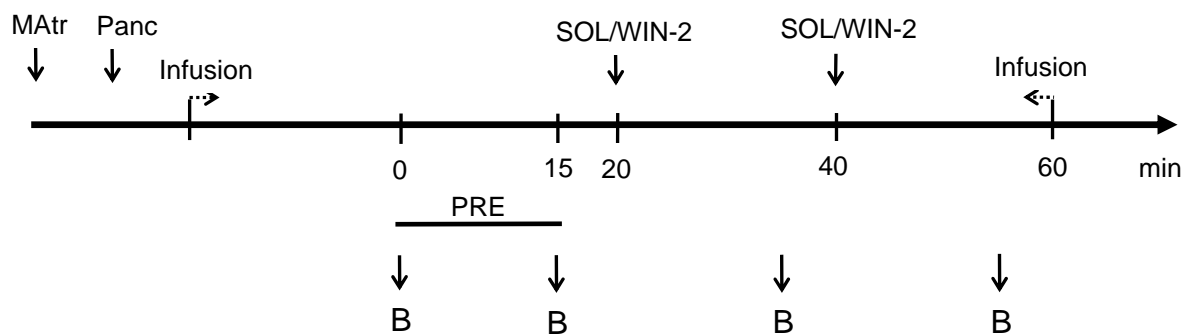


Abbildung 2.14: Versuchsprotokoll.

Depressionierte Ratten mit einer blutdrucksteigernden Infusion von Noradrenalin.
 B: Blutentnahmen; MAtr: Methylnatropin; Panc: Pancuronium; PRE: Referenzwerte;
 SOL: Lösungsmittel; WIN-2: WIN55212-2.

2.5.3 Experimente zur Bestimmung der Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung

Nach der Präparation wie in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.4 - 2.3.6 beschrieben, wurden Methylnatropin und Pancuronium (s. Kapitel 2.5.2.1) injiziert.

Die Parameter stabilisierten sich, und die PRE-Periode begann (für das Versuchsprotokoll siehe **Originalabbildung 3.16**, S. 74). Im Wechsel erfolgte jeweils eine Minute lang die postganglionäre Stimulation des Nierensympathikus (renale Stimulation) oder die präganglionäre Stimulation im Spinalkanal (spinale Stimulation) mit 8 V, 0.5 ms Rechteckpulsen bei 2 Hz. Zwischen den beiden Stimulationsarten lag immer ein Intervall von 5 Minuten. Auf diese Weise wurden innerhalb der PRE-Periode jeweils zwei Referenzwerte der beiden Stimulationsarten bestimmt.

Bei $t = 20$ und 35 min wurden dann entweder das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder zwei Dosen WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg^{-1}) injiziert. Jeweils 5 Minuten nach einer Injektion folgten wieder im 5 Minuten-Intervall die renale und die spinale Stimulation. In einer weiteren WIN55212-2 Gruppe wurden die Tiere mit dem CB_1 -Cannabinoidrezeptor-Antagonisten Rimonabant (2 mg kg^{-1} i.v.) zum Zeitpunkt $t = -20$ min vorbehandelt.

2.5.4 Verifizierung der adrenerg vermittelten Wirkung bei postganglionärer Stimulation des Nierensympathikus

Um sicherzustellen, dass die durch postganglionäre Stimulation des Nierensympathikus ausgelöste Wirkung adrenerg vermittelt war, wurden einige Experimente ausgeführt, bei denen nach der PRE-Periode die antisymphoton wirkende Substanz Guanethidin (5 mg kg^{-1} i.v.) gegeben wurde.

2.5.5 Verifizierung der präganglionären Stimulation

Am Ende einiger Experimente der Studien mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus (s. Kapitel 2.5.2.1, 2.5.2.2 und 2.5.3) wurde die ganglienblockierende Substanz Mecamylamin (2 mg kg^{-1}) gegeben, um sicherzustellen, dass die elektrische Stimulation wirklich präganglionär stattfand. In Experimenten mit i.v.-Infusion wurde diese 10 Minuten vor der Mecamylamin-Injektion beendet.

2.6 Materialien

2.6.1 Substanzen

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Substanzen sind der unten aufgeführten **Tabelle 2.2** zu entnehmen.

Tabelle 2.2: *Liste der verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen.*

SUBSTANZ	MOLEKULARGEWICHT [g mol ⁻¹]	BEZUGSQUELLE
Agar High Gel Strength; Ash: 3-4 %	-----	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Adrenalin-Bitartrat	333.3	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Alkamuls EL-620 (Emulphor) Polyoxyethyliertes Oleum Ricini; Emulgator	-----	Rhône-Poulenc Cranbury, NJ, USA
Aluminiumoxid	101.9	Recipe München, Deutschland
Arginin-Vasopressin	1084.2	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	210.1	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
[D-Ala ² ,NMe-Phe ⁴ ,Gly-ol ⁵]-enkephalin (DAMGO)	513.7	Tocris Bristol, UK
3,4-Dihydroxybenzylamin-HBr 98 % (DHBA)	220.1	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Evans Blau	960.8	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Dopamin-HCl	189.6	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Ethanol 100%	46.1	Rhône-Poulenc Cranbury, NJ, USA
Guanethidin-Sulfat	494.7	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland

SUBSTANZ	MOLEKULARGEWICHT [g mol ⁻¹]	BEZUGSQUELLE
Halothan	-----	AstraZeneca GmbH Wedel, Deutschland
Heparin-Natrium	-----	B. Braun Melsungen, Deutschland
Mecamylamin-HCl	203.8	Merck & CO, INC. Rahway, NJ, USA
Methanol 99.9%	32.0	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Methylatropin-Br	384.3	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Naloxon-HCl	399.8	Tocris Bristol, UK
Natriumacetat	82.0	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂	372.2	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	40.0	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumsulfit	126.0	Merck Darmstadt, Deutschland
Noradrenalin-Bitartrat	319.3	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
1-Octansulfonsäure	216.3	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Pancuronium-Br	732.7	Organon Teknika Oss, Niederlande
Perchlorsäure 70-72 %	-----	Merck Darmstadt, Deutschland
(R)-(-)-Phenylephrin-HCl	203.7	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
Rimonabant (SR141716A)	463.8	Sanofi-Synthelabo Montpellier, Frankreich (Schenkung)

SUBSTANZ	MOLEKULARGEWICHT [g mol ⁻¹]	BEZUGSQUELLE
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	121.1	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Urethan	89.1	Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland
WIN55212-2 R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3[(morpholinyl)methyl] pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate	523.2	Tocris Bristol, UK
WIN55212-3 S(-)-[2,3-dihydro-5-methyl-3[(morpholinyl)methyl] pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate	523.2	Tocris Bristol, UK
Lidocain-HCl 2 %	270.8	Astra GmbH Wedel, Deutschland

Die Cannabionidrezeptor-Liganden WIN55212-2 (2 mg ml⁻¹), WIN55212-3 (2 mg ml⁻¹) und Rimonabant (4 mg ml⁻¹) wurden in einer Mischung aus Ethanol/Alkamuls EL-620/NaCl-Lsg. (0.9 %) (1/1/8, v/v/v) gelöst und weiter verdünnt.

Arginin-Vasopressin (0.1 mg ml⁻¹), DAMGO (1 mg ml⁻¹), Mecamylamin (2 mg ml⁻¹), Methylatropin (1 mg ml⁻¹), Naloxon (1.2 mg ml⁻¹), Noradrenalin (1 mg ml⁻¹), Pancuronium (2 mg ml⁻¹), Phenylephrin (1 mg ml⁻¹) und Urethan (0.25 mg ml⁻¹) wurden in NaCl-Lsg. (0.9 %) gelöst und gegebenenfalls verdünnt.

In der ersten Experimentenserie (Kapitel 2.5.1) wurden DAMGO, WIN55212-2 und WIN55212-3 intracisternal (i.c.) appliziert, alle anderen Substanzen wurden immer intravenös (i.v.) gegeben. Das Bolusvolumen von 25 µl kg⁻¹ (i.c.) bzw. 0.5 - 1 ml kg⁻¹ (i.v.) wurde innerhalb von 1 - 1.5 Minuten injiziert, gefolgt von einem Durchspülen der Katheter mit 10 µl (i.c.) bzw. 0.2 ml (i.v.) NaCl-Lsg. (0.9 %). Infusionen wurden mit einer Rate von 1.9 ml h⁻¹ infundiert.

Alle in vorliegender Arbeit angegebenen Dosen beziehen sich auf die jeweiligen Salze der Substanzen.

2.6.2 Geräte

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Geräte sind der unten aufgeführten **Tabelle 2.3** zu entnehmen.

Tabelle 2.3: *Liste der verwendeten Geräte und deren Bezugsquellen.*

GERÄT	BEZUGSQUELLE
Beatmungspumpe rodent ventilator 7025	Biological Research Apparatus Ugo Basile, Comerio, Italien
Blutdruckmessfühler Uniflow™	Baxter Bentley Laboratories Uden, Niederlande
Brückenverstärker Elektro-Manometer, Transducer Type	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Differenzdruckaufnehmer Validyne Typ DPT 45-14	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Doppler-Durchflussmesser Modell 545C-4, gleichgerichtete Impulse, Messfühler: Typ Manschette, Lumen: 1 mm, Frequenz: 20 MHz	Titronics Medical Instruments Iowa, USA
HPLC-Detektor Intro electrochemical detector	Antec Leyden Leiden, Niederlande
HPLC-Hochdruckpumpe Modell 514	Waters Eschborn, Deutschland
HPLC-Probengeber Modell 717plus autosampler	Waters Eschborn, Deutschland
HPLC-Säulenthermostat Modell Jetstream Plus	Thermotechnic Products GmbH Langensersdorf, Österreich
Kardiotachometer HRM Typ 669	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Mikroskop Stereo-Zoom SZ-STU2	Olympus Hamburg, Deutschland
Narkosemittel-Verdunster Halothan Vapor 19.3, eingebaut	Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland
Oszilloskop HM 205-3	Hameg Frankfurt, Deutschland

GERÄT	BEZUGSQUELLE
Perfusor Typ VI	B. Braun Melsungen, Deutschland
Pneumotachometer Typ 378/1.2	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Stereotaktischer Rahmen Modell 900 small animal	David Kopf Instruments Tujunga, California, USA
Stimulator Typ 215/II	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Temperaturregler Modell TR100	Fine Science Tools Heidelberg, Deutschland
Trägerfrequenz-Messbrücke CFBA: <u>C</u> arrier <u>F</u> requency <u>B</u> ridge <u>A</u> mplifier, Typ 677	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Verstärker AC/DC Strain Gage Amplifier, Modell 122	Grass / Astro-Med Rodgau, Deutschland

2.7 Statistik

In jedem Experiment wurden die während der PRE-Periode ermittelten Referenzwerte eines jeden Parameters gemittelt, um vor der Substanzgabe initiale Absolutwerte (PRE) zu erhalten. Alle weiteren Werte wurden als Prozentanteil von PRE ausgedrückt.

Die in Text und Abbildungen aufgeführten Ergebnisse sind als Mittelwerte aus n Experimenten \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Statistische Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit dem nicht-parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-Test ausgewertet. Statistische Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurden mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Wilcoxon signed rank-Test beurteilt.

Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede diente der vorher festgelegte P -Wert, der bei $P < 0.05$ Signifikanz anzeigt. Es ist durchweg nur dieses Signifikanzniveau angezeigt, auch wenn $P < 0.01$ oder 0.001 war.

Als Software für die statistische Auswertung wurde SPSS für Windows v. 10.0; SPSS, Chicago, IL, USA, herangezogen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System

3.1.1 Referenzwerte (PRE-Werte)

Die bei $t = 0$ und 15 min bestimmten Werte der Parameter wurden gemittelt, um die absoluten Initialwerte (PRE-Werte) vor intracisternaler (i.c.) Substanzgabe zu erhalten. Die PRE-Werte der verschiedenen Gruppen sind in **Tabelle 3.1** dargestellt.

Vorbehandlung mit dem CB₁-Cannabinoidrezeptor-Antagonisten Rimonabant (2 mg kg⁻¹ i.v.) hat die Atemfrequenz und die kardiovaskulären Parameter nicht beeinflusst. Der Peak-Luftstrom (PIF), das Atemzugvolumen (V_T) und das Atemminutenvolumen (V_E) waren jedoch in der Rimonabant-behandelten Gruppe höher. Vorbehandlung mit dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon (0.2 mg kg⁻¹ i.v.) hat außer einer leichten Erhöhung des Peak-Luftstroms keine Änderungen der respiratorischen und kardiovaskulären Parameter hervorgerufen.

Tabelle 3.1: *Initiale Werte der Parameter vor i.c.-Injektion von Lösungsmittel, Cannabinoid- oder Opioidliganden (PRE-Werte^a).*

Vorbehandlung	ohne Vorbehandlung	RIM^b	Naloxon^c
Anzahl (n) der Tiere	40	7	12
<u>Respiratorische Parameter</u>			
Atemfrequenz [min ⁻¹]	122 ± 3	114 ± 4	114 ± 6
Peak-Luftstrom [ml min ⁻¹]	133 ± 2	169 ± 5*	150 ± 5*
Atemzugvolumen [ml (100g) ⁻¹]	0.63 ± 0.01	0.79 ± 0.04*	0.62 ± 0.02
Atemminutenvolumen [ml (100g x min) ⁻¹]	77 ± 2	90 ± 5*	70 ± 3
<u>Kardiovaskuläre Parameter</u>			
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	77 ± 2	76 ± 4	79 ± 2
Herzfrequenz [min ⁻¹]	399 ± 7	415 ± 20	389 ± 10
Plasmanoradrenalin-Konzentration [pg ml ⁻¹]	816 ± 62	1012 ± 87	706 ± 73

^a PRE-Werte sind Mittelwerte der Werte, die bei $t = 0$ und 15 min gemessen wurden

^b RIM (2 mg kg⁻¹) wurde bei $t = -20$ min i.v. injiziert

^c Naloxon (0.2 mg kg⁻¹) wurde bei $t = -20$ min i.v. injiziert

* $P < 0.05$ versus "ohne Vorbehandlung"

3.1.2 Kontroll-Experimente

In der einen Kontroll-Gruppe wurde das Lösungsmittel (SOL) für die Cannabinoide viermal i.c. injiziert (je $25 \mu\text{l kg}^{-1}$). Außer kurzweiligen ($< 6 \text{ min}$) und geringen ($\sim 5 \text{ mmHg}$) Senkungen des Blutdrucks, blieben die gemessenen Parameter bei diesen Tieren stabil (**Abbildungen 3.1** und **3.2**).

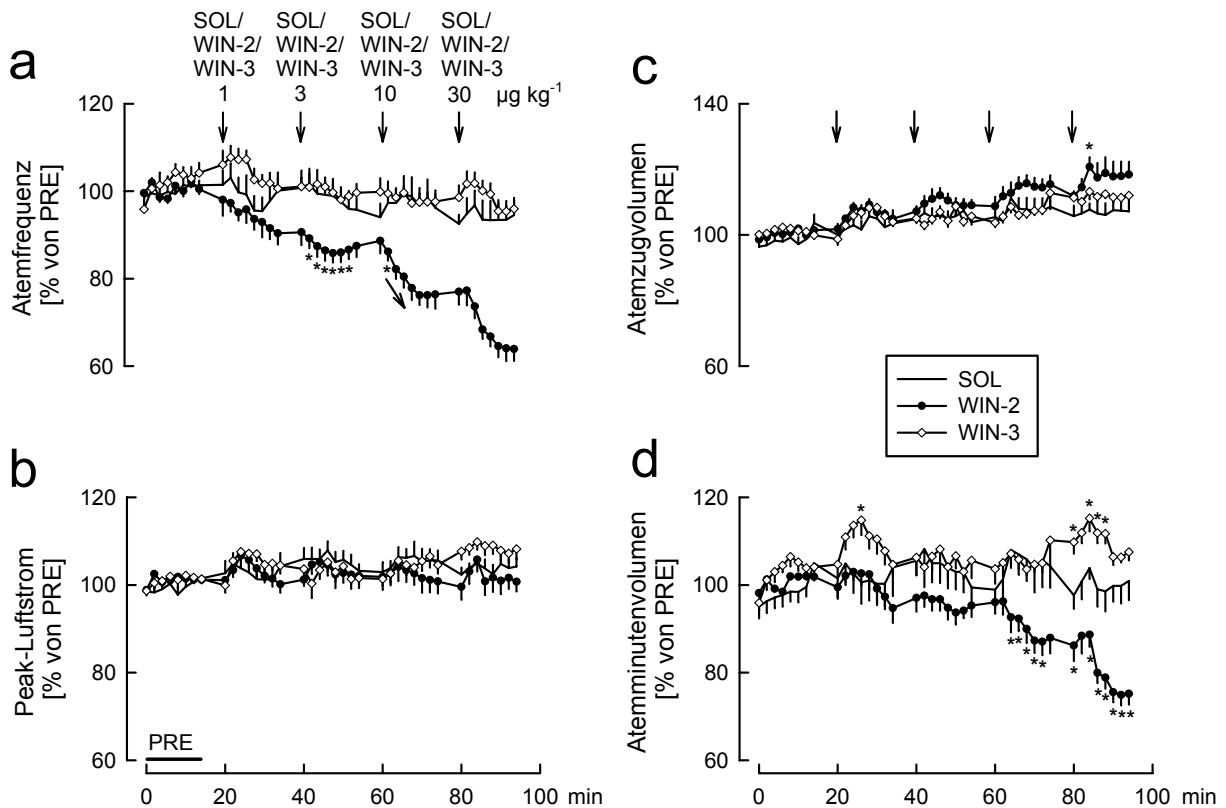


Abbildung 3.1: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und WIN55212-3 (WIN-3) auf **a** die Atemfrequenz, **b** den Peak-Luftstrom während der Inspiration, **c** das Atemzugvolumen und **d** das Atemminutenvolumen. SOL ($25 \mu\text{l kg}^{-1}$), WIN-2 (1, 3, 10 und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) und WIN-3 (1, 3, 10 und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von jeweils 8 Experimenten. * $P < 0.05$ versus SOL (Der Pfeil zeigt an, dass alle weiteren Werte signifikant unterschiedlich zu SOL waren).

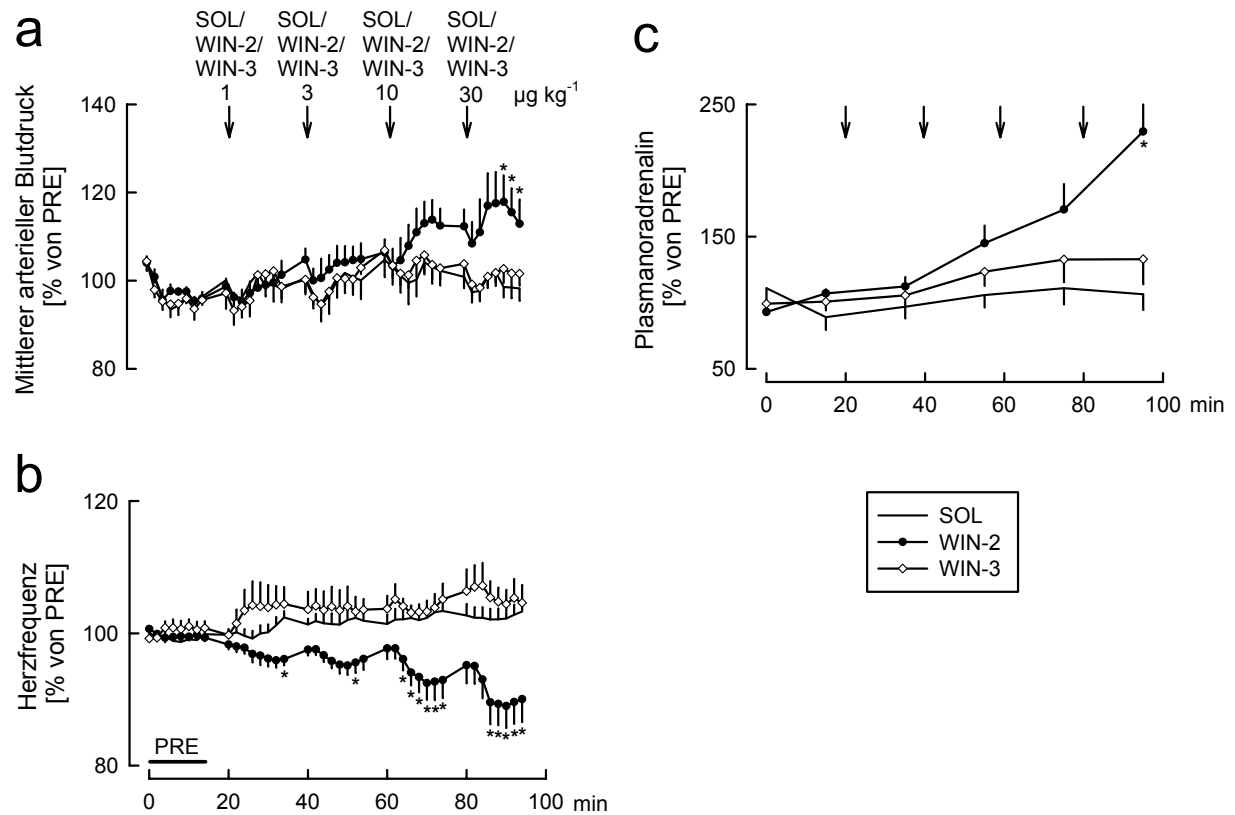


Abbildung 3.2: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und WIN55212-3 (WIN-3) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration. SOL ($25 \mu\text{l kg}^{-1}$), WIN-2 ($1, 3, 10$ und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) und WIN-3 ($1, 3, 10$ und $30 \mu\text{g kg}^{-1}$) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von jeweils 8 Experimenten. * $P < 0.05$ versus SOL.

In der anderen Kontroll-Gruppe wurde NaCl-Lsg. als Lösungsmittel (SAL) für DAMGO viermal injiziert (je $25 \mu\text{l kg}^{-1}$). Hier wurde eine leichte Abnahme der Atemfrequenz und eine leichte Zunahme des Atemzugvolumens beobachtet (**Abbildung 3.3**). Die kardiovaskulären Parameter blieben stabil (nicht gezeigt).

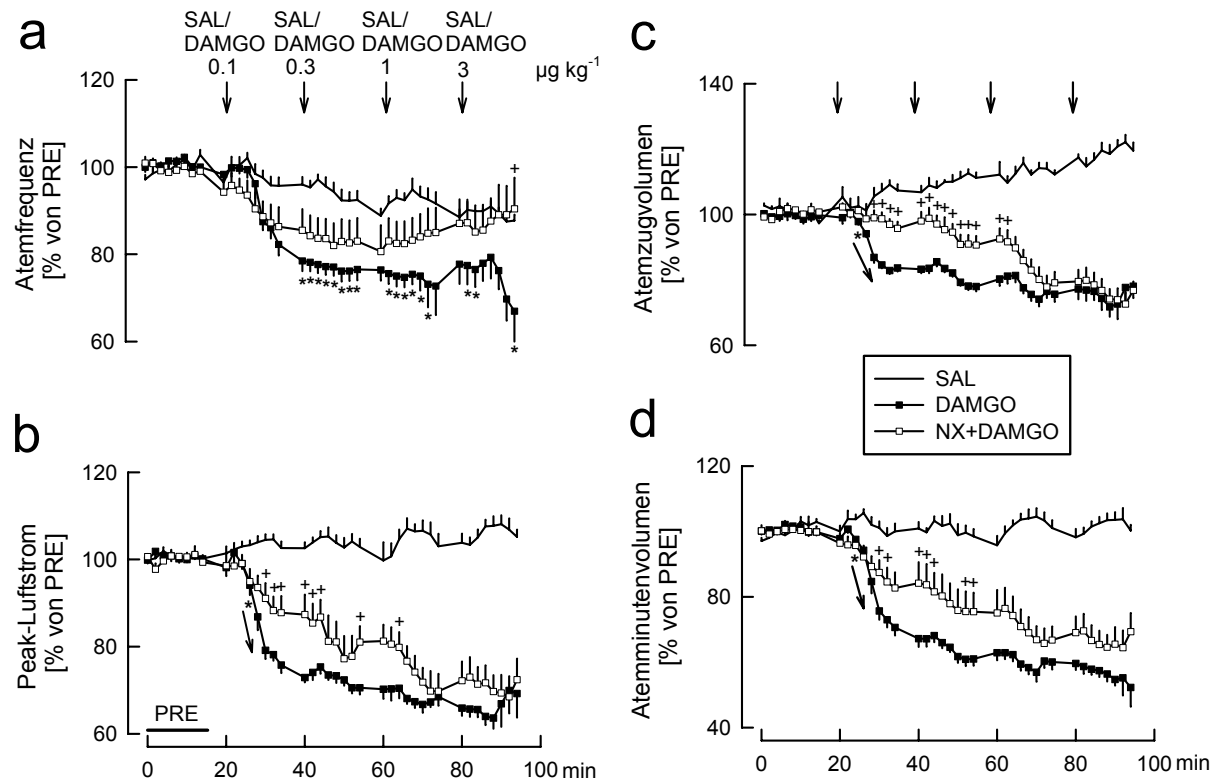


Abbildung 3.3: Effekte der NaCl-Lsg. (SAL), DAMGO oder Naloxon (NX) + DAMGO auf **a** die Atemfrequenz, **b** den Peak-Luftstrom während der Inspiration, **c** das Atemzugvolumen und **d** das Atemminutenvolumen. SAL ($25 \mu\text{l kg}^{-1}$) und DAMGO ($0.1, 0.3, 1$ und $3 \mu\text{g kg}^{-1}$) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine der beiden DAMGO-Gruppen mit NX (0.2 mg kg^{-1} i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 8 (SAL), 8 (DAMGO) und 7 (NX+DAMGO) Experimenten. * $P < 0.05$ DAMGO versus SAL (Pfeile zeigen an, dass alle weiteren Werte signifikant unterschiedlich zu SAL waren); + $P < 0.05$ NX+DAMGO versus DAMGO allein.

3.1.3 Wirkungen von WIN55212-2 und WIN55212-3

Vier ansteigende Dosen des Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 (1, 3, 10 und 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) und seines inaktiven Enantiomers WIN55212-3 (1, 3, 10 und 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) wurden i.c. injiziert. Originalregistrare von einem typischen Experiment mit WIN55212-2 sind in den **Abbildungen 3.4** und **3.5** gezeigt, die statistische Auswertung hingegen in den **Abbildungen 3.1**, S. 55 und **3.2**, S. 56.

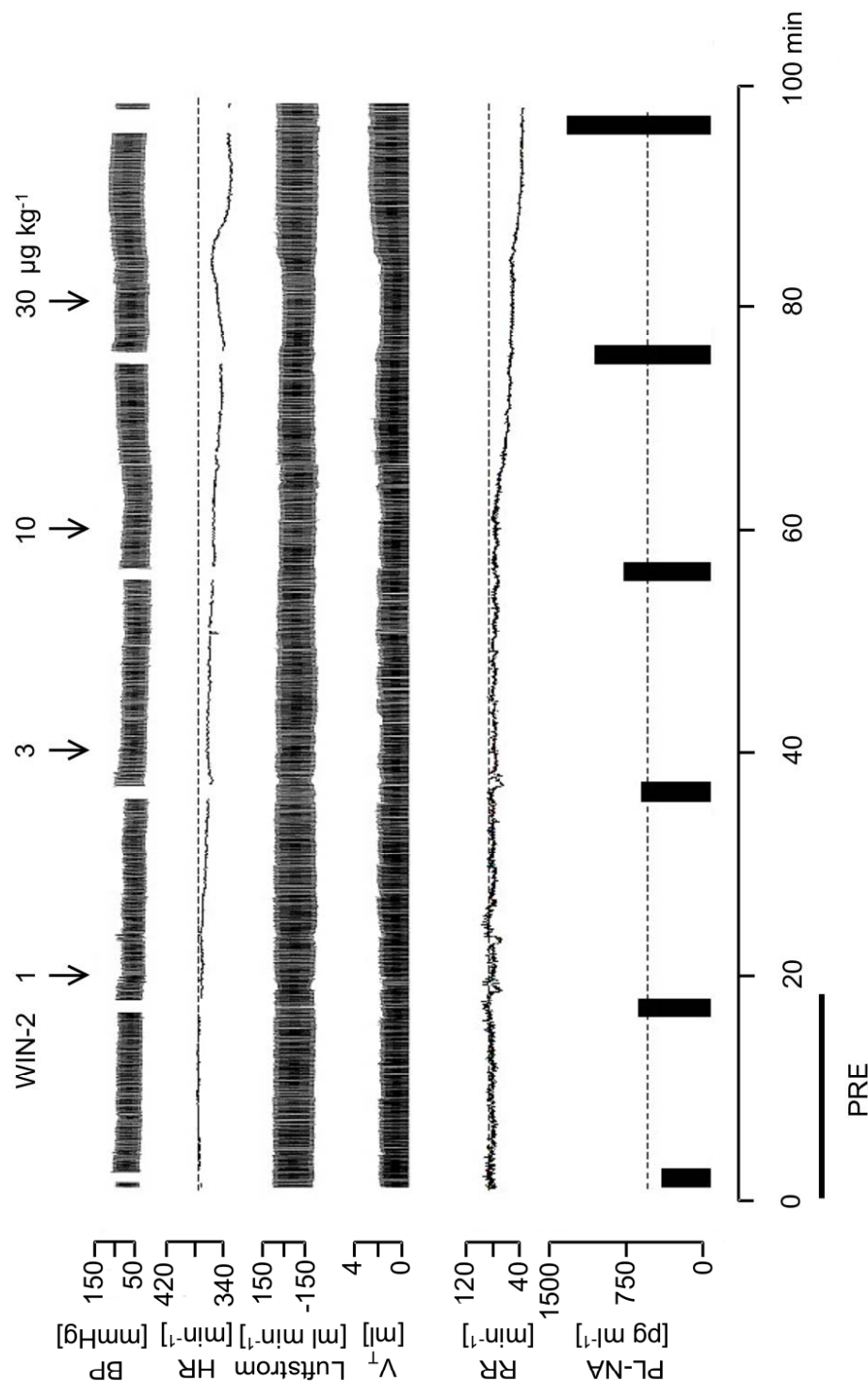


Abbildung 3.4: Originalaufnahme. Effekte von WIN55212-2 (WIN-2) auf den Blutdruck (BP), die Herzfrequenz (HR), den Luftstrom (Einatmung: negative Werte), das Atemzugvolumen (V_T), die Atemfrequenz (RR) und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (PL-NA). WIN-2 (1, 3, 10 und 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) wurde, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. PRE bezeichnet die Referenz-Periode der Basiswerte. Die Aufnahme repräsentiert 8 Experimente.

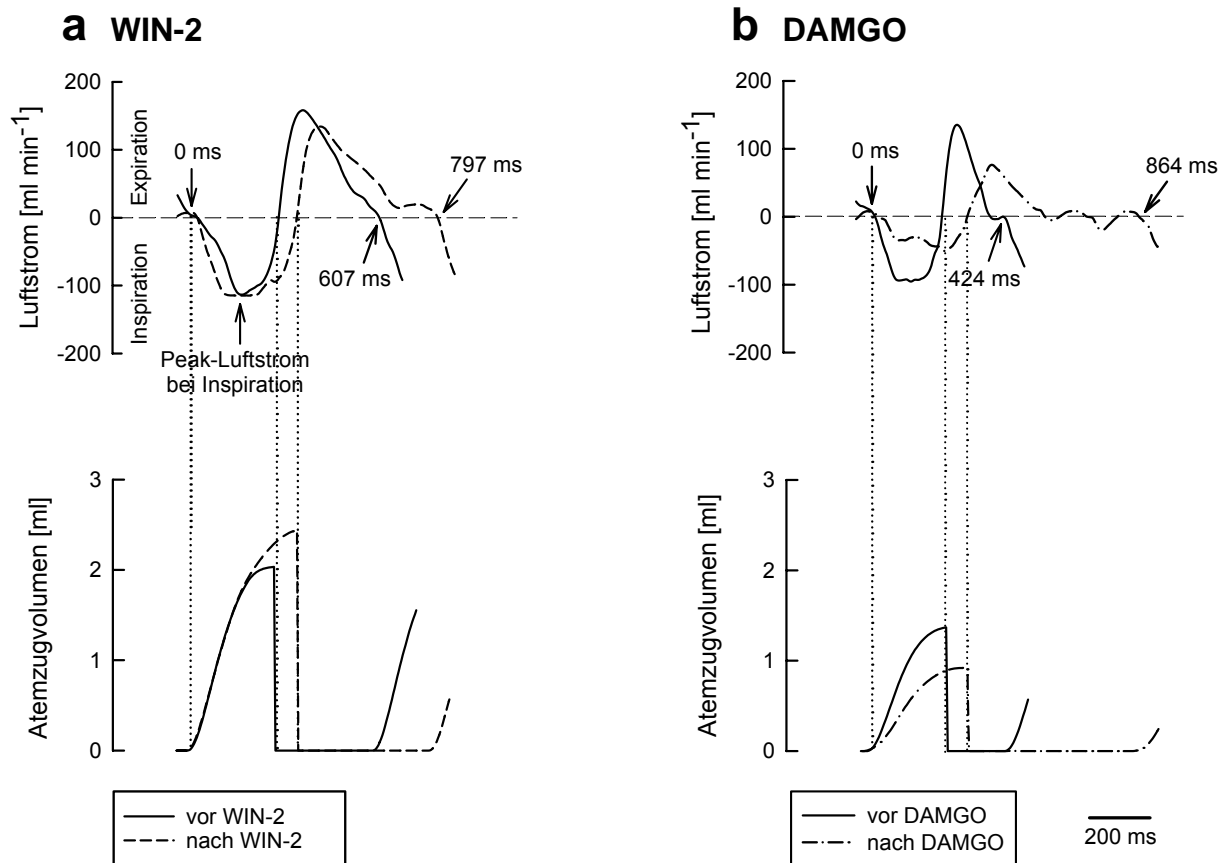


Abbildung 3.5: Originalaufnahme. Effekte von **a** WIN55212-2 (WIN-2) und **b** DAMGO auf den Luftstrom und das Atemzugvolumen innerhalb eines Atemzyklus. Die Kurven wurden jeweils vor und 15 min nach i.c.-Injektion von WIN-2 ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) oder DAMGO ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$) aufgenommen. WIN-2 verlängerte den Atemzyklus von 607 ms auf 797 ms (d.h. die Atemfrequenz sank von 99 min^{-1} auf 75 min^{-1}) und vergrößerte das Atemzugvolumen. DAMGO verlängerte den Atemzyklus von 424 ms auf 864 ms (d.h. die Atemfrequenz sank von 141 min^{-1} auf 69 min^{-1}) und verminderte den Peak-Luftstrom während der Inspiration sowie das Atemzugvolumen. Die Aufnahme repräsentiert 8 Experimente.

WIN55212-2 verursachte eine deutliche, dosisabhängige Abnahme der Atemfrequenz (**Abbildungen 3.1a**, S. 55, **3.4**, S. 58 und **3.5a**). Der Peak-Luftstrom blieb unverändert (**Abbildungen 3.1b**, **3.4** und **3.5a**). Das Atemzugvolumen stieg geringfügig nach der höchsten WIN55212-2 Dosis (**Abbildungen 3.1c**, **3.4** und **3.5a**). Zudem verminderte WIN55212-2 dosisabhängig das Atemminutenvolumen; die Minderung war aufgrund des leichten Anstiegs des Atemzugvolumens geringer als die Abnahme der Atemfrequenz (**Abbildung 3.1a,c,d** und **Gleichung 2.2**, S. 48).

Der mittlere arterielle Blutdruck veränderte sich nach Applikation der zwei niedrigeren Dosen (1 und 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) des Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 nicht, stieg jedoch nach den zwei höheren Dosen (10 und 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (**Abbildungen 3.2a**, S. 56 und **3.4**, S. 58). WIN55212-2 senkte dosisabhängig die Herzfrequenz und steigerte dosisabhängig die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildungen 3.2b,c** und **3.4**).

WIN55212-3, ein Enantiomer von WIN55212-2, das sehr geringe Affinität zu Cannabinoidrezeptoren aufweist (**Tabelle 1**, S. 8), zeigte weder auf respiratorische noch auf kardiovaskuläre Parameter eine Wirkung (**Abbildungen 3.1**, S. 55 und **3.2**, S. 56). Als einzige Ausnahme stieg aus unbekanntem Grund das Atemminutenvolumen leicht an.

3.1.4 Wirkungen von DAMGO

Die Wirkungen des Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 wurden auch mit denen des μ -Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO verglichen. Vier ansteigende Dosen von DAMGO (0.1, 0.3, 1 und 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) wurden i.c. injiziert. Die Wirkungen auf die respiratorischen Parameter sind in den **Abbildungen 3.3**, S. 57 und **3.5**, S. 59 gezeigt.

DAMGO reduzierte merklich die Atemfrequenz, den Peak-Luftstrom, das Atemzugvolumen und das Atemminutenvolumen (**Abbildungen 3.3** und **3.5b**). Da DAMGO sowohl die Atemfrequenz als auch das Atemzugvolumen verminderte, nahm das Atemminutenvolumen, als Produkt der beiden Parameter, stärker ab als die individuellen Parameter (**Abbildung 3.3a,c,d**). Der Opioidrezeptor-Antagonist Naloxon schwächte die respiratorischen Wirkungen von DAMGO wie erwartet ab (**Abbildung 3.3**).

Der Blutdruck nahm nach Injektion von DAMGO stark ab (auf 57 ± 6 % des PRE-Werts nach 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$; $P < 0.05$), die Herzfrequenz blieb im Bereich der initialen Werte, und ein deutlicher Anstieg der Plasmanoradrenalin-Konzentration (auf 446 ± 68 % des PRE-Werts nach 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$; $P < 0.05$) wurde festgestellt (nicht gezeigt). Diese kardiovaskulären Wirkungen wurden ebenfalls durch Naloxon abgeschwächt (nicht gezeigt).

3.1.5 Interaktion zwischen WIN55212-2 und Rimonabant oder Naloxon

Zuerst wurde die Interaktion zwischen dem selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant und WIN55212-2 getestet. Alle respiratorischen Wirkungen von WIN55212-2 wurden durch Rimonabant antagonisiert (**Abbildung 3.6**).

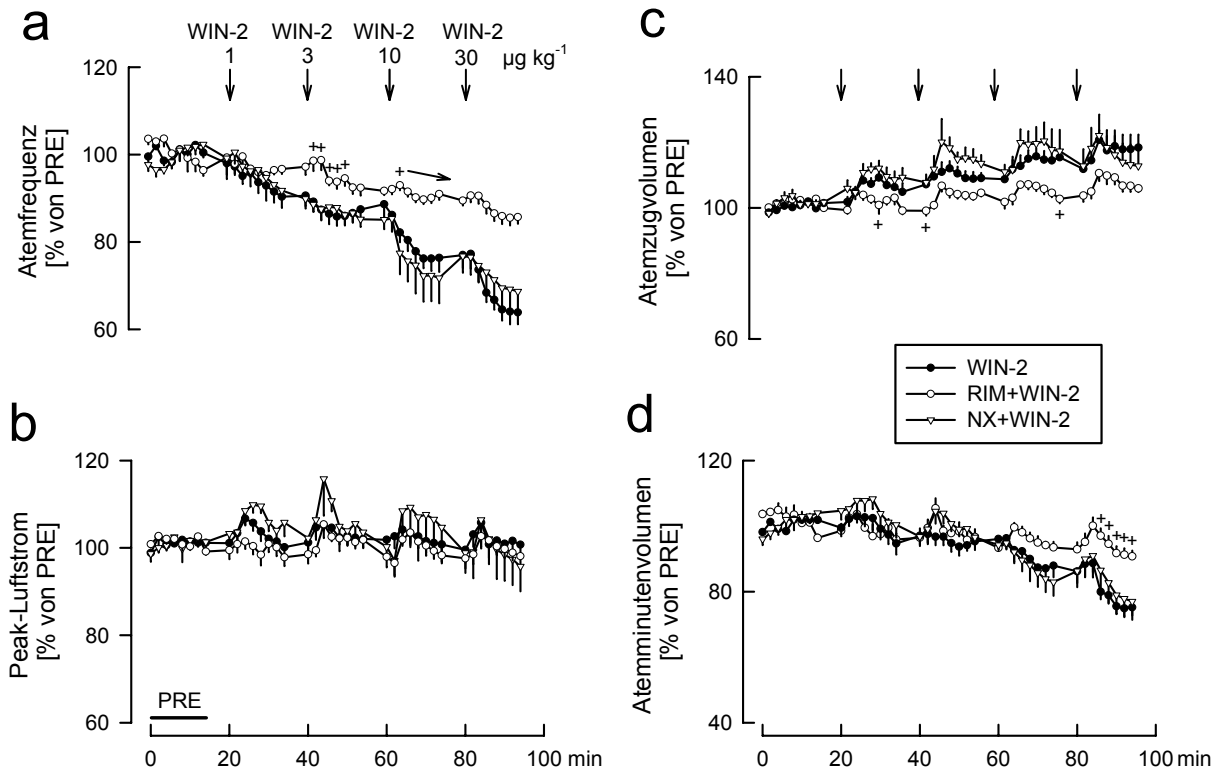


Abbildung 3.6: Interaktion zwischen WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM) oder Naloxon (NX) auf **a** die Atemfrequenz, **b** den Peak-Luftstrom während der Inspiration, **c** das Atemzugvolumen und **d** das Atemminutenvolumen. WIN-2 (1, 3, 10 und 30 µg kg⁻¹) wurde in allen drei Gruppen, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine Gruppe mit RIM (2 mg kg⁻¹ i.v.) und eine andere Gruppe mit NX (0.2 mg kg⁻¹ i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte ± SEM von 8 (WIN-2), 7 (RIM+WIN-2) und 5 (NX+WIN-2) Experimenten. + $P < 0.05$ versus WIN-2 allein (der Pfeil zeigt an, dass alle weiteren Werte signifikant unterschiedlich zu WIN-2 allein waren).

Rimonabant verhinderte außerdem den Blutdruckanstieg, der durch die höchste Dosis von WIN55212-2 (30 µg kg⁻¹) ausgelöst wurde (**Abbildung 3.7a**), ebenfalls den Anstieg der Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.7c**) und die WIN55212-2-induzierte Bradykardie (**Abbildung 3.7b**).

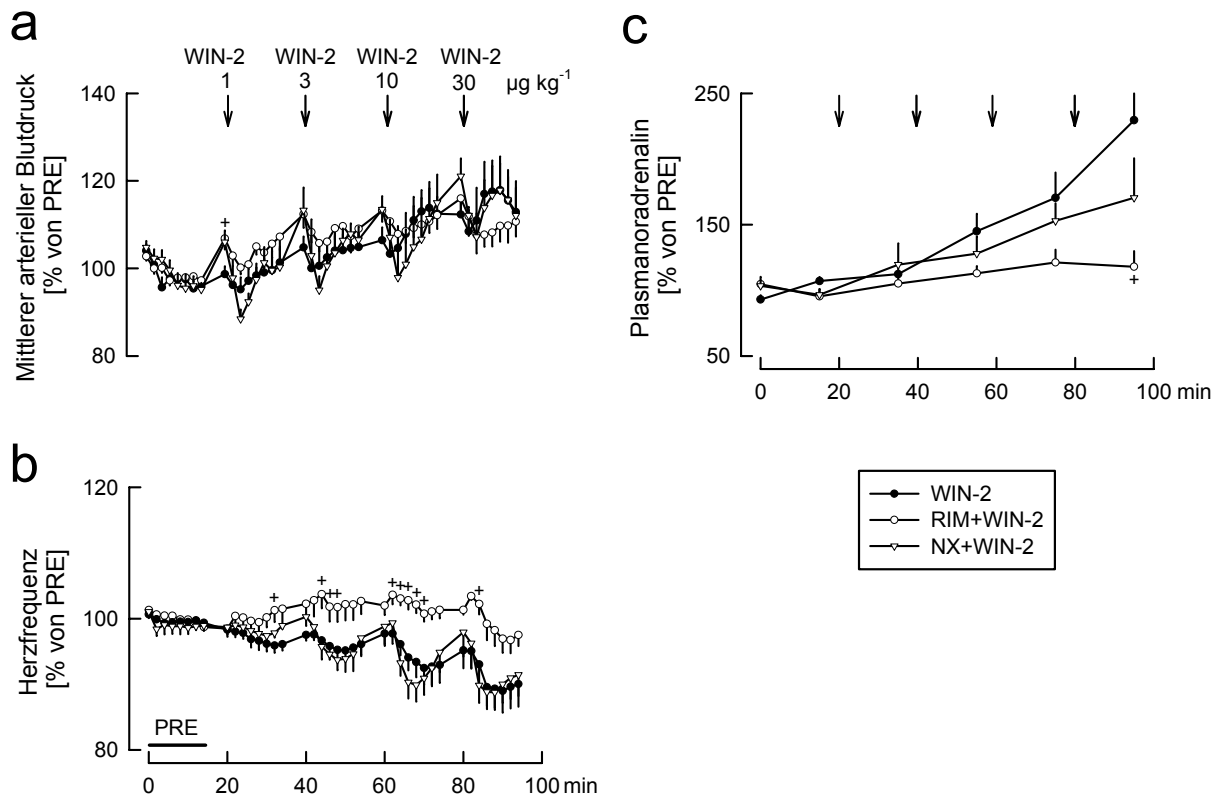


Abbildung 3.7: Interaktion zwischen WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM) oder Naloxon (NX) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration. WIN-2 (1, 3, 10 und 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) wurde in allen drei Gruppen, wie durch die Pfeile angezeigt, i.c. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine Gruppe mit RIM (2 mg kg^{-1} i.v.) und eine andere Gruppe mit NX (0.2 mg kg^{-1} i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 8 (WIN-2), 7 (RIM+WIN-2) und 5 (NX+WIN-2) Experimenten. $^+ P < 0.05$ versus WIN-2 allein.

Vorbehandlung mit dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon hatte keinen Einfluss auf die von WIN55212-2 ausgelösten respiratorischen und kardiovaskulären Wirkungen (**Abbildungen 3.6**, S. 61 und **3.7**). Durch WIN55212-2 hervorgerufene Änderungen der Atemfrequenz, des Atemzugvolumens, des Atemminutenvolumens, des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz waren eindrucksvoll identisch in Abwesenheit und Gegenwart von Naloxon (**Abbildungen 3.6** und **3.7**).

3.1.6 Verifizierung der korrekten Lokalisation des Katheters in der Cisterna magna

Am Ende eines jeden Experiments wurde NaCl-Lösung, die Evans Blau enthielt, über den intracisternalen Katheter injiziert ($0.2\% \text{ w/v}$; $25 \mu\text{l kg}^{-1}$). 15 Minuten später wurden die Tiere durch eine Überdosis Urethan getötet. Nach Dekapitierung wurden das Fell des Kopfes und die Schädeldecke mit einer Schere und einer Faszange in kaudo-rostraler Richtung eröffnet und das Gehirn zur Untersuchung aus dem Schädel geschält. Blaue Färbung des Hirnstamms verifiziert die korrekte Lokalisation des Katheters in der Cisterna magna.

In drei Experimenten konnte keine blaue Färbung des Hirnstamms beobachtet werden – diese Experimente wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen. In den verbleibenden Experimenten wurde eine blaue Verfärbung sowohl auf der dorsalen als auch ventralen Seite des Hirnstamms festgestellt (**Abbildung 3.8**).

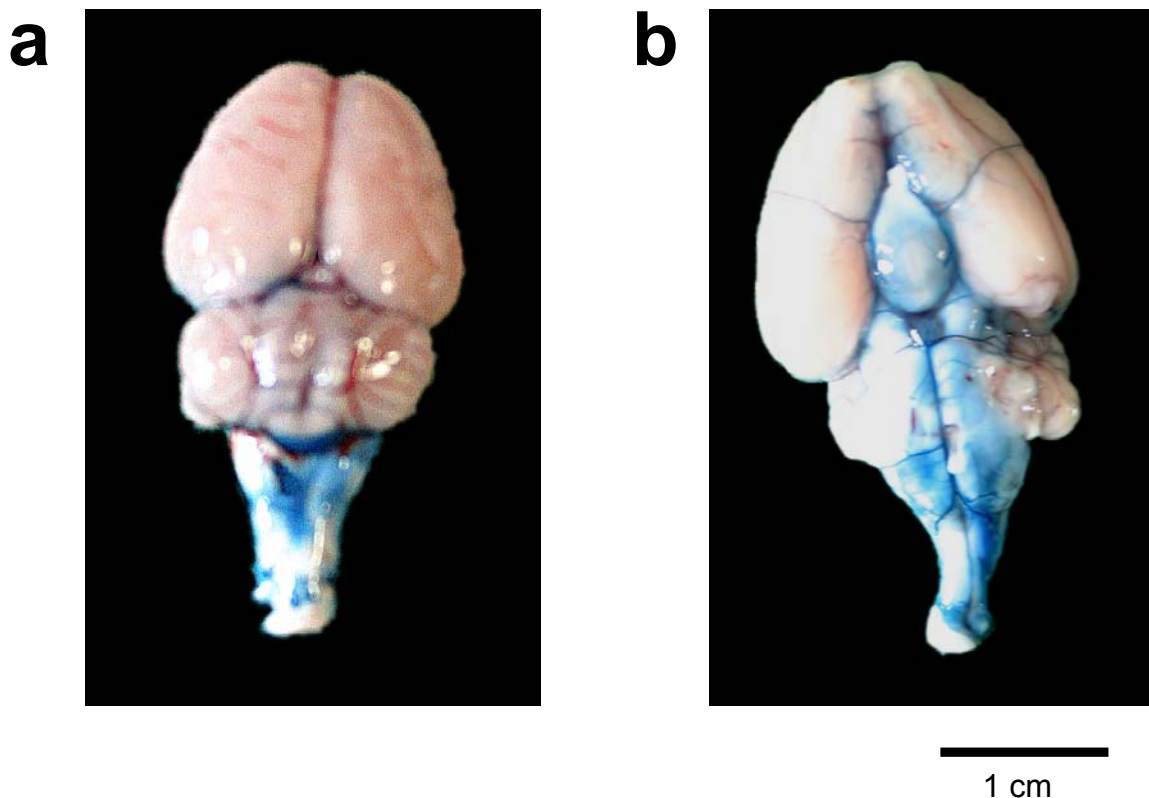


Abbildung 3.8: Am Ende des Experiments wurde Evans Blau in NaCl-Lösung über den i.c.-Katheter injiziert ($0.2\% \text{ w/v}$; $25 \mu\text{l kg}^{-1}$). Die korrekte Lokalisation des i.c.-Katheters wurde durch Blaufärbung des Hirnstamms (**a** dorsal; **b** ventral) verifiziert.

3.2 Die Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung

3.2.1 Despinalisierte Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus

3.2.1.1 Wirkungen von Rimonabant auf die sympathische Neuro-Effektor-Transmission

Der gesamte Sympathikus der despinalisierten Ratten wurde kontinuierlich bis zum Ende der Experimente stimuliert (mit 40 mA, 0.5 ms Rechteckpuls bei 1 Hz). Wie erwartet, steigerte die Stimulation den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Tabelle 3.2**, S. 66).

Das Lösungsmittel (SOL) (0.5 ml kg^{-1}) oder zwei Dosen des CB_1 -Rezeptor-Antagonisten Rimonabant (0.5 und 2 mg kg^{-1}) wurden appliziert (**Abbildung 3.9**).

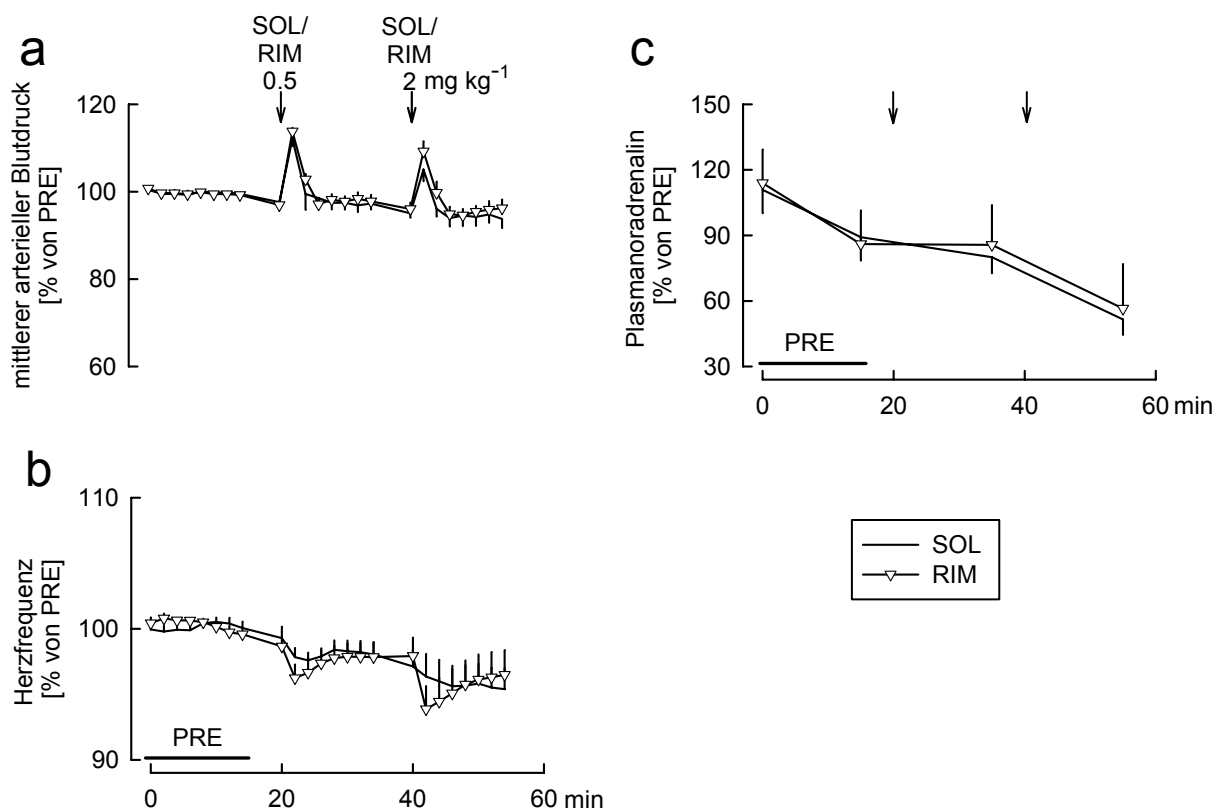


Abbildung 3.9: Effekte des Lösungsmittels (SOL) und Rimonabant (RIM) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikus (40 mA und 0.5 ms Pulse bei 1 Hz). SOL (0.5 ml kg^{-1}) und Rimonabant (0.5 und 2 mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Werte sind als Prozent von den Werten angegeben, die der Injektion von SOL oder Rimonabant vorausgingen (PRE). Mittelwerte \pm SEM von 5 (SOL) und 7 (RIM) Experimenten.

Die Gabe des Lösungsmittels führte zu einem kurzfristigen Anstieg des Blutdrucks (**Abbildung 3.9a**); ein solcher Anstieg wurde auch schon mit einem Lösungsmittel ähnlicher Zusammensetzung beobachtet (Malinowska *et al.* 2001b). Die Herzfrequenz (**Abbildung 3.9b**) und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.9c**) nahmen in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe kontinuierlich ab. Der CB₁-Rezeptor-Antagonist Rimonabant hatte weder Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck (**Abbildung 3.9a**), noch auf die Herzfrequenz (**Abbildung 3.9b**) und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.9c**).

Die fehlende Wirkung des Antagonisten deutet darauf hin, dass Endocannabinoide unter den Bedingungen der ersten Experimentenreihe die sympathische Neuro-Effektor-Transmission nicht hemmen.

Als nächster Schritt wurde versucht, durch Infusion von Vasopressin die Synthese der Endocannabinoide anzuregen. Die Überlegung war, dass Aktivierung vaskulärer G $\alpha_{q/11}$ -Protein-gekoppelter V₁-Rezeptoren zu einer Endocannabinoid-Synthese führen würde (**Abbildung 1.2**, S. 7). In ähnlicher Weise steigern sowohl die Aktivierung G $\alpha_{q/11}$ -Protein-gekoppelter Rezeptoren im ZNS (s. Kapitel 1.2.3, Abschnitt 5) als auch die Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren in Blutgefäßen (Mechoulam *et al.* 1998; wahrscheinlich über G $\alpha_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Muskarinrezeptoren) die Endocannabinoid-Synthese.

In Gegenwart der elektrischen Stimulation führte Vasopressin zu einem Anstieg des Blutdrucks, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration blieben unverändert (**Tabelle 3.2**).

Tabelle 3.2: Effekte der elektrischen Stimulation und der Infusionen von Vasopressin, Phenylephrin und Noradrenalin auf den mittleren arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration.

	Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	Herzfrequenz [min ⁻¹]	Plasmanoradrenalin- Konzentration [pg ml ⁻¹]
Elektrische Stimulation: 40mA, 0.5ms Pulse bei 1 Hz			
vor Stimulation (n=27)	54 ± 1]*	348 ± 6]*	nicht detektierbar ^d]*
während Stimulation (n=27)	63 ± 2]+	500 ± 4	334 ± 24]*
zusätzliche Infusion von Vasopressin ^a (n=15)	96 ± 6]+	500 ± 4	328 ± 34
Elektrische Stimulation: 80mA, 0.5ms Pulse bei 3Hz			
vor Stimulation (n=19)	49 ± 2]*	330 ± 5]*	nicht detektierbar]*
während Stimulation (n=19)	107 ± 4]*	513 ± 6]+	2904 ± 163]+
zusätzliche Infusion von Phenylephrin ^b (n=14)	115 ± 5	539 ± 6]+	1991 ± 162]+
Noradrenalininfusion^c (ohne elektrische Stimulation)			
vor Infusion (n=10)	48 ± 1]*	342 ± 7]*	nicht detektierbar]*
während Infusion (n=10)	77 ± 2]*	474 ± 9]*	10457 ± 901]*

^a Vasopressin wurde mit einer Geschwindigkeit von 4 ng kg⁻¹ min⁻¹ infundiert

^b Phenylephrin wurde mit einer Geschwindigkeit von 10 µg kg⁻¹ min⁻¹ infundiert

^c Noradrenalin wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 µg kg⁻¹ min⁻¹ infundiert

^d Die untere Nachweisgrenze lag bei 35 pg ml⁻¹

* P < 0.05 zwischen den angezeigten Gruppen

+ P < 0.05 zwischen den angezeigten Gruppen; nur Tiere, die Infusionen erhielten, wurden in den statistischen Vergleich einbezogen

Das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder Rimonabant (2 mg kg^{-1}) wurden dann während weiterlaufender elektrischer Stimulation und Vasopressin-Infusion verabreicht (**Abbildung 3.10**). In der Gruppe, die das Lösungsmittel erhielt, nahmen der Blutdruck (**Abbildung 3.10a**) und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.10c**) leicht ab, dagegen blieb die Herzfrequenz stabil (**Abbildung 3.10b**). Verglichen mit der Lösungsmittel-Gruppe zeigte Rimonabant keine signifikanten Wirkungen (**Abbildungen 3.10a,b,c**).

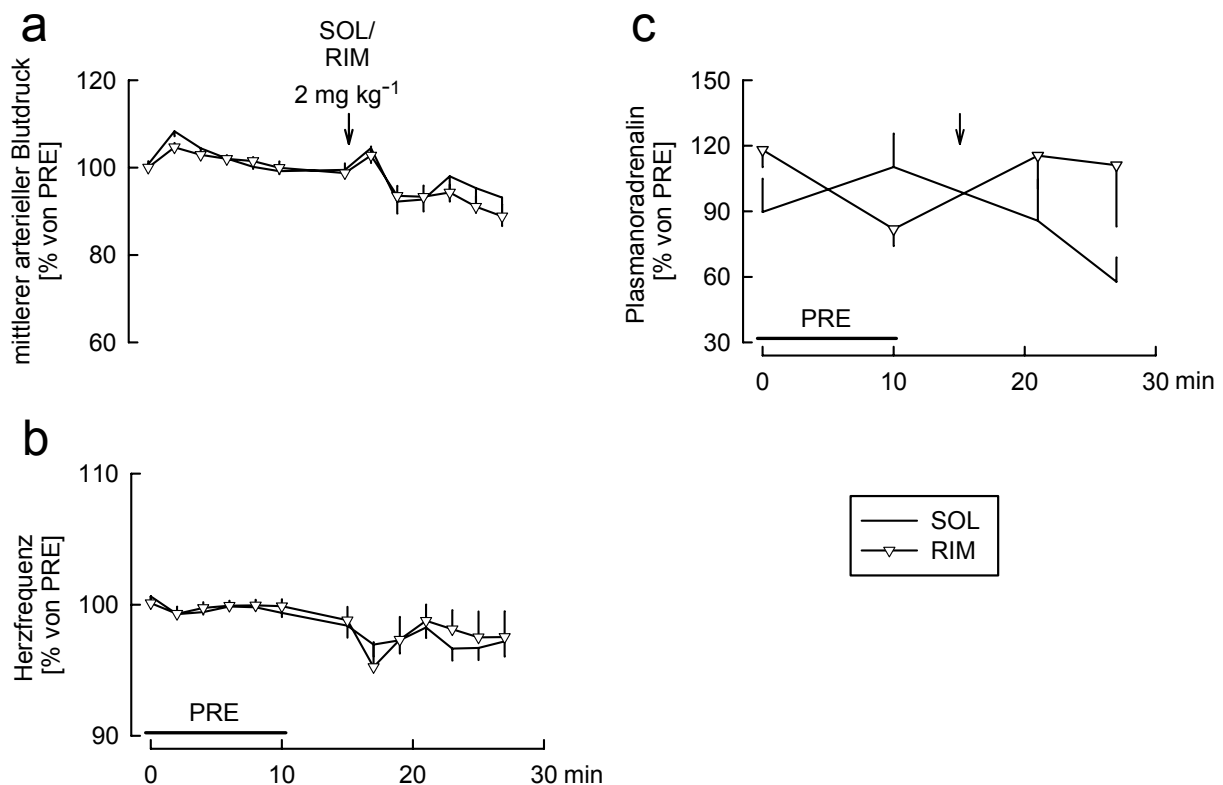


Abbildung 3.10: Effekte des Lösungsmittels (SOL) und Rimonabant (RIM) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikus (40 mA und 0.5 ms Pulse bei 1 Hz) und einer Infusion von Vasopressin ($4 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). SOL (0.5 ml kg^{-1}) und Rimonabant (2 mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Werte sind als Prozent von den Werten angegeben, die der Injektion von SOL oder Rimonabant vorausgingen (PRE). Mittelwerte \pm SEM von 7 (SOL) und 8 (RIM) Experimenten.

Das wiederholte Ausbleiben der Wirkung des Antagonisten führte zur weiteren Suche nach jenen Bedingungen, die für einen Endocannabinoid-vermittelten Effekt günstig sind. So wurden die Stärke der elektrischen Stimulation erhöht und α_1 -Adrenozeptoren (sie sind ebenfalls $G_{\alpha_q/11}$ -Protein-gekoppelt) durch eine Infusion mit Phenylephrin aktiviert (s. **Abbildung 3.11** für eine Originalaufnahme). Kontinuierliche Stimulation mit 80 mA, 0.5 ms Rechteckpuls bei 3 Hz steigerte den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.11** und **Tabelle 3.2**, S. 66). Die Zunahme des Blutdrucks und der Plasmanoradrenalin-Konzentration war stärker als während der Stimulation mit 40 mA, 0.5 ms Rechteckpuls bei 1 Hz (**Tabelle 3.2**).

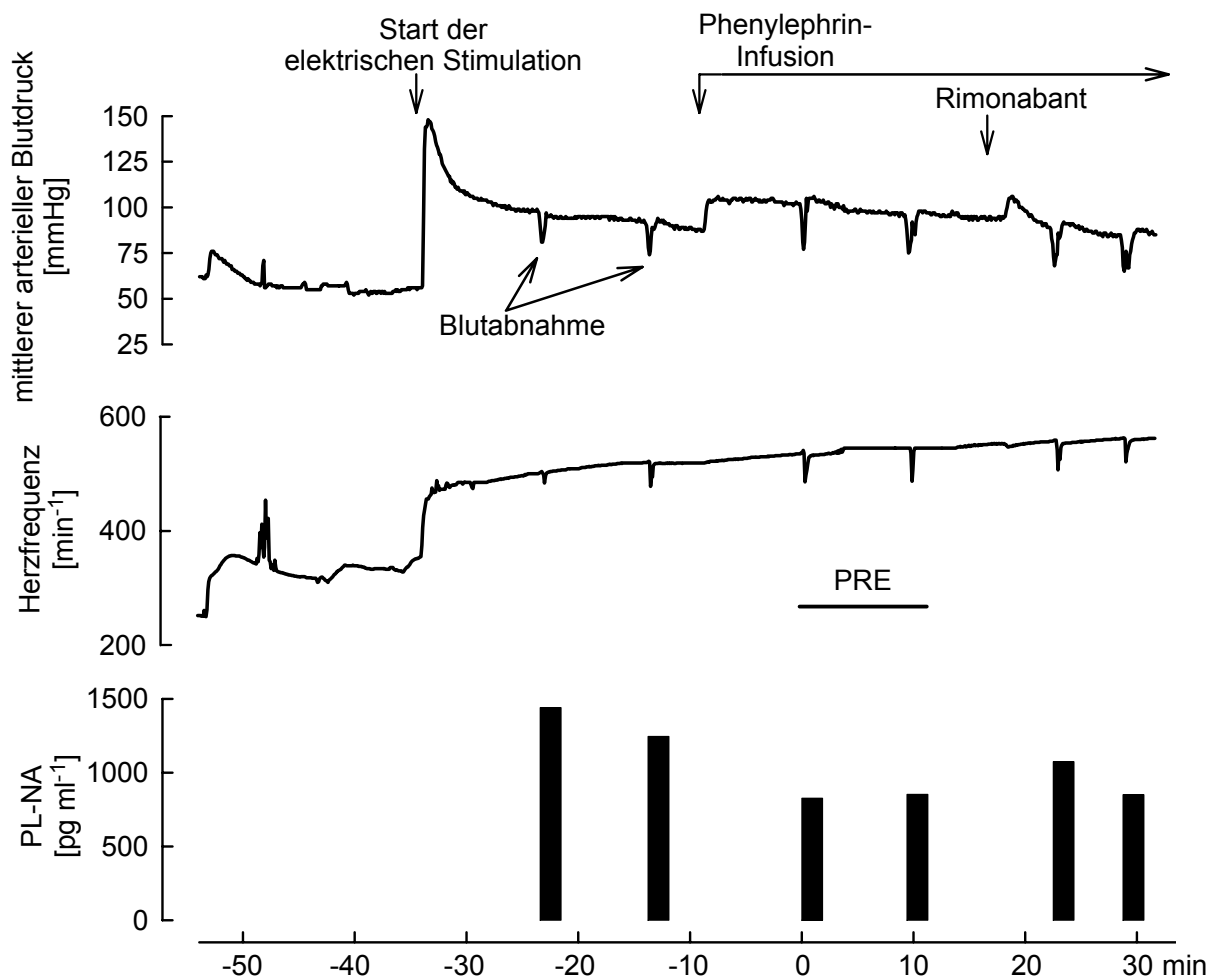


Abbildung 3.11: Originalaufnahme. Effekte der elektrischen Stimulation des Sympathikus (80 mA und 0.5 ms Pulse bei 3Hz), der Phenylephrin-Infusion und von Rimonabant auf den mittleren arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (PL-NA) in despinalisierten Ratten. Phenylephrin ($10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) und Rimonabant (2mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Aufnahme repräsentiert 7 Experimente.

In Gegenwart der elektrischen Stimulation erhöhte Phenylephrin ($10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) leicht die Herzfrequenz; der Blutdruck tendierte zu steigen, und die Plasmanoradrenalin-Konzentration nahm ab (**Abbildung 3.11** und **Tabelle 3.2**, S. 66). Dieser Abfall der Plasmanoradrenalin-Konzentration könnte die Folge eines verzögerten Spillovers von Noradrenalin aus der sympathischen Neuro-Effektor-Synapse in die systemische Zirkulation sein (dies ist manchmal bei Substanzen zu beobachten, die eine Vasokonstriktion verursachen).

Das Lösungsmittel (0.5 ml kg^{-1}) oder Rimonabant (2 mg kg^{-1}) wurden dann während weiterlaufender elektrischer Stimulation und Phenylephrininfusion verabreicht (**Abbildungen 3.11** und **3.12**).

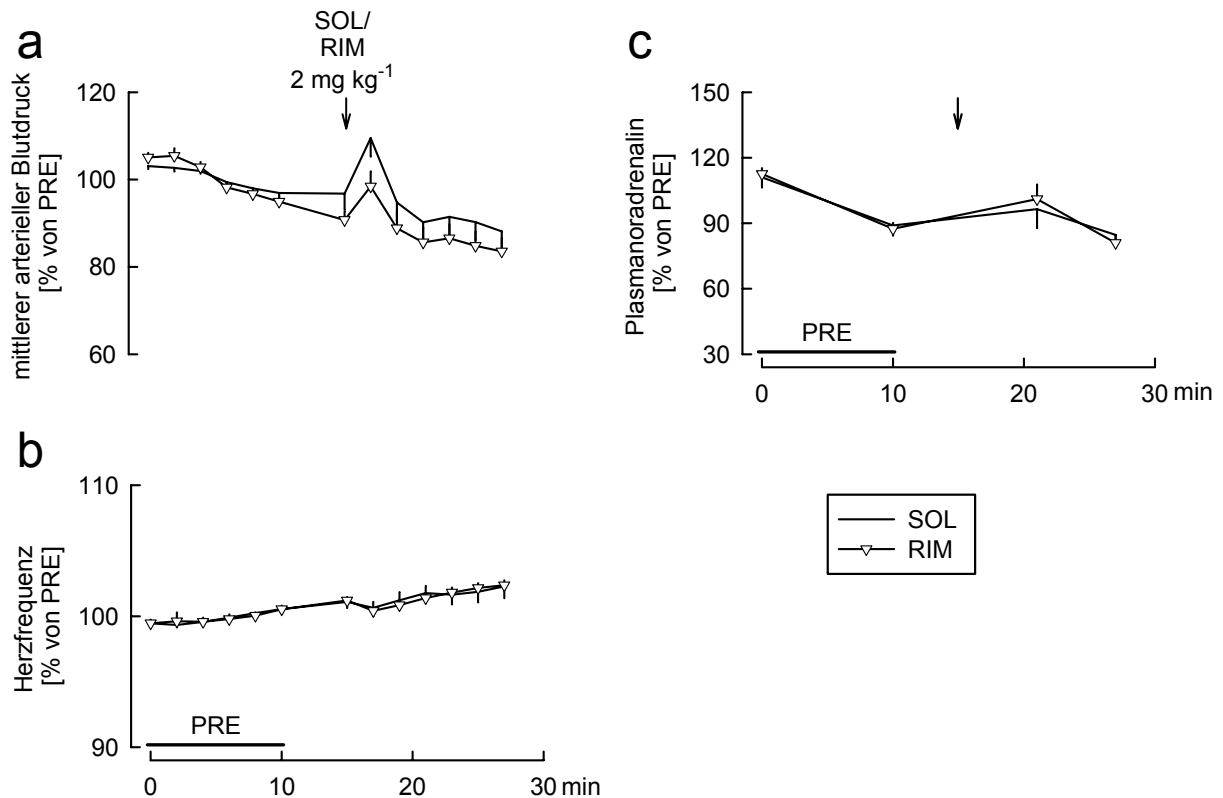


Abbildung 3.12: Effekte des Lösungsmittels (SOL) und Rimonabant (RIM) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikus (80 mA und 0.5 ms Pulse bei 3 Hz) und einer Infusion von Phenylephrin ($10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$). SOL (0.5 ml kg^{-1}) und Rimonabant (2 mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Werte sind als Prozent von den Werten angegeben, die der Injektion von SOL oder Rimonabant vorausgingen (PRE). Mittelwerte \pm SEM von 7 Experimenten.

Die Injektion des Lösungsmittels führte zu einem vorübergehenden Anstieg des Blutdrucks (**Abbildung 3.12a**); die Herzfrequenz (**Abbildung 3.12b**) und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.12c**) blieben dagegen stabil. Verglichen mit dem Lösungsmittel zeigte Rimonabant keine signifikanten Wirkungen (**Abbildung 3.12a,b,c**).

3.2.1.2 Wirkungen von WIN55212-2 auf die sympathische Neuro-Effektor-Transmission

Unter einer Reihe unterschiedlicher Bedingungen zeigte der Cannabinoid-Antagonist Rimonabant keine signifikanten Wirkungen – was darauf hinweist, dass Endocannabinoide keine Sympathikushemmung vermitteln. Angesichts dieses Befundes musste nun überprüft werden, ob ein exogener Agonist die Neuro-Effektor-Transmission in vorliegendem Modell hemmen kann. Der Sympathikotonus wurde dabei durchgehend mit 80 mA, 0.5 ms Rechteckpulsen bei 3 Hz stimuliert.

Zwei Dosen des CB₁-/CB₂-Rezeptor-Agonisten WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden verabreicht (**Abbildung 3.13**, S. 71). Injektion von WIN55212-2 führte zu einer dosisabhängigen Abnahme sowohl des Blutdrucks (**Abbildung 3.13a**) als auch der Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Abbildung 3.13c**). Die Minderung der Herzfrequenz erreichte dagegen keine statistische Signifikanz (**Abbildung 3.13b**).

Die Wirkung von WIN55212-2 auf die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikotonus legt nahe, dass die Substanz die Noradrenalinfreisetzung von postganglionären sympathischen Neuronen hemmt.

In der letzten Experimentenreihe wurde schließlich untersucht, ob Cannabinoidrezeptoren im Gefäßendothel oder in glatten Muskelzellen am durch WIN55212-2 hervorgerufenen Blutdruckabfall beteiligt sind. In diesen Experimenten wurde nicht elektrisch stimuliert, sondern stattdessen Noradrenalin infundiert (1 µg kg⁻¹ min⁻¹). Die Noradrenalininfusion erhöhte den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Plasmanoradrenalin-Konzentration (**Tabelle 3.2**, S. 66).

Das Lösungsmittel (0.5 ml kg⁻¹) oder zwei Dosen von WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden verabreicht (**Abbildung 3.14**, S. 72). Injektion des Lösungsmittels führte zu einer kurzweiligen Zunahme des Blutdrucks (**Abbildung 3.14a**). Hingegen blieb die Herzfrequenz (**Abbildung 3.14b**) und die Plasmanoradrenalin-

Konzentration (**Abbildung 3.14c**) stabil. WIN55212-2 zeigte keine Wirkung, sondern verursachte die gleichen Reaktionen wie das Lösungsmittel (**Abbildung 3.14a,b,c**).

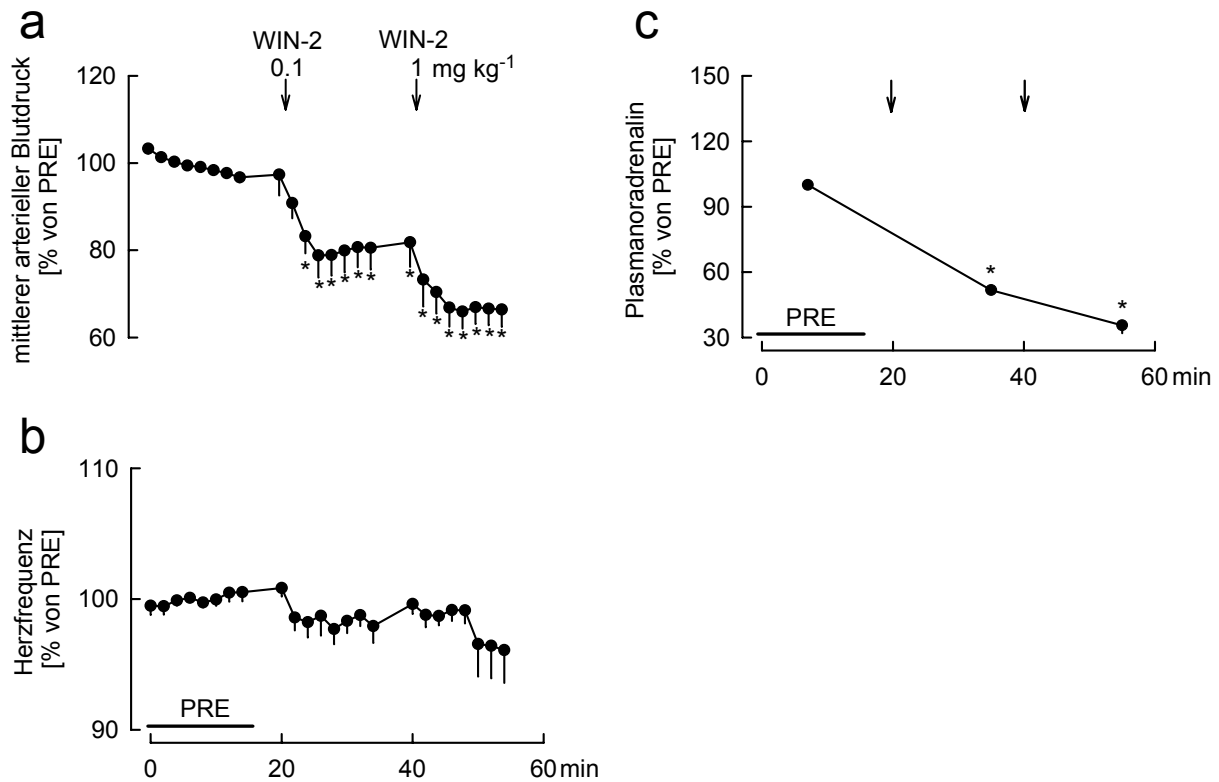


Abbildung 3.13: Effekte von WIN55212-2 (WIN-2) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikus (80 mA und 0.5 ms Pulse bei 3 Hz). WIN-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurde, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Werte sind als Prozent von den Werten angegeben, die der Injektion von WIN-2 vorausgingen (PRE). Mittelwerte±SEM von 5 Experimenten. * $P < 0.05$ versus PRE.

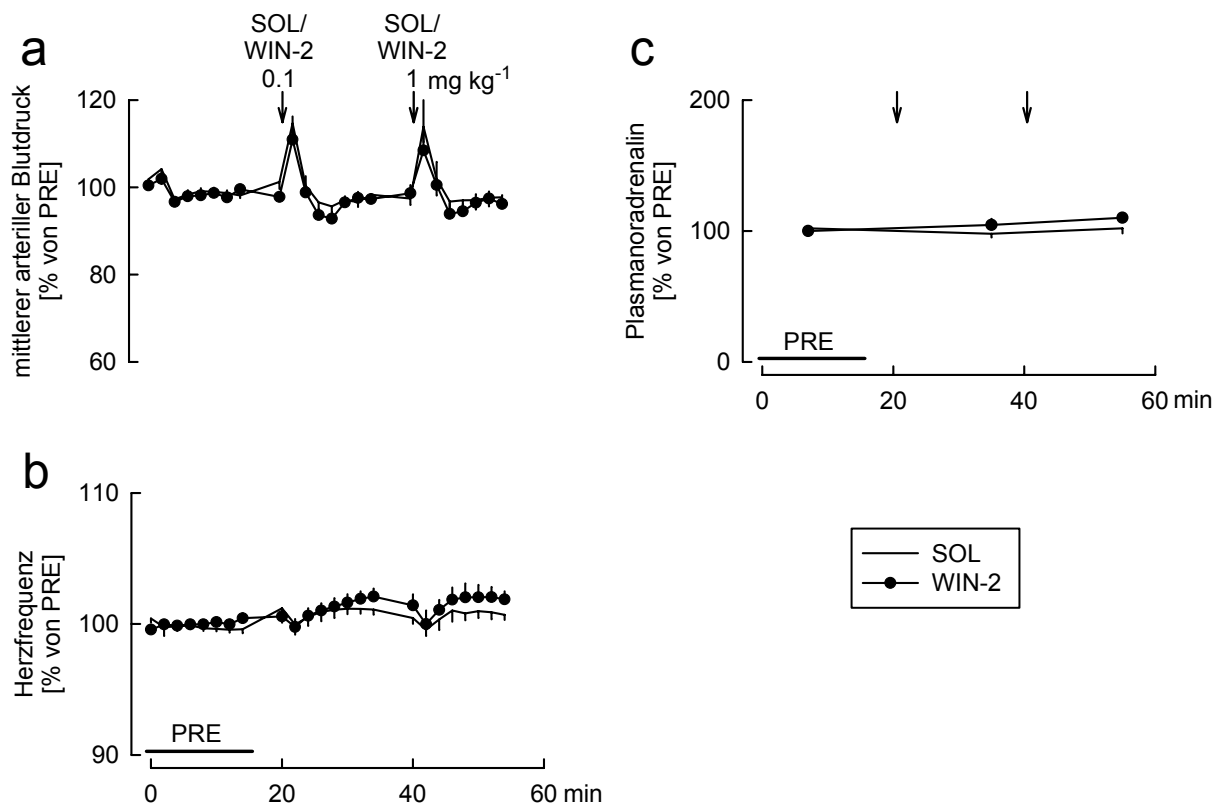


Abbildung 3.14: Effekte des Lösungsmittels (SOL) und WIN55212-2 (WIN-2) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** die Herzfrequenz und **c** die Plasmanoradrenalin-Konzentration in despinalisierten Ratten mit einer Infusion von Noradrenalin ($1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$). SOL (0.5 ml kg^{-1}) und WIN-2 (0.1 und 1 mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Werte sind als Prozent von den Werten angegeben, die der Injektion von SOL oder WIN-2 vorausgingen (PRE). Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 Experimenten.

3.2.2 Verifizierung der präganglionären Stimulation

Bei Tieren, in denen der Sympathikotonus mit 40 mA und 0.5 ms Rechteckpulsen bei 1 Hz ($n = 27$) stimuliert wurde, senkte Mecamylamin den mittleren arteriellen Blutdruck um $10 \pm 2 \text{ mmHg}$ (18% ; $P < 0.05$ vs. den Wert direkt vor der Mecamylamin-Injektion) und die Herzfrequenz um $88 \pm 8 \text{ min}^{-1}$ (18% ; $P < 0.05$) (nicht gezeigt).

Bei Tieren, in denen der Sympathikotonus mit 80 mA und 0.5 ms Rechteckpulsen bei 3 Hz ($n = 19$) stimuliert wurde, senkte Mecamylamin den mittleren arteriellen Blutdruck um $24 \pm 2 \text{ mmHg}$ (39% ; $P < 0.05$ vs. den Wert direkt vor der Mecamylamin-Injektion) und die Herzfrequenz um $123 \pm 10 \text{ min}^{-1}$ (23% ; $P < 0.05$) (nicht gezeigt).

Nach Beenden der elektrischen Stimulation nach Mecamylamin-Injektion ist keine bedeutende Änderung von Blutdruck oder Herzfrequenz mehr aufgetreten, was auf eine ausschließlich präganglionäre Stimulation hinweist.

3.3 Die Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung

Zur Veranschaulichung sei vorweg die Bedeutung der Basal- bzw. Delta-Werte dargestellt. Basal-Werte sind Werte direkt vor jeder einzelnen Stimulation, Delta-Werte beschreiben die Änderung während der Stimulation, also die Differenz zwischen Maximum und Basal-Wert (**Abbildung 3.15**).

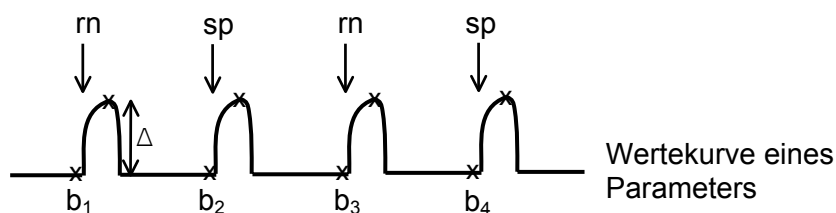


Abbildung 3.15: Skizze zur Veranschaulichung der Basal- bzw. Delta-Werte.
 b_{1-4} : basale Werte; Δ : Delta-Wert; rn: renale Stimulation; sp: spinale Stimulation

3.3.1 Referenzwerte (PRE-Werte)

Die beiden Basal-Werte sowie die beiden Delta-Werte der zwei renalen bzw. spinalen Stimulationen während der PRE-Periode (s. Kapitel 2.5 und **Abbildung 3.16** Originalaufnahme) wurden gemittelt, um jeweils einen absoluten PRE-Wert vor intravenöser (i.v.) Substanzgabe zu erhalten. Alle Basal- und Delta-Werte wurden dann als Prozent dieser Referenz-PRE-Werte ausgedrückt. Die PRE-Periode ist in den Abbildungen dargestellt.

Wie erwartet steigerte die spinale Reizung den Blutdruck (BP), die Herzfrequenz (HR) und den renalen vaskulären Widerstand (RVR) (**Abbildung 3.16** Originalaufnahme).

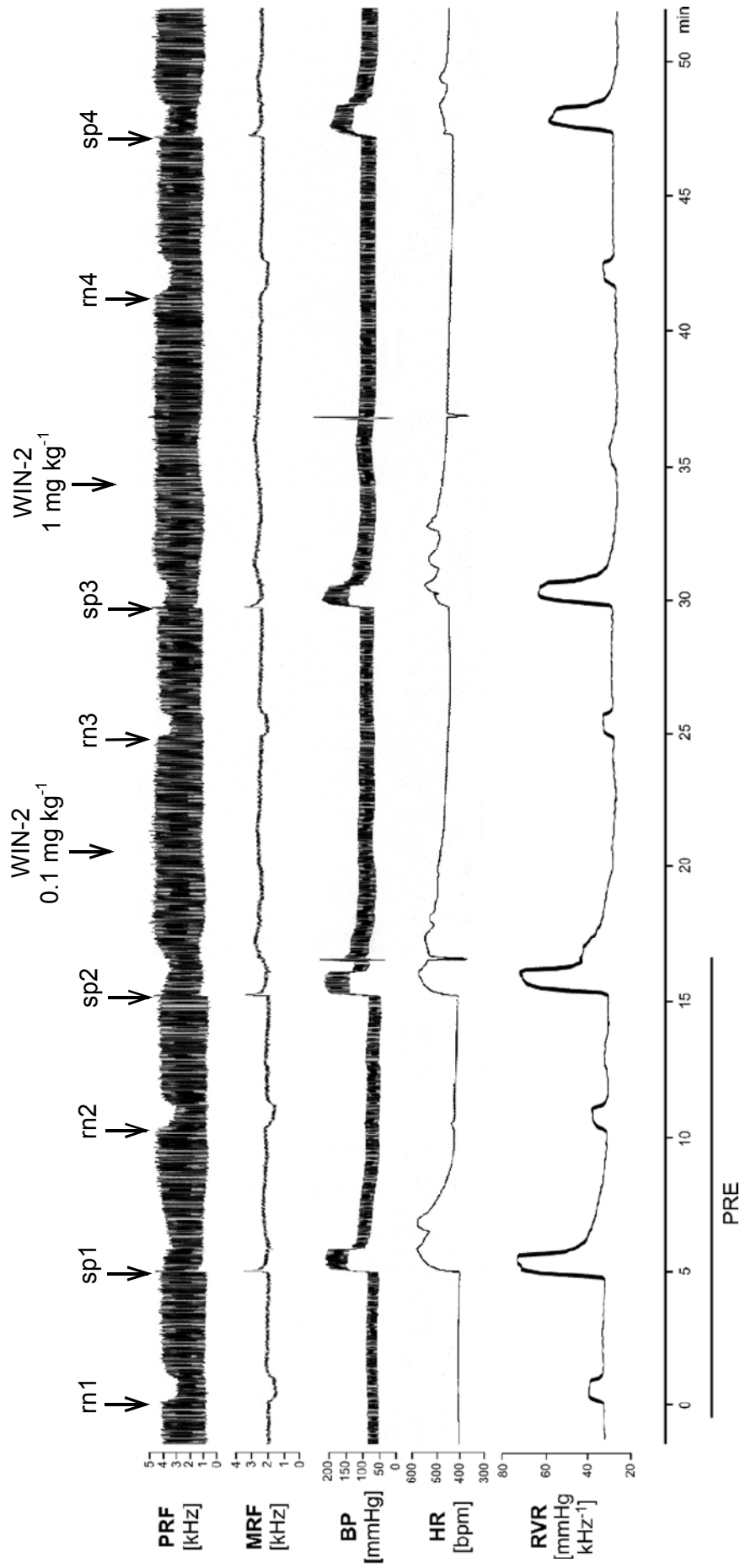


Abbildung 3.16: Originalaufnahme. Effekte spinaler und renaler elektrischer Stimulation (8 V und 0.5 ms Pulse bei 2 Hz) auf den pulsierenden renalen Blutfluss (PRF), den mittleren renalen Blutfluss (MRF), den pulsierenden arteriellen Blutdruck (BP), die Herzfrequenz (HR) und den renalen vaskulären Widerstand (RVR) in despalisierten Ratten vor (PRE) und nach Injektion von WIN-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurde, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Die Aufnahme repräsentiert 8 Experimente. rn: renale Stimulation; sp: spinale Stimulation.

Der mittlere renale Blutfluss (MRF) änderte sich nicht reproduzierbar und wurde deshalb in den statistischen Abbildungen nicht dargestellt. Die direkte Reizung des Nierensympathikus führte zu einer Abnahme des MRF und einer Zunahme des RVR. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die HR blieben unbeeinflusst (**Abbildung 3.16** Originalaufnahme) und wurden deshalb in den statistischen Abbildungen nicht dargestellt.

Sowohl die Basal- als auch die Delta-PRE-Werte der Gruppen ohne und mit Vorbehandlung sind in **Tabelle 3.3**, S. 76 dargestellt. Vorbehandlung mit dem CB₁-Cannabinoidrezeptor-Antagonisten Rimonabant (2 mg kg⁻¹ i.v.) hat keinen der Parameter signifikant beeinflusst. Es gibt auch innerhalb der Gruppen keinen Unterschied der basalen PRE-Werte zwischen den Stimulationsarten, was für die Stabilität des Modells spricht.

3.3.2 Basal-Werte

Die prozentualen Basal-Werte sind für die jeweiligen Parameter und Stimulationsarten in den **Abbildungen 3.17**, S. 77 und **3.18**, S. 78 gezeigt.

Zwischen den zwei Gruppen SOL und WIN-2 sind bei den untersuchten Parametern keine signifikanten Unterschiede in den Basal-Werten vor spinaler (**Abbildung 3.17**) und renaler (**Abbildung 3.18**) Stimulation festzustellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass gleiche Ausgangswerte für eine Antwort auf eine elektrische Reizung in den untersuchten Gruppen vorlagen.

Die Basal-Werte zwischen den beiden Gruppen RIM und WIN-2 zeigten bis auf die PRE-Werte des MAP bei spinaler (**Abbildung 3.17a**) und renaler Stimulation (**Abbildung 3.18a**) bei keinem der Parameter signifikante Unterschiede. Wie man in den Abbildungen sieht, ist diese Signifikanz der prozentualen Basal-PRE-Werte nicht sehr deutlich und geht sogar verloren, wenn man die absoluten PRE-Werte zwischen der mit Rimonabant vorbehandelten Gruppe und den insgesamt nicht vorbehandelten Tieren betrachtet (**Tabelle 3.3**).

Tabelle 3.3: *Initiale Basal-Werte für die Parameter vor renaler und spinaler Stimulation und initiale Änderungen während renaler und spinaler Stimulation (PRE-Werte^a).*

Vorbehandlung	ohne Vorbehandlung		RIM^b	
Anzahl (n) der Tiere	14		6	
Art der Stimulation (8V, 0.5ms, 2Hz)	renal	spinal	renal	spinal
MAP [mmHg]	Basal Δ	72.5 ± 2.8 3.4 ± 0.6	70.7 ± 2.4 82.6 ± 3.6	78.5 ± 4.2 82.0 ± 7.6
MRF [kHz]	Basal Δ	2.03 ± 0.15 -0.51 ± 0.03	1.96 ± 0.15 -0.06 ± 0.05	2.24 ± 0.15 0.03 ± 0.08
RVR [mmHg kHz⁻¹]	Basal Δ	37.70 ± 2.28 17.48 ± 2.43	38.08 ± 2.28 46.96 ± 3.54	35.73 ± 3.79 11.42 ± 2.27
HR [bpm]	Basal Δ	441 ± 11 -4 ± 1	432 ± 12 89 ± 12	449 ± 21 -5 ± 1

^a PRE-Werte sind Mittelwerte der Werte, die kurz vor (basal) oder während (Δ) den spinalen bzw. renalen Stimulationen 1 und 2 vor Substanzgabe erhalten wurden

^b RIM (2 mg kg⁻¹) wurde bei t = -20 min i.v. injiziert

* P < 0.05 versus PRE

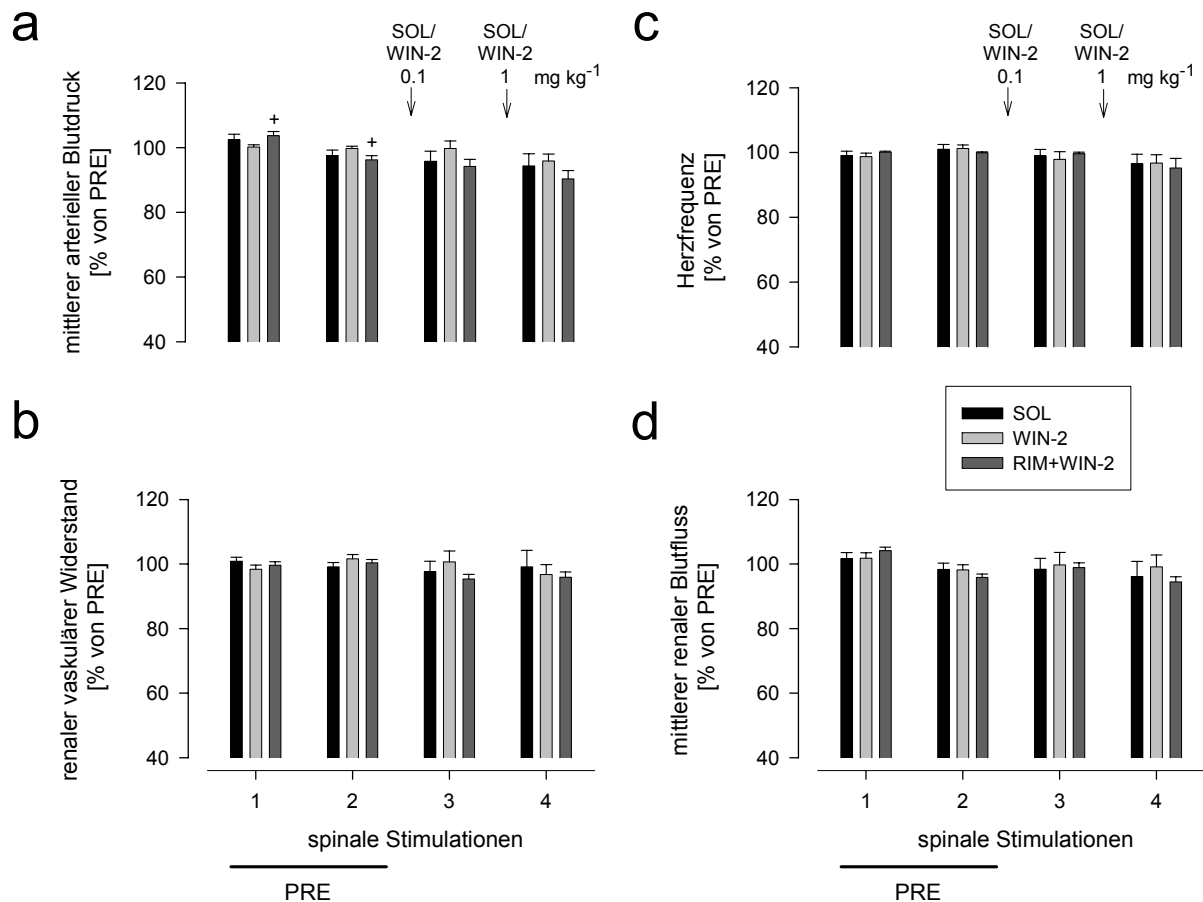


Abbildung 3.17: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM+WIN-2) auf die Basalwerte **a** des mittleren arteriellen Blutdrucks, **b** des renalen vaskulären Widerstands, **c** der Herzfrequenz und **d** des mittleren renalen Blutflusses in despinalisierten Ratten, jeweils vor den einzelnen spinalen Stimulationen. SOL (0.5 ml kg⁻¹) und WIN-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine der beiden WIN-2-Gruppen mit RIM (2 mg kg⁻¹ i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 6 (SOL), 8 (WIN-2) und 6 (RIM) Experimenten. * $P < 0.05$ versus WIN-2 allein.

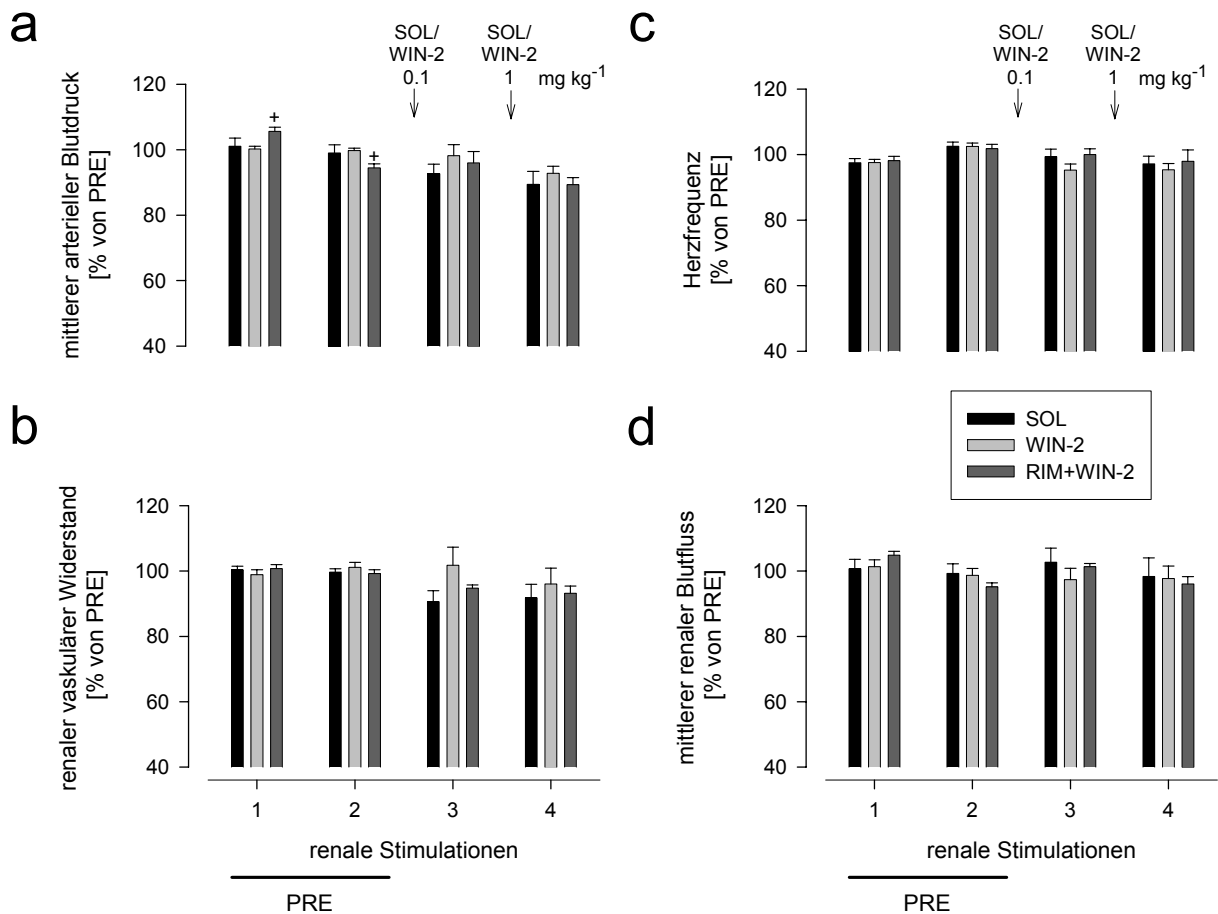


Abbildung 3.18: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM+WIN-2) auf die Basalwerte **a** des mittleren arteriellen Blutdrucks, **b** des renalen vaskulären Widerstands, **c** der Herzfrequenz und **d** des mittleren renalen Blutflusses in despinalisierten Ratten, jeweils vor den einzelnen renalen Stimulationen. SOL (0.5 ml kg^{-1}) und WIN-2 (0.1 und 1 mg kg^{-1}) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine der beiden WIN-2-Gruppen mit RIM (2 mg kg^{-1} i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 6 (SOL), 8 (WIN-2) und 6 (RIM) Experimenten. $^+ P < 0.05$ versus WIN-2 allein.

3.3.3 Kontroll-Experimente

In der Kontroll-Gruppe wurde das Lösungsmittel für die Cannabinoide (SOL) zweimal i.v. injiziert (je 0.5 ml kg^{-1}) (**Abbildung 3.19**). Die Injektion verursachte, wie schon zuvor in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, einen kurzfristigen Anstieg des Blutdrucks, außerdem des mittleren renalen Blutflusses und auch des renalen vaskulären Widerstands (nicht gezeigt). Vor den elektrischen Reizungen waren die

Werte wieder stabil und zeigten weder bei spinaler (**Abbildung 3.19a,b,c**) noch bei renaler Stimulation (**Abbildung 3.20a,b**, S. 80) signifikante Veränderungen der reizbedingten Anstiege der gemessenen Parameter.

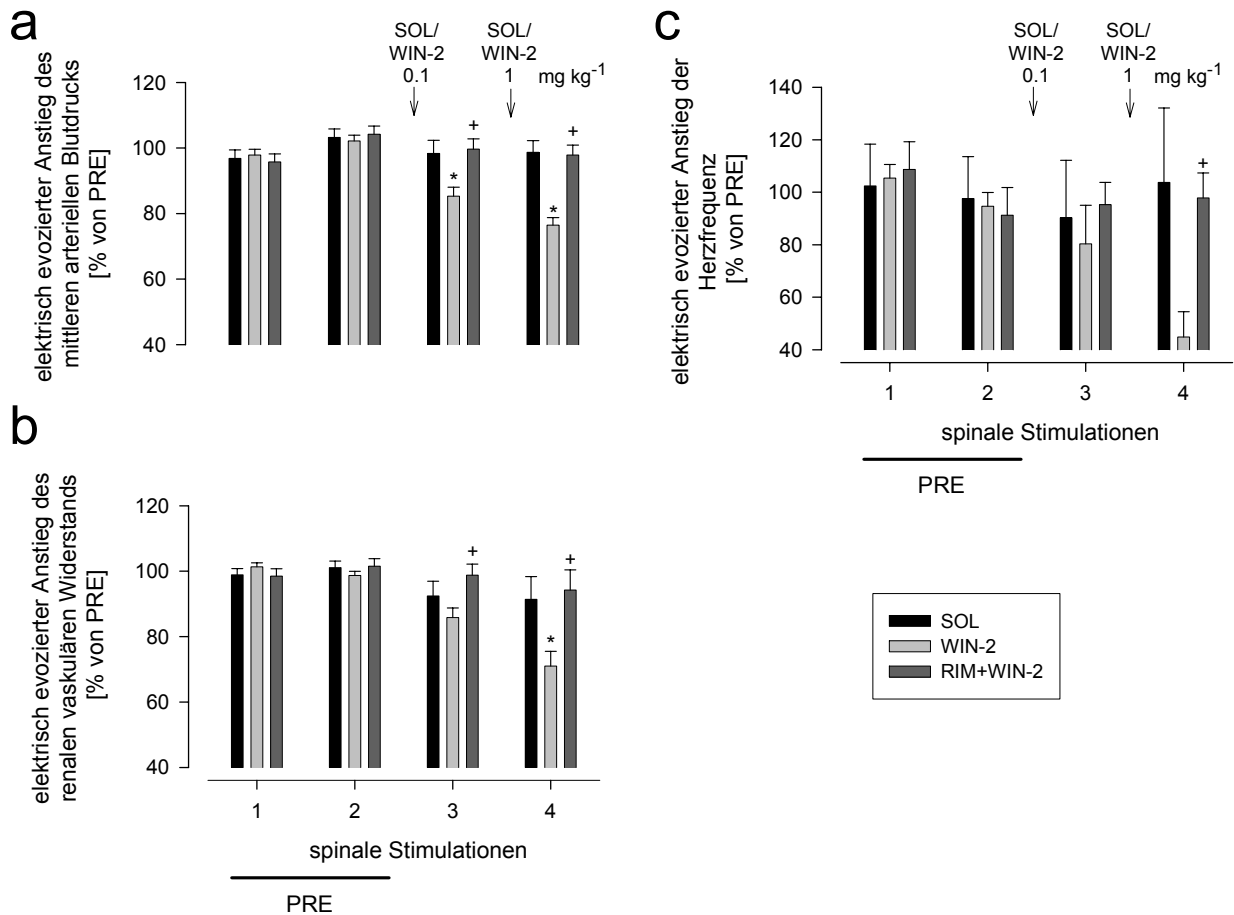


Abbildung 3.19: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM+WIN-2) auf **a** den mittleren arteriellen Blutdruck, **b** den renalen vaskulären Widerstand und **c** die Herzfrequenz in despinalisierten Ratten mit spinaler elektrischer Stimulation (8 V und 0.5 ms Pulse bei 2 Hz). SOL (0.5 ml kg⁻¹) und WIN-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine der beiden WIN-2-Gruppen mit RIM (2 mg kg⁻¹ i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 6 (SOL), 8 (WIN-2) und 6 (RIM) Experimenten. * $P < 0.05$ versus SOL; ⁺ $P < 0.05$ versus WIN-2 allein.

3.3.4 Wirkungen von WIN55212-2

Zwei Dosen des CB₁-/CB₂-Rezeptor-Agonisten WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden verabreicht (**Abbildungen 3.16**, S. 74, **3.19**, S. 79 und **3.20**). Injektion von WIN55212-2 führte bei spinaler Stimulation sowohl zu einer dosisabhängigen Abnahme des reizbedingten Anstiegs des Blutdrucks (**Abbildungen 3.16** und **3.19a**) als auch des renalen vaskulären Widerstands, wobei letztere allerdings erst bei der höheren Dosis signifikant wurde (**Abbildungen 3.16** und **3.19b**).

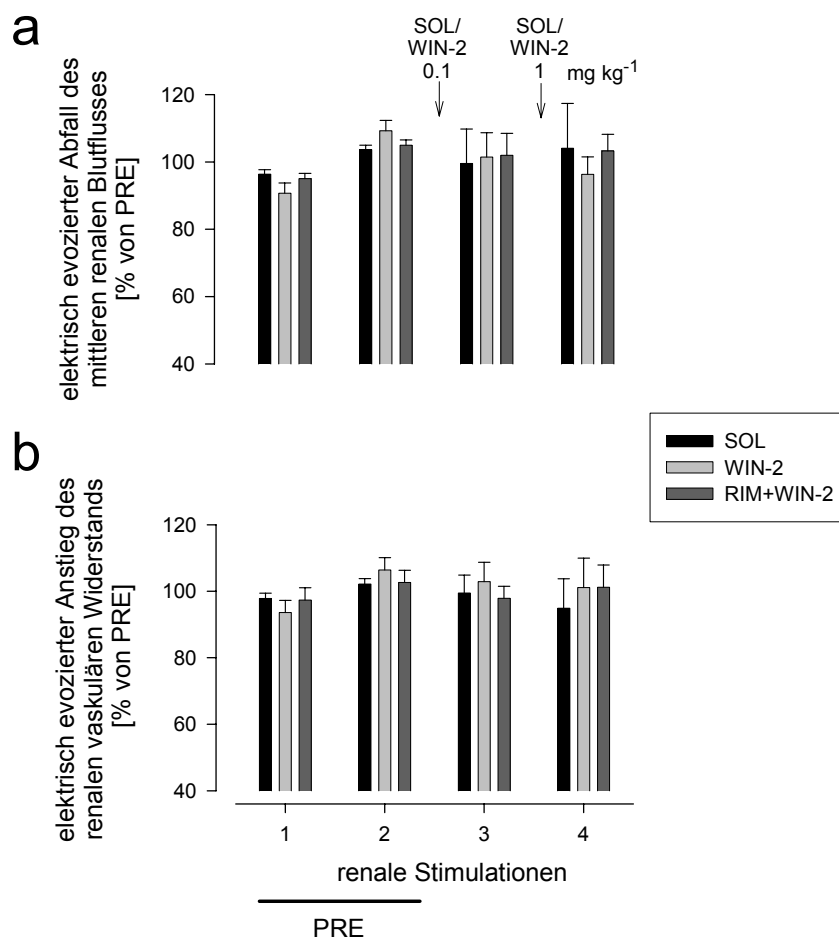


Abbildung 3.20: Effekte des Lösungsmittels (SOL), WIN55212-2 (WIN-2) und Rimonabant (RIM+WIN-2) auf **a** den mittleren renalen Blutfluss und **b** den renalen vaskulären Widerstand in despinalisierten Ratten mit renaler elektrischer Stimulation (8 V und 0.5 ms Pulse bei 2 Hz). SOL (0.5 ml kg⁻¹) und WIN-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) wurden, wie durch die Pfeile angezeigt, i.v. injiziert. Bei $t = -20$ min wurde eine der beiden WIN-2-Gruppen mit RIM (2 mg kg⁻¹ i.v.) vorbehandelt. Die Werte sind als Prozent von PRE angegeben. Mittelwerte \pm SEM von 6 (SOL), 8 (WIN-2) und 6 (RIM) Experimenten.

Die Minderung des reizbedingten Anstiegs der Herzfrequenz erreichte aufgrund der großen Standardabweichungen keine statistische Signifikanz (**Abbildung 3.19c**, S. 79). Injektion von WIN55212-2 bei renaler Stimulation veränderte weder die reizbedingte Abnahme des MRF noch den Anstieg des RVR (**Abbildungen 3.16**, S. 74 und **3.20a,b**).

3.3.5 Interaktion zwischen WIN55212-2 und Rimonabant

Nach Vorbehandlung mit dem selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant (2 mg kg⁻¹) wurden nach der PRE-Periode wieder zwei Dosen von WIN55212-2 (0.1 und 1 mg kg⁻¹) verabreicht. Bei spinaler Stimulation wurden die zuvor beobachteten Wirkungen von WIN55212-2 auf die reizbedingten Anstiege des MAP, des RVR und der HR vollständig antagonisiert (**Abbildung 3.19a,b,c**, S. 79). Bei renaler Stimulation zeigte die mit Rimonabant vorbehandelte Gruppe keinen Unterschied zur SOL- und WIN-2-Gruppe (**Abbildung 3.20**, S. 80).

3.3.6 Verifizierung der adrenerg vermittelten Wirkung bei postganglionärer Stimulation des Nierensympathikus

Guanethidin gelangt mit dem Noradrenalin-Transporter in die Axonendigungen postganglionär-sympathischer Neurone. Dort hemmt es spannungsabhängige Natriumkanäle, was zu einer Hemmung der Noradrenalinabgabe führt.

Erneute postganglionäre Reizung des Nierensympathikus 15 bis 20 min nach Guanethidin-Injektion durfte dann keine nennenswerte Änderung des renalen Blutflusses und des renalen vaskulären Widerstands mehr hervorrufen. Auch die Wirkung der spinalen Stimulation auf die Parameter musste von Guanethidin unterdrückt werden (**Abbildung 3.21** Originalaufnahme, S. 82).

Guanethidin selbst ($n = 5$) führte zu einer geringfügigen Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks von 77.2 ± 7.8 auf 72.8 ± 6.4 mmHg ($P < 0.05$) und des MRF von 2.24 ± 0.36 auf 1.85 ± 0.59 kHz ($P < 0.05$). Somit stieg der RVR von 35.28 ± 7.45 auf 42.71 ± 14.18 mmHg kHz⁻¹ ($P < 0.05$). Die Herzfrequenz (HR) nahm ausgehend von 475 ± 43 bpm sowie einem initial vorübergehenden Anstieg auf 492 ± 35 bpm zu (**Abbildung 3.21** Originalaufnahme).

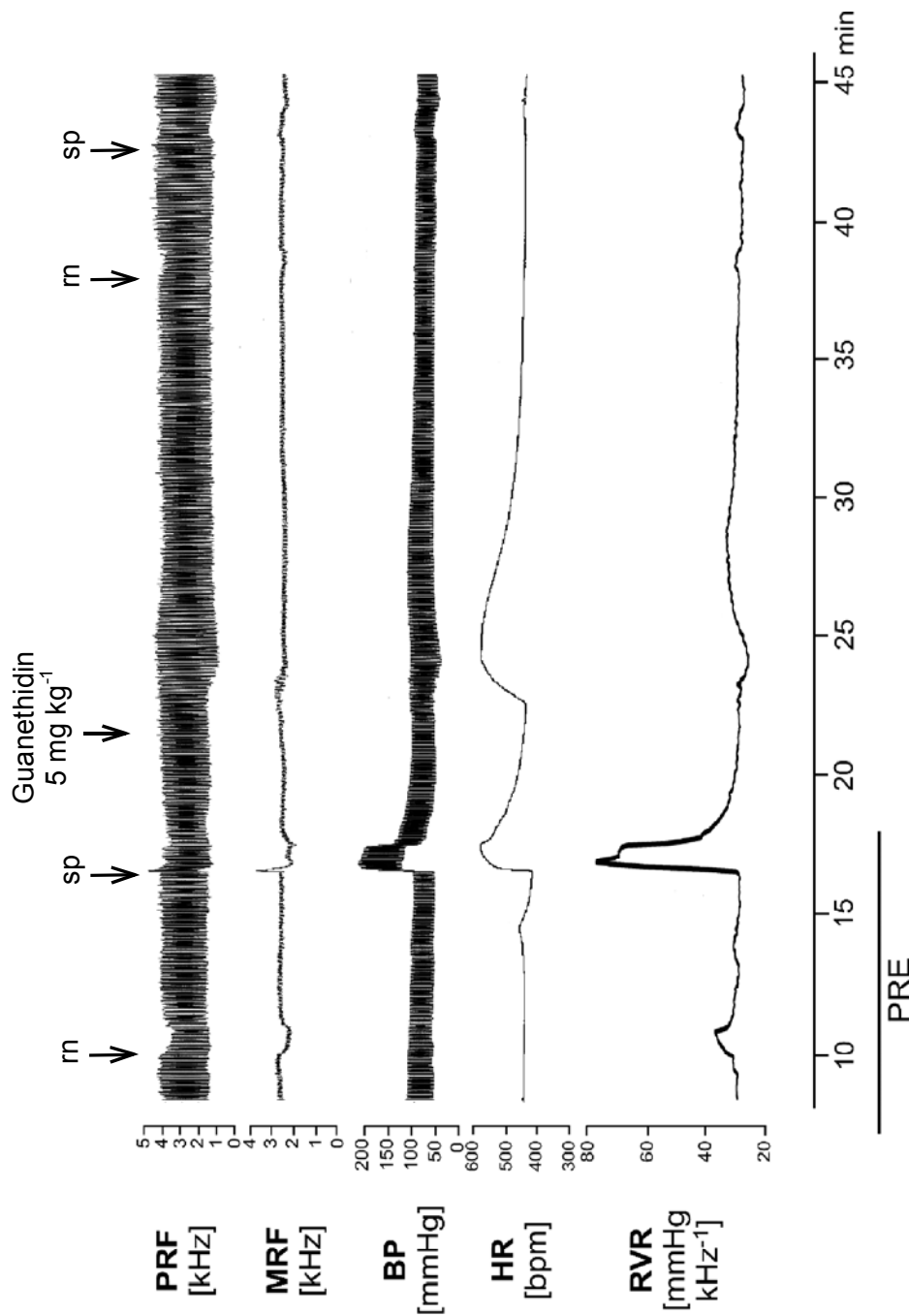


Abbildung 3.21: Originalaufnahme. Effekte spinaler und renaler elektrischer Stimulation (8 V und 0.5 ms Pulse bei 2 Hz) auf den pulsierenden renalen Blutfluss (PRF), den mittleren renalen Blutfluss (MRF), den pulsierenden arteriellen Blutdruck (BP), die Herzfrequenz (HR) und den renalen vaskulären Widerstand (RVR) in despinalisierten Ratten vor (PRE) und nach Guanethidin. Guanethidin (5 mg kg⁻¹) wurde, wie durch den Pfeil angezeigt, i.v. injiziert. Die Aufnahme repräsentiert 5 Experimente. rn: renale Stimulation; sp: spinale Stimulation.

Die Abnahme des MRF und damit auch die Zunahme des RVR durch direkte Stimulation des Nierensympathikus mit 8 V, 0.5 ms Rechteckpulsen bei 2 Hz, wurden 15 bis 20 min nach Injektion von Guanethidin signifikant unterdrückt. Auch präganglionäre Sympathikusreizung hatte keinen Einfluss mehr. **Tabelle 3.4** zeigt für jeden Parameter die absoluten Änderungen während der PRE-Phase sowie die geringen prozentualen Änderungen nach Substanzinjektion, die durch renale bzw. spinale Stimulation ausgelöst wurden. Für ein Originalregistrarat siehe **Abbildung 3.21**.

Tabelle 3.4: Durch spinale und renale Stimulation hervorgerufene Änderungen der Parameter vor (PRE^a) und nach Injektion von Mecamylamin^b sowie Guanethidin^c.

Behandlung	Mecamylamin		Guanethidin	
	n	spinal	renal	spinal
Anzahl (n) der Tiere	5			5
Art der Stimulation (8V, 0.5ms, 2Hz)		spinal		
Δ MAP				
PRE [mmHg]		79.8 ± 4.7	3.9 ± 1.2	91.8 ± 5.2
nach Injektion [% von PRE]		13.6 ± 3.0*	nicht auswertbar	5.3 ± 1.0*
Δ MRF				
PRE [kHz]		-0.16 ± 0.15	-0.58 ± 0.11	-0.13 ± 0.11
nach Injektion [% von PRE]		nicht auswertbar	8.1 ± 3.4*	nicht auswertbar
Δ RVR				
PRE [mmHg kHz ⁻¹]		39.76 ± 3.71	9.48 ± 1.50	40.91 ± 4.67
nach Injektion [% von PRE]		5.5 ± 2.0*	11.2 ± 3.4*	2.5 ± 1.8*
Δ HR				
PRE [bpm]		80 ± 17	-6 ± 1	113 ± 7
nach Injektion [% von PRE]		15.0 ± 10.4*	nicht auswertbar	3.6 ± 0.9*

^a PRE-Werte sind Mittelwerte, die sich aus spinalen bzw. renalen Stimulationen 5 min vor Substanzgabe ergeben

^b Mecamylamin (1 mg kg⁻¹) wurde 15 min vor spinaler Stimulation i.v. injiziert

^c Guanethidin (5 mg kg⁻¹) wurde 20 min vor renaler und spinaler Stimulation i.v. injiziert

* P < 0.05 versus PRE

3.3.7 Verifizierung der präganglionären Stimulation

Erneute elektrische Sympathikusreizung 15 min nach Mecamylamin-Injektion durfte keine nennenswerte Änderung des Blutdrucks, der Herzfrequenz und des renalen vaskulären Widerstands mehr hervorrufen (**Abbildung 3.22**).

Präganglionäre Stimulation des Sympathikotonus nach Injektion von Mecamylamin hatte kaum noch Einfluss auf die Parameter MAP, HR und RVR. **Tabelle 3.4**, S. 83 zeigt für jeden Parameter die absoluten Änderungen während der PRE-Phase sowie die geringen prozentualen Anstiege nach Substanzinjektion, die durch spinale Stimulation ausgelöst wurden. Für ein Originalregistrarat siehe **Abbildung 3.22**.

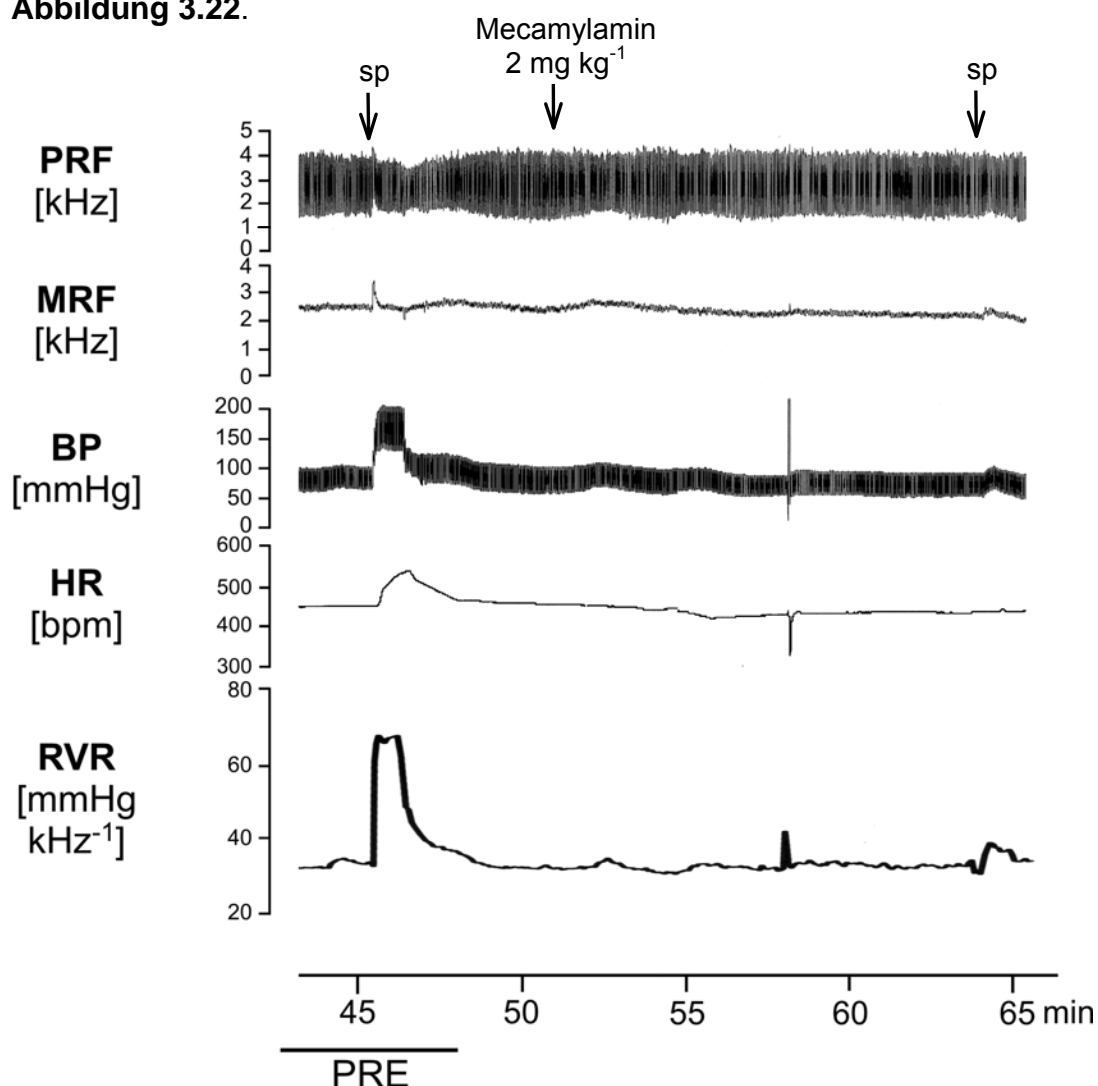


Abbildung 3.22: Originalaufnahme. Effekte spinaler elektrischer Stimulation (8 V und 0.5 ms Pulse bei 2 Hz) auf den pulsierenden renalen Blutfluss (PRF), den mittleren renalen Blutfluss (MRF), den pulsierenden arteriellen Blutdruck (BP), die Herzfrequenz (HR) und den renalen vaskulären Widerstand (RVR) in despinalisierten Ratten vor (PRE) und nach Mecamylamin. Mecamylamin (2 mg kg⁻¹) wurde, wie durch den Pfeil angezeigt, i.v. injiziert. Die Aufnahme repräsentiert 5 Experimente. sp: spinale Stimulation.

4 DISKUSSION

4.1 Folgen einer Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren auf die Atmung und das Herz-Kreislauf-System

4.1.1 Respiratorische Wirkungen

Intracisternal (i.c.) appliziert hat der gemischte CB₁/CB₂-Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN55212-2 (Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002) die Atemfrequenz und das Atemminutenvolumen gesenkt sowie das Atemzugvolumen leicht gesteigert. Die ausbleibende Wirkung des Stereoisomers WIN55212-3 (Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002) deutet auf eine Beteiligung spezifischer Cannabinoidrezeptoren hin. Die antagonistischen Wirkungen des CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten Rimonabant (Rinaldi-Carmona *et al.* 1994; Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002) identifizierte den Rezeptor als CB₁-Rezeptor. Zumindest im Falle der Atemfrequenz zeigte Rimonabant keine eigene Wirkung (**Tabelle 3.1**, S. 54); deshalb ist ein funktioneller Antagonismus zwischen WIN55212-2 und Rimonabant unwahrscheinlich.

Die intracisternalen Dosen, die in den vorliegenden Experimenten respiratorische Wirkungen hervorgerufen haben (1 - 30 µg kg⁻¹), waren wesentlich kleiner als die intravenös injizierten Dosen, die zu einer Atemdepression in Ratten führten (30 - 1000 µg kg⁻¹; Schmid *et al.* 2003). Dieser Befund argumentiert gegen eine systemische Wirkung des i.c. injizierten WIN55212-2 (nach Diffusion in den systemischen Kreislauf) und macht es wahrscheinlich, dass WIN55212-2 tatsächlich in Zentren des Hirnstamms gewirkt hat, die vom Intracisternalraum aus erreichbar sind. Einer kürzlich erschienenen Beobachtung in Ratten zufolge bewirken Cannabinoide, mikroinjiziert in den rostroventrolateralen retikulären Nucleus, eine kurzweilige Unterdrückung (< 8 s) des Feuerns des Nervus phrenicus (d.h. sie verursachen Apnoe; Padley *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine lang andauernde Atemdepression beobachtet (> 10 min); aus diesem Grund mag das in diesen beiden Studien beobachtete Phänomen nicht identisch sein. Dennoch zeigen sowohl die Untersuchungen von Padley *et al.* (2003) als auch die der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal, dass eine Aktivierung von CB₁-Rezeptoren im Hirnstamm zu Atemdepression führt. In den Untersuchungen der

vorliegenden Arbeit wurde dies über eine direkte Messung verschiedener respiratorischer, dynamischer Parameter gezeigt. Es ist wahrscheinlich, dass systemisch applizierte Cannabinoide die Atmung ebenfalls durch eine Wirkung im Hirnstamm hemmen, allerdings können weitere Wirkorte (auch periphere Orte) nicht ausgeschlossen werden.

Es ist nicht bekannt, welches der Atemzentren im Hirnstamm (die ventrale medulläre respiratorische Gruppe, die dorsale medulläre respiratorische Gruppe oder die pontine respiratorische Gruppe) der Hauptangriffspunkt der Cannabinoide zur Senkung der Atemfrequenz war. Jedoch sind sowohl die CB₁-Rezeptor-mRNA als auch das -Protein in verschiedenen Nuclei präsent, die zu diesen respiratorischen Zentren gehören; so im Nucleus tractus solitarii, im Nucleus dorsalis nervi vagi, in der Area postrema, im rostroventrolateralen Nucleus reticularis, im Nucleus ambiguus und im Nucleus parabrachialis (Herkenham *et al.* 1991; Mailleux & Vanderhaeghen 1992; Matsuda *et al.* 1993; Glass *et al.* 1997; Tsou *et al.* 1998; Padley *et al.* 2003).

Im Gegensatz zur Senkung der Atemfrequenz hat WIN55212-2 den Peak-Luftstrom während der Inspiration nicht beeinflusst. Da der Peak-Luftstrom eine Funktion des respiratorischen Antriebs (hier definiert als die Anzahl der Muskelfasern, die aktiv an der Inspiration beteiligt sind) und des Atemwegwiderstandes ist, weist diese Beobachtung darauf hin, dass WIN55212-2 die medulläre Regulation dieser Parameter nicht verändert hat. WIN55212-2 hatte also selektiven Einfluss auf die medulläre respiratorische Rhythmogenese.

Das zweite Ziel dieser Experimentenreihe war, die Frage zu klären, ob endogene Opioide und Opioidrezeptoren an der atemdepressiven Wirkung der Cannabinoide beteiligt sind. Die Ergebnisse zweier Versuchsreihen sprechen gegen eine solche Beteiligung von Opioiden. Zum Einen unterschied sich das Wirkungsmuster des Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 von dem Wirkungsmuster des μ -Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO. Beide Substanzen verminderten die Atemfrequenz und das Atemminutenvolumen. Der Cannabinoid-Agonist zeigte jedoch keine Wirkung auf den Peak-Luftstrom, wohingegen der Opioid-Agonist diesen stark verminderte. Das Atemzugvolumen wurde durch das Cannabinoid gesteigert, durch das Opioid jedoch gemindert.

Das zweite, ausschlaggebendere Argument gegen eine Beteiligung endogener Opioide wurde durch die Interaktionsexperimente geliefert: Der Opioidrezeptor-Antagonist Naloxon veränderte die durch den Cannabinoid-Agonisten

hervorgerufene Atemdepression nicht, während er die Wirkungen des Opioid-Agonisten abschwächte. Da Naloxon Affinität zu μ -, δ - und κ -Opioidrezeptoren besitzt (Corbett *et al.* 1993), ist es äußerst unwahrscheinlich, dass irgendeiner dieser Rezeptoren an der Wirkung des Cannabinoid-Agonisten WIN55212-2 beteiligt war. Ein ergänzendes Argument gegen eine Beteiligung von κ -Opioidrezeptoren ist die Tatsache, dass κ -Opioidrezeptor-Agonisten keine Atemdepression hervorrufen (Flórez & Hurlé 1993). Auch auf die atemdepressiven Wirkungen systemisch applizierter Cannabinoide in Affen zeigte ein Opioid-Antagonist keinen Einfluss (Vivian *et al.* 1998).

Der CB₁-Rezeptor-Antagonist Rimonabant, i.v. gegeben, erhöhte den Peak-Luftstrom, das Atemzugvolumen und das Atemminutenvolumen (**Tabelle 3.1**, S. 54). Es ist schwierig, diese Ergebnisse auf eine Blockade der Wirkung endogener Cannabinoide im Hirnstamm zurückzuführen (z.B. würde in diesem Fall eine Verminderung des Atemzugvolumens erwartet). Eine Wirkung von Rimonabant in der Peripherie scheint wahrscheinlicher; eine Senkung des Atemwegwiderstandes durch Rimonabant könnte alle drei beobachteten Veränderungen erklären. Wenn beispielsweise endogene Cannabinoide tonisch die Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Neuronen der Bronchien hemmen (so wie exogene Cannabinoide; Vizi *et al.* 2001), dann ist zu erwarten, dass Rimonabant den Atemwegwiderstand vermindert.

4.1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen

Es herrscht allgemeine Übereinstimmung, dass die Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus postganglionär-sympathischen Neuronen durch Aktivierung präsynaptischer CB₁-Rezeptoren eine wichtige Komponente der Cannabinoidwirkung auf das kardiovaskuläre System darstellt (Varga *et al.* 1996; Malinowska *et al.* 1997, 2001b; Niederhoffer & Szabo 1999; Szabo *et al.* 2001b; Niederhoffer *et al.* 2003).

Das Bild über die Effekte von Cannabinoiden auf kardiovaskuläre Regulationszentren ist weniger klar. Applikation von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in den Blutkreislauf des Kopfes von Hunden oder in den lateralen cerebralen Ventrikel von Katzen löste eine Sympathikushemmung aus (Cavero *et al.* 1973a,b; Vollmer *et al.* 1974). In einer neueren Studie an Hunden veränderten in den Nucleus tractus solitarii injizierte Cannabinoid-Agonisten nicht die Empfindlichkeit des

Barorezeptorreflexes (Rademacher *et al.* 2003). In wachen Kaninchen führte die Injektion von Cannabinoiden in die Cisterna magna zu Sympathikusanregung und vagal vermittelter Bradykardie (Niederhoffer & Szabo 1999 und 2000). In Ratten hatten Mikroinjektionen von Cannabinoiden in den Nucleus tractus solitarii keine Wirkung, wohingegen Injektionen in den rostroventrolateralen Nucleus reticularis eine schwache Sympathikushemmung erzeugten (Niederhoffer *et al.* 2003). Bei einer weiteren Studie an Ratten lösten Mikroinjektionen von Cannabinoiden in den rostroventrolateralen Nucleus reticularis eine Anregung des Sympathikus aus (Padley *et al.* 2003).

In den vorliegenden Experimenten erzeugte i.c.-Injektion des Cannabinoidrezeptor-Agonisten WIN55212-2 drei Effekte: die Plasmanoradrenalin-Konzentration und der Blutdruck stiegen an, während die Herzfrequenz sank. Sowohl die ausbleibende Wirkung des inaktiven Stereoisomers WIN55212-3 als auch die Aufhebung der Wirkungen durch den CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten Rimonabant weisen auf eine Beteiligung von CB₁-Rezeptoren bei den durch WIN55212-2 ausgelösten Effekten hin.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der i.c. injizierte Cannabinoid-Agonist WIN55212-2 im Hirnstamm und nicht systemisch wirkte (nach Diffusion in den systemischen Kreislauf). Erstens, weil die intracisternalen Dosen, die in den vorliegenden Experimenten kardiovaskuläre Wirkungen auslösten ($1 - 30 \mu\text{g kg}^{-1}$), wesentlich geringer waren als die intravenösen Dosen, die zu kardiovaskulären Veränderungen in Ratten führten ($30 - 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$; Lake *et al.* 1997; Niederhoffer *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003). Zweitens, weil das Wirkungsmuster, welches von i.c. applizierten Cannabinoiden hervorgerufen wurde, sich von jenem Wirkungsmuster unterscheidet, das bei i.v.-Applikation von Cannabinoiden beobachtet wurde. Nach i.c.-Injektion erhöhte WIN55212-2 die Plasmanoradrenalin-Konzentration und den Blutdruck, während diese Parameter nach i.v.-Injektion sanken (Lake *et al.* 1997; Niederhoffer *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003). Demnach löste WIN55212-2 seine kardiovaskulären Effekte wahrscheinlich über eine direkte Wirkung in kardiovaskulären Zentren des Hirnstamms aus. Allerdings fand gleichzeitig eine Atemdepression statt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass kardiovaskuläre Veränderungen aufgrund von Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose zu dem Gesamtbild kardiovaskulärer Reaktionen beigetragen haben.

Der Anstieg der Plasmanoradrenalin-Konzentration zeigt, dass in der Ratte (ähnlich wie in Kaninchen; siehe Niederhoffer & Szabo 1999, 2000) Cannabinoid-Agonisten den Sympathikotonus über eine Wirkung im Hirnstamm erhöhen. Intracisternale Injektion von WIN55212-2 führte auch zu einer dosisabhängigen Bradykardie (ähnlich wie in Kaninchen; siehe Niederhoffer & Szabo 1999, 2000). Dies ist wahrscheinlich auf eine Erhöhung des Vagustonus am Herzen zurückzuführen, da die durch systemisch appliziertes WIN55212-2 ausgelöste Bradykardie in Ratten vagal vermittelt ist (Niederhoffer *et al.* 2003, Schmid *et al.* 2003).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine Aktivierung von CB₁-Cannabinoidrezeptoren den respiratorischen Rhythmus-Generator im Hirnstamm dämpft. Eine Sympathikusanregung und eine Erhöhung des Vagustonus am Herzen sind weitere Folgen einer Aktivierung zentraler CB₁-Rezeptoren. Endogene Opiode und Opioidrezeptoren sind an den zentralen respiratorischen und kardiovaskulären Wirkungen von Cannabinoiden nicht beteiligt. Diese von Cannabinoiden im ZNS ausgelösten Effekte könnten unerwünschte Nebenwirkungen darstellen, wenn Cannabinoid-Agonisten z.B. in der Therapie von Asthma, Schmerz, Übelkeit und Muskelspastik (s. Einleitung Kapitel 1.5, Abschnitt 3) eingesetzt werden.

4.2 Die Rolle von Endocannabinoiden bei der Sympathikusregulierung

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren durch einen exogenen Cannabinoid-Agonisten eine deutliche Hemmung der sympathischen Neuro-Effektor-Transmission bewirkt. Es gab jedoch keine Anzeichen dafür, dass eine solche Sympathikushemmung durch Endocannabinoide vermittelt wird.

Eine präsynaptische Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Neuronen durch Cannabinoide wurde in mehreren Geweben nachgewiesen: Herz (Ishac *et al.* 1996; Malinowska *et al.* 2001b; Szabo *et al.* 2001b), Lunge (Vizi *et al.* 2001), mesenteriale Blutgefäße (Ralevic & Kendall 2002) und Vas deferens (Pertwee *et al.* 1992; Trendelenburg *et al.* 2000; Christopoulos *et al.* 2001; Schlicker *et al.* 2003). Durch eine präsynaptische Hemmung in vielen Organen vermindern Cannabinoide bei despinalisierten Ratten und Kaninchen mit elektrisch stimuliertem

Sympathikus das gesamte Noradrenalin-Spillover in der Peripherie. Auch die Plasmanoradrenalin-Konzentration sowie der Blutdruck werden folglich gesenkt (Malinowska *et al.* 1997; Niederhoffer & Szabo 1999; Niederhoffer *et al.* 2003). All diese Effekte wurden auf eine Aktivierung des neuronalen CB₁-Rezeptors zurückgeführt. Die von WIN55212-2 erzeugte Sympathikushemmung in der vorliegenden Arbeit bestätigt diese früheren Beobachtungen. Während in den vorhergehenden Studien die Sympathikusstimulation nur kurzfristig erfolgte (10 s - 3 min; Malinowska *et al.* 1997; Niederhoffer *et al.* 2003), spiegelt die in der vorliegenden Arbeit angewendete kontinuierliche Stimulation eher die physiologischen Bedingungen wider. Die Resultate bestätigen zugleich, dass die verwendete Methode geeignet ist, um Cannabinoid-evozierte Veränderungen im Sympathikotonus zu erfassen.

Es ist beeindruckend, dass – im Gegensatz zu den stark ausgeprägten Wirkungen von WIN55212-2 bei despinalisierten Ratten mit elektrischer Stimulation – der Cannabinoid-Agonist keinerlei Wirkung auf den Blutdruck und die Herzfrequenz bei Tieren mit einer Noradrenalin-Infusion hatte. Diese Beobachtung schließt direkte Effekte von WIN55212-2 auf das Endothel und die glatte Muskulatur sowie auf den Sinusknoten des Herzens aus und deutet darauf hin, dass die beobachteten Wirkungen bei despinalisierten Ratten mit elektrischer Stimulation Folgen einer Sympathikushemmung waren. Aufgrund der Art des verwendeten Modells kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass WIN55212-2 in anderen Regionen, die nur geringfügig zum totalen peripheren Widerstand beitragen, direkte Wirkungen auf das Gefäßendothel und die glatte Muskulatur hat (z.B. Cerebral- und Koronararterien, Gebremedhin *et al.* 1999; Wagner *et al.* 2001b).

Die Hypothese der vorliegenden Experimente war, dass endogene Cannabinoide eine Sympathikushemmung hervorrufen. Unter dieser Annahme war zu erwarten, dass der CB₁-Rezeptor-Antagonist Rimonabant den Sympathikotonus anheben würde. Rimonabant wurde unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen verabreicht, erhöhte aber unter keiner der Bedingungen den Blutdruck, die Herzfrequenz oder die Plasmanoradrenalin-Konzentration. Bei den verabreichten Dosen hebt Rimonabant den sympathikushemmenden Effekt exogener Cannabinoidrezeptor-Agonisten auf (Malinowska *et al.* 1997 und 2001b; Niederhoffer *et al.* 2003; Schmid *et al.* 2003). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass Endocannabinoide den Sympathikotonus am Herzen oder in einer anderen Region,

die wesentlich zur Plasmanoradrenalin-Konzentration oder zum totalen peripheren Widerstand beiträgt, hemmen. Die vorliegende Studie kann aber natürlich nicht ausschließen, dass Endocannabinoide in Regionen, die nur unwesentlich zur Plasmanoradrenalin-Konzentration oder zum totalen peripheren Widerstand beitragen, eine Rolle spielen (z.B. Vas deferens).

Rimonabant ist kein reiner CB₁-Rezeptor-Antagonist. Vielmehr zeigt die Substanz in Gegenwart konstitutiv aktiver CB₁-Rezeptoren invers-agonistische Eigenschaften (MacLennan *et al.* 1998; Pertwee 1999; Howlett *et al.* 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass Rimonabant im ZNS aufgrund dieser invers-agonistischen Wirkung tatsächlich die Transmitterfreisetzung erhöhen kann (Kathmann *et al.* 2004). Daher beruhte der durch Rimonabant ausgelöste Anstieg der Noradrenalinfreisetzung im Vas deferens (Christopoulos *et al.* 2001; Schlicker *et al.* 2003) möglicherweise nicht auf einer Unterbrechung der Endocannabinoid-vermittelten präsynaptischen Hemmung, sondern war Folge einer invers-agonistischen Wirkung an konstitutiv aktiven, präsynaptischen CB₁-Rezeptoren.

Obwohl Endocannabinoide unter den relativ physiologischen Bedingungen der vorliegenden Experimente nicht freigesetzt wurden, können sie dennoch in der Peripherie unter extrem pathologischen Bedingungen freigesetzt werden: bei hämorrhagischem Schock (Wagner *et al.* 1997), bei kardiogenem Schock (Wagner *et al.* 2001a), bei endotoxin-induziertem Schock (Varga *et al.* 1998; Godlewski *et al.* 2004) und bei Leberzirrhose (Batkai *et al.* 2001) (für ein Review s. Wagner *et al.* 1998). Unter diesen Bedingungen werden Endocannabinoide von Makrophagen, Monozyten und Blutplättchen synthetisiert. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass sie eine Vasodilatation vorwiegend über eine Wirkung am Gefäßendothel oder an der glatten Muskulatur auslösten (Wagner *et al.* 1997, 2001a; Varga *et al.* 1998; Batkai *et al.* 2001). Nach neueren Erkenntnissen vermindern Endocannabinoide während eines endotoxin-induzierten Schocks den Blutdruck jedoch hauptsächlich, indem sie die Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Neuronen hemmen (Godlewski *et al.* 2004).

Die Bedeutung der Endocannabinoide im ZNS und in der Peripherie ist offensichtlich unterschiedlich. In vielen Bereichen des ZNS werden Endocannabinoide von postsynaptischen Zellen auch unter physiologischen Bedingungen freigesetzt (z.B. Brown *et al.* 2003) und hemmen die Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Axonterminalen. In der Peripherie

hingegen werden Endocannabinoide nur unter extremen Bedingungen von Blutzellen freigesetzt und ihre am besten beschriebene Wirkung ist eine direkte Dilatation der Blutgefäße. In der Peripherie sind eine Freisetzung unter physiologischen Bedingungen und eine präsynaptische Wirkung eher selten (Schlicker *et al.* 2003; Godlewski *et al.* 2004; vorliegende Arbeit).

Das Endocannabinoid Anandamid kann neben CB₁- und CB₂-Cannabinoidrezeptoren auch VR1-Vanilloidrezeptoren aktivieren (Zygmunt *et al.* 1999; Malinowska *et al.* 2001a; Li *et al.* 2003; für eine Übersicht siehe Szallasi & Di Marzo 2000). In der vorliegenden Studie wurde nur untersucht, ob Endocannabinoide CB₁-Rezeptoren aktivieren. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass Endocannabinoide unter den gegebenen experimentellen Bedingungen freigesetzt wurden und CB₁-Rezeptor-unabhängige Effekte verursachten.

Eine therapeutische Folgerung kann aus den vorliegenden Ergebnissen abgeleitet werden. In aktuellen klinischen Studien wird Rimonabant zur Unterstützung der Gewichtsreduktion und des Tabakentzugs verwendet (Le Fur 2004; Fernandez & Allison 2004; Einleitung Kapitel 1.5, Abschnitt 6). Die vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Substanz bei peripherer Wirkung den Sympathikotonus, den Blutgefäßtonus und das Herz nicht beeinflusst. Folglich sind kardiovaskuläre Nebenwirkungen während der Behandlung mit Rimonabant wahrscheinlich nicht zu erwarten.

4.3 Die Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung

Bisher wurde als Mechanismus der Cannabinoid-vermittelten kardiovaskulären Wirkungen eine präsynaptische Hemmung der Transmission zwischen postganglionär-sympathischen Neuronen und Effektororganen angenommen (s. Einleitung Kapitel 1.7.3).

In dieser Experimentenreihe sollte die Wirkung von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung geklärt werden. Dazu wurde der Einfluss des gemischten CB₁/CB₂-Cannabinoidrezeptor-Agonisten WIN55212-2 auf den renalen vaskulären Widerstand unter prä- und postganglionärer Stimulation in despinalisierten Ratten untersucht.

Präganglionäre Stimulation des Sympathikus führte zu einem starken Anstieg des renalen vaskulären Widerstands, des mittleren arteriellen Blutdrucks sowie der Herzfrequenz. Mecamylamin als Ganglienblocker beseitigte die durch spinale Stimulation ausgelösten Anstiege dieser kardiovaskulären Parameter und bestätigte dadurch eine ausschließlich präganglionäre Reizung.

Postganglionäre Stimulation des Nierensympathikus steigerte ebenfalls den renalen vaskulären Widerstand. Jedoch betrug dieser Anstieg weniger als die Hälfte des Anstiegs, der durch spinale Stimulation verursacht wurde (**Tabelle 3.3**, S. 76). Der Blutdruck und die Herzfrequenz veränderten sich durch die Reizung des Nierensympathikus nicht. Der adrenerge Neuronenblocker Guanethidin verhinderte die stimulationsbedingte Zunahme des renalen vaskulären Widerstands und verifizierte somit, dass diese Vasokonstriktion der Nierenarterie über Aktivierung der Noradrenalinfreisetzung aus postganglionär-sympathischen Neuronen ausgelöst wird (Fink & Brody 1978). Eine Verminderung dieser Freisetzung durch Cannabinoide während postganglionärer Stimulation müsste folglich ebenfalls zu einer Abnahme des renalen vaskulären Widerstands führen.

Bei spinaler Stimulation senkte der Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN55212-2 dosisabhängig den reizbedingten Anstieg des renalen vaskulären Widerstands. Zusätzlich zeigte WIN55212-2 eine Hemmung des stimulationsbedingten Anstiegs des mittleren arteriellen Blutdrucks, die im Vergleich zu einigen bisherigen Untersuchungen in despinalisierten Ratten und Kaninchen (Malinowska *et al.* 1997, Niederhoffer & Szabo 1999, Niederhoffer *et al.* 2003) relativ gering war. Außerdem senkte WIN55212-2 mit steigender Dosis den Anstieg der Herzfrequenz.

Im Gegensatz zur spinalen Stimulation hatte WIN55212-2 während renaler Stimulation keinen Einfluss auf den renalen vaskulären Widerstand.

Alle durch WIN55212-2 verursachten Wirkungen wurden durch den CB₁-Rezeptor-selektiven Antagonisten Rimonabant antagonisiert, was auf eine Wirkung am CB₁-Rezeptor schließen lässt.

Die vorliegenden Experimente geben erstmals Grund zu der Annahme, dass der gemischte CB₁/CB₂-Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN55212-2 in despinalisierten Ratten die sympathische ganglionäre Übertragung hemmt und/oder an den regulierenden präganglionären Neuronen wirkt. Als Mechanismus kann eine präsynaptische CB₁-Rezeptor-vermittelte Hemmung der Acetylcholinfreisetzung aus präganglionär-sympathischen Neuronen angenommen werden. Niederhoffer *et al.*

(2001) haben eine solche präganglionäre Hemmung durch WIN55212-2 am isolierten Nebennierenmark gezeigt, und auch die Hemmung der Acetylcholinfreisetzung aus zentralen Neuronen durch WIN55212-2 wurde schon beobachtet (Gifford & Ashby 1996, Steffens *et al.* 2003).

Es gibt eine Anzahl von Studien darüber, dass in der Ratte (im Gegensatz zu anderen Spezies) die von Noradrenalin hervorgerufene renale Vasokonstriktion über α_1 -Adrenozeptoren vermittelt wird (*in vivo*: Wolff *et al.* 1987, Elhawary *et al.* 1992; *in vitro*: Schmitz *et al.* 1981, Cooper *et al.* 1985). Dennoch war der erste Versuch in vorliegender Arbeit, den stimulationsbedingten Anstieg des renalen vaskulären Widerstands mit dem α_1 -selektiven Antagonisten Prazosin zu verhindern, nicht so erfolgreich wie die komplette adrenerge Blockade mit Guanethidin. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zumindest auf eine Beteiligung von α_2 -Adrenozeptoren (Wolff *et al.* 1989) sowie auf eine geringe nicht-adrenerge Komponente (Sehic *et al.* 1997) an der renalen Vasokonstriktion hinweisen. Der initiale, vorübergehende Anstieg der Herzfrequenz nach Guanethidin-Injektion ist wahrscheinlich auf eine adrenerge Transmitterfreisetzung vor Eintritt der lokalanästhetischen Wirkung zurückzuführen.

Nach einer Studie von Sripairojthikoon & Wyss (1987) entspringen die die Niere innervierenden sympathischen Neurone in der Ratte überwiegend den Paravertebralganglien T12–L1, die ständig einen erregenden und hemmenden Input erhalten (Hayes *et al.* 1991). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit müssten folglich in diesen sympathischen Ganglien an Axonterminalen CB₁-Cannabinoidrezeptoren und in den Zellkörpern der regulierenden Neurone im Rückenmark mRNA für CB₁-Cannabinoidrezeptoren zu finden sein. Diese könnten durch Injektion einer retrograd- (z.B. Meerrettich-Peroxidase) bzw. transganglionär-retrograd wandernden Indikatorsubstanz (z.B. konjugierte Meerrettich-Peroxidase; Gladwell *et al.* 1999, Xie *et al.* 1999) in die Niere markiert und anschließend mit Hilfe der Immunohistochemie (Acsady *et al.* 2000) bzw. *in situ*-Hybridisierung (Romero *et al.* 1998) identifiziert werden. Anhand dieser anatomischen Untersuchungen könnten die funktionellen Resultate ergänzt und bekräftigt, sowie der genaue Wirkort der Cannabinoide auf die sympathische Innervierung der Nierendurchblutung geklärt werden.

4.4 Allgemeines

Der durch das Lösungsmittel (Ethanol/Alkamuls EL-620/NaCl-Lsg. (1/1/8, v/v/v)) verursachte kurzfristige Anstieg des Blutdrucks (vergleiche Kapitel 3.2.1.1, Abschnitt 2) ist vermutlich der etwas höheren Viskosität des Lösungsmittelgemisches im Vergleich zu wässrigem Medium zuzuschreiben. Aus diesem Grund wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit versucht, die Wasserlöslichkeit des käuflich erhältlichen WIN55212-2-Mesylats durch eine Überführung in das Hydrochlorid zu erhöhen. Die Hydrophilie wurde jedoch nicht entscheidend verbessert. Mit manchen seit April 2003 kommerziell verfügbaren wasserlöslichen Cannabinoidformulierungen (Tocris, Bristol, UK) könnte dieser kurzweilige Blutdruckanstieg wahrscheinlich vermieden werden. Bei diesen Produkten handelt es sich um wasserlösliche (dispergierbare) Emulsionen aus Sojaöl/Wasser im Verhältnis 1:4 (Tocrisolve™ 100), die mit dem Block-Copolymer Pluronic F68 emulgiert werden. Das Sojaöl umhüllt das Cannabinoidmolekül, während das Block-Copolymer die Emulsion stabilisiert, damit die Lipidtröpfchen im umgebenden wässrigen Milieu nicht fusionieren. Tocrisolve™ 100 kann in beliebigem Verhältnis mit wässrigen Medien wie Wasser, NaCl-Lösung oder HEPES-Puffer verdünnt werden und wurde für das Endocannabinoid Anandamid bereits in Studien beschrieben (*in vivo*: Gardiner *et al.* 2002; *in vitro*: Geragthy & Mazzone 2002). Da diese Formulierungen bisher jedoch nur für bestimmte Cannabinoide erhältlich und zudem derzeit noch recht teuer sind, wird ihre Verbreitung in der Forschung wohl noch eine Weile auf sich warten lassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Viele Fragen über die systemischen und zentralen Wirkungen von Cannabinoiden auf das Herz-Kreislauf-System und die Atemfunktion sind ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Fragestellungen untersucht.

Erstens sollten zentrale respiratorische und kardiovaskuläre Effekte von Cannabinoiden an narkotisierten Ratten aufgeklärt werden. Intracisternale Applikation des synthetischen CB₁/CB₂-Cannabinoidrezeptor-Agonisten WIN55212-2 senkte dosisabhängig die Atemfrequenz und das Atemminutenvolumen. Das Atemzugvolumen stieg leicht an, wohingegen der Peak-Luftstrom unverändert blieb. Zusätzlich verursachte WIN55212-2 einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Plasmanoradrenalin-Konzentration sowie eine Abnahme der Herzfrequenz. Im Gegensatz dazu waren nach Applikation des inaktiven Enantiomers WIN55212-3 die gemessenen Parameter unverändert. Der CB₁-Cannabinoidrezeptor-Antagonist Rimonabant hob alle respiratorischen und kardiovaskulären Wirkungen von WIN55212-2 auf. Die Wirkungen von WIN55212-2 wurden auch mit den Wirkungen des Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO verglichen. Intracisternale Applikation von DAMGO verminderte die Atemfrequenz, das Atemzugvolumen, das Atemminutenvolumen und den Peak-Luftstrom. Das Muster der respiratorischen Opioidwirkungen unterschied sich demnach von dem Muster der Cannabinoidwirkungen. Alle Wirkungen von DAMGO wurden durch Vorbehandlung mit dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon antagonisiert. Dagegen wurden durch WIN55212-2 ausgelöste respiratorische und kardiovaskuläre Effekte nicht von Naloxon beeinflusst.

Zusammenfassend führt also eine Aktivierung von CB₁-Rezeptoren im Hirnstamm zu Atemdepression, gesteigertem Sympathikotonus und erhöhtem Vagustonus des Herzens. An diesen zentralen Cannabinoid-Wirkungen sind Opioid-Mechanismen nicht beteiligt.

Zweitens sollte geklärt werden, ob im peripheren Nervensystem eine durch endogene Cannabinoide vermittelte präsynaptische Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung aus Axonterminalen funktioniert. In despinalisierten Ratten wurde ein künstlicher Sympathikotonus durch kontinuierliche elektrische Reizung präganglionär-sympathischer Axone erzeugt. Der CB₁-Rezeptor-Antagonist

Rimonabant hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck, die Herzfrequenz oder die Plasmanoradrenalin-Konzentration. Wir versuchten, die Endocannabinoidsynthese durch Aktivierung von $G_{\alpha_{q/11}}$ -Protein-gekoppelten Vasopressin V_1 -Rezeptoren (durch Infusion von Vasopressin) und α_1 -Adrenozeptoren (durch Infusion von Phenylephrin) zu stimulieren. Rimonabant hatte jedoch auch während Vasopressin- oder Phenylephrininfusion keine Wirkung. Zusätzlich zeigten wir, daß exogene Cannabinoide den Sympathikus hemmen. So senkte WIN55212-2 den Blutdruck und die Plasmanoradrenalin-Konzentration bei Ratten mit elektrisch stimuliertem Sympathikus. Im Gegensatz dazu beeinflusste WIN55212-2 bei blutdrucksteigernder Infusion von Noradrenalin keinen der kardiovaskulären Parameter in despinalisierten Ratten.

Nach diesen Ergebnissen hemmt eine Aktivierung präsynaptischer CB_1 -Rezeptoren die Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Nervenendigungen. Eine solche präsynaptische Hemmung wird jedoch offenbar nicht durch Endocannabinoide vermittelt.

Die dritte Frage galt dem Einfluss von Cannabinoiden auf die ganglionäre Übertragung in der sympathischen Innervation der Niere. Sowohl präganglionäre Stimulation des Sympathikus despinalisierter Ratten als auch direkte postganglionäre Stimulation des Nierensympathikus führten zu einem Anstieg des renalen vaskulären Widerstands. Der Cannabinoidrezeptor-Agonist WIN55212-2 verminderte dosisabhängig den durch spinale Stimulation hervorgerufenen Anstieg. Diese Wirkung wurde durch den Antagonisten Rimonabant aufgehoben. Im Gegensatz dazu hatte WIN55212-2 jedoch keinen Einfluss auf den durch postganglionäre Stimulation verursachten Anstieg des renalen vaskulären Widerstands.

Eine Aktivierung von CB_1 -Rezeptoren hemmt somit die sympathische ganglionäre Übertragung, was zu verminderter Katecholaminfreisetzung aus postganglionär-sympathischen Nervenendigungen und damit zu einem geringeren renalen vaskulären Widerstand führt. Diese Beobachtung ist der erste Hinweis auf eine Hemmung der ganglionären Übertragung durch Cannabinoide.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ACSADY L, PASCUAL M, ROCAMORA N, SORIANO E & FREUND TF (2000). Nerve growth factor but not neurotrophin-3 is synthesized by hippocampal GABAergic neurons that project to the medial septum. *Neuroscience* 98:23-31
- BARANN M, MOLDERINGS G, BRUSS M, BONISCH H, URBAN BW & GOTHERT M (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br. J. Pharmacol.* 137:589-596
- BATKAI S, JARAI Z, WAGNER JA, GOPARAJU SK, VARGA K, LIU J, WANG L, MIRSHAHI F, KHANOLKAR AD, MAKRIYANNIS A, URBASCHEK R, GARCIA N JR, SANYAL AJ & KUNOS G (2001). Endocannabinoids acting at vascular CB₁ receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nature Med.* 7:827-832
- BELLVILLE JW, SWANSON GD & AQLEH KA (1975). Respiratory effects of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17:541-548
- BENOWITZ NL & JONES RT (1975). Cardiovascular effects of prolonged delta-9-tetrahydrocannabinol ingestion. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18:287-297
- BENOWITZ NL & JONES RT (1981). Cardiovascular and metabolic considerations in prolonged cannabinoid administration in man. *J. Clin. Pharmacol.* 21:214S-223S
- BOUABOULA M, RINALDI M, CARAYON P, CARILLON C, DELPECH B, SHIRE D, LE FUR G & CASELLAS P (1993). Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem.* 214:173-180
- BREIVOGEL CS & CHILDERS SR (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol. Dis.* 5:417-431
- BREIVOGEL CS, GRIFFIN G, DI MARZO V & MARTIN BR (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* 60:155-163
- BROWN SP, BRENOWITZ SD & REGEHR WG (2003). Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nature Neurosci.* 6:1048-1057
- BUELKE-SAM J, HOLSON JF, BAZARE JJ & YOUNG JF (1978). Comparative stability of physiological parameters during sustained anesthesia in rats. *Lab. Anim. Sci.* 28:157-162

- CALANDRA B, PORTIER M, KERNEIS A, DELPECH M, CARILLON C, LE FUR G, FERRARA P & SHIRE D (1999). Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 374:445-455
- CAULFIELD MP & BROWN DA (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 106:231-232
- CAVERO I, KUBENA RK, DZIAK J, BUCKLEY JP & JANDHYALA BS (1972). Certain observations on interrelationships between respiratory and cardiovascular effects of (-)-9-trans-tetrahydrocannabinol. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 3:483-492
- CAVERO I, SOLOMON T, BUCKLEY JP & JANDHYALA BS (1973a). Studies on the bradycardia induced by (-)-9-trans-tetrahydrocannabinol in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 2:263-269
- CAVERO I, SOLOMON T, BUCKLEY JP & JANDHYALA BS (1973b). Studies on the hypotensive activity of (-)-delta9-trans-tetrahydrocannabinol in anesthetized dogs. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 6:527-540
- CHRISTOPOULOS A, COLES P, LAY L, LEW MJ & ANGUS JA (2001). Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 132:1281-1291
- CLARK SC (1975). Marihuana and the cardiovascular system. *Pharmacol. Biochem. Behav* 3:299-306
- COLOMBO G, AGABIO R, DIAZ G, LOBINA C, REALI R & GESSA GL (1998). Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 63:PL113-117
- COOPER CL & MALIK KU (1985). Prostaglandin synthesis and renal vasoconstriction elicited by adrenergic stimuli are linked to activation of alpha-1 adrenergic receptors in the isolated rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233:24-31
- CORBETT AD, PATERSON SJ & KOSTERLITZ HW (1993). Selectivity of ligands for opioid receptors. In *Opioids I. Handbook of Experimental Pharmacology vol. 104/I*. ed. Herz, A. pp. 645-679. Springer: Heidelberg
- DEADWYLER SA, HAMPSON RE, BENNETT BA, EDWARDS TA, MU J, PACHECO MA, WARD SJ & CHILDERS SR (1993). Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1:121-134.
- DESANTY KP & Dar MS (2001). Cannabinoid-induced motor incoordination through the cerebellar CB₁ receptor in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69:251-259

- DEVANE WA, DYSARZ FA 3RD, JOHNSON MR, MELVIN LS & HOWLETT AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34:605-613
- DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A & MECHOULAM R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949
- DEWILDT DJ, HILLEN FC, RAUWS AG & SANGSTER B (1983). Etomidate-anaesthesia, with and without fentanyl, compared with urethane-anaesthesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 79:461-469
- DI MARZO V, MELCK D, BISOGNO T & DE PETROCELLIS L (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21:521-528
- DI MARZO V, BREIVOGEL CS, TAO Q, BRIDGEN DT, RAZDAN RK, ZIMMER AM, ZIMMER A & MARTIN BR (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB₁, non-CB₂ receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.* 75:2434-2444
- DOHERTY PA, MCCARTHY LE & BORISON HL (1983). Respiratory and cardiovascular depressant effects of nabilone, N-methyllevonantradol and delta 9-tetrahydrocannabinol in anesthetized cats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227:508-516
- ELHAWARY AM, PETTINGER WA & WOLFF DW (1992). Subtype-selective alpha-1 adrenoceptor alkylation in the rat kidney and its effect on the vascular pressor response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260:709-713
- ESTRADA, U., BRASE, D.A., MARTIN, B.R. & DEWEY, W.L. (1987). Cardiovascular effects of delta 9- and delta 9⁽¹¹⁾-tetrahydrocannabinol and their interaction with epinephrine. *Life Sci.* 41:79-87
- FELDER CC, JOYCE KE, BRILEY EM, MANSOURI J, MACKIE K, BLOND O, LAI Y, MA AL, MITCHELL RL (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* 48:443-450
- FERNANDEZ JR & ALLISON DB (2004). Rimonabant Sanofi-Synthelabo. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 5:430-435
- FICHERA M, CRUCIANI G, BIANCHI A & MUSUMARRA G (2000). A 3D-QSAR study on the structural requirements for binding to CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors. *J. Med. Chem.* 43:2300-2309
- FINK GD & BRODY MJ (1978). Continuous measurement of renal blood flow changes to renal nerve stimulation and intra-arterial drug administration in the rat. *Am. J. Physiol.* 234:H219-22

- FLÓREZ J & HURLÉ MA (1993). Opioids in respiration and vomiting. In *Opioids II. Handbook of Experimental Pharmacology vol. 104/II*. ed. Herz, A. pp. 263-292. Springer: Heidelberg
- FREUND TF, KATONA I & PIOMELLI D (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83:1017-1066
- 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.* 86:1646-1647
- GARDINER SM, MARCH JE, KEMP PA & BENNETT T (2002). Complex regional haemodynamic effects of anandamide in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 135:1889-1896
- GEBREMEDHIN D, LANGE AR, CAMPBELL WB, HILLARD CJ & HARDER DR (1999). Cannabinoid CB₁ receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am. J. Physiol.* 276:H2085-2093
- GERARD CM, MOLLEREAU C, VASSART G & PARMENTIER M (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* 279:129-134
- GERAGHTY DP & MAZZONE SB (2002). Respiratory actions of vanilloid receptor agonists in the nucleus of the solitary tract: comparison of resiniferatoxin with non-pungent agents and anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 137:919-927
- GIFFORD AN & ASHBY CR JR (1996). Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:1431-1436
- GIL E, CHEN B, KLEERUP E, WEBBER M & TASHKIN DP (1995). Acute and chronic effects of marijuana smoking on pulmonary alveolar permeability. *Life Sci.* 56:2193-2199.
- GILLESPIE JS, MACLAREN A & POLLOCK D (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br. J. Pharmacol.* 40:257-267
- GLADWELL SJ, PYNER S, BARNES NM & COOTE JH (1999). D₁-like dopamine receptors on retrogradely labelled sympathoadrenal neurones in the thoracic spinal cord of the rat. *Exp. Brain Res.* 128:377-382
- GLASS M & FELDER CC (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB₁ and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB₁ receptor. *J. Neurosci.* 17:5327-5333

- GLASS M, DRAGUNOW M & FAULL RL (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299-318
- GODLEWSKI G, MALINOWSKA B & SCHLICKER E (2004). Presynaptic cannabinoid CB₁ receptors are involved in the inhibition of the neurogenic vasopressor response during septic shock in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.* 142:701-708
- GONG H JR, TASHKIN DP, SIMMONS MS, CALVARESE B & SHAPIRO BJ (1984). Acute and subacute bronchial effects of oral cannabinoids. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35:26-32
- GRAHAM JD & LI DM (1973). Cardiovascular and respiratory effects of cannabis in cat and rat. *Br. J. Pharmacol.* 49:1-10
- GROTENHERMEN F (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* 42:327-360
- GUO J & IKEDA SR (2004). Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB₁ cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol. Pharmacol.* 65:665-674
- HALL W & SOLOWIJ N (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352:1611-1616
- HAMPSON RE & DEADWYLER SA (1999). Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci.* 65:715-723
- HANUS L, ABU-LAFI S, FRIDE E, BREUER A, VOGEL Z, SHALEV DE, KUSTANOVICH I & MECHOULAM R (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3662-3665
- HAYES K, YARDLEY CP & WEAVER LC (1991). Evidence for descending tonic inhibition specifically affecting sympathetic pathways to the kidney in rats. *J. Physiol.* 434:295-306
- HAYWOOD JR, SHAFFER RA, FASTENOW C, FINK GD & BRODY MJ (1981). Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am. J. Physiol.* 241:H273-278
- HENRY DJ & CHAVKIN C (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* 186:91-94
- HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR & RICE KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:1932-1936

- HERKENHAM M, LYNN AB, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR & RICE KC (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11:563-583
- HILLARD CJ (2000). Endocannabinoids and vascular function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:27-32
- HOLLISTER LE (1974). Structure-activity relationships in man of cannabis constituents, and homologs and metabolites of delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology* 11:3-11
- HOWLETT AC, QUALY JM & KHACHATRIAN LL (1986). Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 29:307-313
- HOWLETT AC (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:607-634
- HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI, CABRAL G, CASELLAS P, DEVANE WA, FELDER CC, HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, MECHOULAM R & PERTWEE RG (2002). Classification of cannabinoid receptors. International Union of Pharmacology. XXVII. *Pharmacol. Rev.* 54:161-202
- HUESTIS MA, SAMPSON AH, HOLICKY BJ, HENNINGFIELD JE & CONE EJ (1992). Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52:31-41
- HUESTIS MA, GORELICK DA, HEISHMAN SJ, PRESTON KL, NELSON RA, MOOLCHAN ET & FRANK RA (2001). Blockade of effects of smoked marijuana by the CB₁-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch. Gen. Psychiatry* 58:322-328
- ISHAC EJ, JIANG L, LAKE KD, VARGA K, ABOOD ME & KUNOS G (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB₁ receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* 118:2023-2028
- IZZO AA, MASCOLO N, BORRELLI F & CAPASSO F (1998). Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB₁ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 124:1363-1368
- JONES RT (2002). Cardiovascular system effects of marijuana. *J. Clin. Pharmacol.* 42:58S-63S
- KALANT H (2001). Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res. Manag.* 6:80-91
- KATHMANN M, SCHULTHEISS T, FLAU K, REDMER A, REGGIO PH, SELTZMAN HH & SCHLICKER E (2004). SR141716 increases but VCHSR does not affect transmitter release in guinea-pig hippocampus. *2004 Symposium on the Cannabinoids*, International Cannabinoid Research Society, Burlington, Vermont, P156

- KIM J, ISOKAWA M, LEDENT C & ALGER BE (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22:10182-10191
- KLEIBER D & KOVAR KA (1998). Auswirkungen des Cannabiskonsums: eine Expertise zu pharmakologischen und psychosozialen Konsequenzen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.*
- KULKARNI-NARLA A & BROWN DR (2000). Localization of CB₁-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res.* 302:73-80
- KUMAR RN, CHAMBERS WA & PERTWEE RG (2001). Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia* 56:1059-1068
- KUNOS G, JARAI Z, VARGA K, LIU J, WANG L & WAGNER JA (2000). Cardiovascular effects of endocannabinoids--the plot thickens. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 61:71-84
- LAKE KD, COMPTON DR, VARGA K, MARTIN BR & KUNOS G (1997). Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB₁-like cannabinoid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:1030-1037
- LAY L, ANGUS JA & WRIGHT CE (2000). Pharmacological characterisation of cannabinoid CB₁ receptors in the rat and mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 391:151-161
- LE FUR G (2004). Pharmacology of cannabinoid receptor antagonists – possible therapeutic applications. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 18 (suppl 1):9
- LEVENES C, DANIEL H, SOUBRIE P & CREPEL F (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond)* 510:867-879
- LI J, KAMINSKI NE & WANG DH (2003). Anandamide-induced depressor effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41:757-762
- LICHTMAN AH, SHEIKH SM, LOH HH & MARTIN BR (2001). Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1007-1014
- MACKIE K & HILLE B (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:3825-3829
- MACKIE K, LAI Y, WESTENBROEK R & MITCHELL R (1995). Cannabinoids Activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15:6552-6561

- MACLENNAN SJ, REYNEN PH, KWAN J & BONHAUS DW (1998). Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 124:619-622
- MAEJIMA T, HASHIMOTO K, YOSHIDA T, AIBA A & KANO M (2001). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31:463-475
- MAILLEUX P & VANDERHAEGHEN JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668
- MALINOWSKA B, GODLEWSKI G, BUCHER B & SCHLICKER E (1997). Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:197-202
- MALINOWSKA B, KWOLEK G & GÖTHERT M (2001a). Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB₁ receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364:562-569
- MALINOWSKA B, PISZCZ J, KONECZNY B, HRYNIEWICZ A & SCHLICKER E (2001b). Modulation of the cardiac autonomic transmission of pithed rats by presynaptic opioid OP₄ and cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364:233-241
- MALIT LA, JOHNSTONE RE, BOURKE DI, KULP RA, KLEIN V & SMITH TC (1975). Intravenous delta9-Tetrahydrocannabinol: Effects of ventilatory control and cardiovascular dynamics. *Anesthesiology* 42:666-673
- MATHEW RJ, WILSON WH, HUMPHREYS DF, LOWE JV & WIETHE KE (1992). Regional cerebral blood flow after marijuana smoking. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12:750-758
- MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC & BONNER TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564
- MATSUDA LA, BONNER TI & LOLAIT SJ (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327:535-550
- MECHOULAM R (1973). In: Mechoulam R (ed) Marijuana. Chemistry, pharmacology, metabolism and clinical effects. Academic Press, New York, p 29
- MECHOULAM R, FRIDE E, BEN-SHABAT S, MEIRI U & HOROWITZ M (1998). Carbachol, an acetylcholine receptor agonist, enhances production in rat aorta of 2-arachidonoyl glycerol, a hypotensive endocannabinoid. *Eur. J. Pharmacol.* 362:R1-R3

- MOLDERINGS GJ, LIKUNGU J & GÖTHERT M (1999). Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360:157-164
- MOSS IR & FRIEDMAN E (1976). Delta9-tetrahydrocannabinol: depression of ventilatory regulation; other respiratory and cardiovascular effects. *Life Sci.* 19:99-104
- MUNRO S, THOMAS KL & ABU-SHAAR M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65
- NAVARRO M, CARRERA MR, FRATTA W, VALVERDE O, COSSU G, FATTORE L, CHOWEN JA, GOMEZ R, DEL ARCO I, VILLANUA MA, MALDONADO R, KOOB GF & DE FONSECA FR (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *J. Neurosci.* 21:5344-5350
- NIEDERHOFFER N & SZABO B (1999). Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *Br. J. Pharmacol.* 126:457-466
- NIEDERHOFFER N & SZABO B (2000). Cannabinoids cause central sympathoexcitation and bradycardia in rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:707-713
- NIEDERHOFFER N, HANSEN HH, FERNANDEZ-RUIZ JJ & SZABO B (2001). Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. *Br. J. Pharmacol.* 134:1319-1327
- NIEDERHOFFER N, SCHMID K & SZABO B (2003). The peripheral sympathetic nervous system is the major target of cannabinoids in eliciting cardiovascular depression. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367:434-443
- ONG WY & MACKIE K (1999). A light and electron microscopic study of the CB₁ cannabinoid receptor in the primate spinal cord. *J. Neurocytol.* 28:39-45
- PADLEY J.R, LI Q, PILOWSKY PM & GOODCHILD AK (2003). Cannabinoid receptor activation in the rostral ventrolateral medulla oblongata evokes cardiorespiratory effects in anaesthetised rats. *Br. J. Pharmacol.* 140:384-394
- PERTWEE RG (1988). The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 36:189-261
- PERTWEE RG, STEVENSON LA, ELRICK DB, MECHOULAM R & CORBETT AD (1992). Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol.* 105:980-984
- PERTWEE RG, JOE-ADIGWE G & HAWKSWORTH GM (1996). Further evidence for the presence of cannabinoid CB₁ receptors in mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 296:169-172

- PERTWEE RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* 74:129-180
- PERTWEE RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6:635-664
- 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
- RADEMACHER DJ, PATEL S, HOPP FA, DEAN C, HILLARD CJ & SEAGARD JL (2003). Microinjection of a cannabinoid receptor antagonist into the NTS increases baroreflex duration in dogs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284:H1570-H1576
- RALEVIC V & KENDALL DA (2002). Cannabinoids inhibit pre- and postjunctionally sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 444:171-181
- RALEVIC V, KENDALL DA, RANDALL MD & SMART D (2002). Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: roles in regulation of cardiovascular function. *Life Sci.* 71:2577-2594
- RANDALL MD, KENDALL DA & O'SULLIVAN S (2004). The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.* 142:20-26
- RINALDI-CARMONA M, BARTH F, HEAULME M, SHIRE D, CALANDRA B, CONGY C, MARTINEZ S, MARUANI J, NELIAT G, CAPUT D, FERRARA P, SOUBRIÉ P, BRELIÈRE JC & LE FUR G (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350:240-244
- ROMERO J, BERRENDERO F, GARCIA-GIL L, DE LA CRUZ P, RAMOS JA & FERNANDEZ-RUIZ JJ (1998). Loss of cannabinoid receptor binding and messenger RNA levels and cannabinoid agonist-stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(thio)-triphosphate binding in the basal ganglia of aged rats. *Neuroscience* 84:1075-1083
- SCHLICKER E & KATHMANN M (2001). Modulation of transmitter release via pre-synaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:565-572
- SCHLICKER E, REDMER A, WERNER A & KATHMANN M (2003). Lack of CB₁ receptors increases noradrenaline release in vas deferens without affecting atrial noradrenaline release or cortical acetylcholine release. *Br. J. Pharmacol.* 140:323-328
- SCHMID K, NIEDERHOFFER N & SZABO B (2003). Analysis of the respiratory effects of cannabinoids in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368:301-308

- SCHMITZ JM, GRAHAM RM, SAGALOWSKY A & PETTINGER WA (1981). Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219:400-406
- SCHWEITZER P (2000). Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.* 20:51-58
- SEHIC E, RUAN Y & MALIK KU (1997). Mechanism of resistance to alpha-adrenergic receptor antagonists of renal nerve stimulation-induced vasoconstriction at low frequencies. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29:97-108
- SHIRE D, CARILLON C, KAGHAD M, CALANDRA B, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G, CAPUT D & FERRARA P (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 270:3726-3731
- SIEGLING A, HOFMANN HA, DENZER D, MAULER F & DE VRY J (2001). Cannabinoid CB₁ receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 415(1):R5-7
- SRIPAJOJTHIKOON W & WYSS JM (1987). Cells of origin of the sympathetic renal innervation in rat. *Am. J. Physiol.* 252:F957-63
- STARK P & DEWS PB (1980). Cannabinoids. II. Cardiovascular effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214:131-138
- STEFFENS M, SZABO B, KLAR M, ROMINGER A, ZENTNER J & FEUERSTEIN TJ (2003). Modulation of electrically evoked acetylcholine release through cannabinoid CB₁ receptors: evidence for an endocannabinoid tone in the human neocortex. *Neuroscience* 120:455-465
- SZABO B, FRITZ T & WEDZONY K (2001a). Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* 134:295-304
- SZABO B, NORDHEIM U & NIEDERHOFFER N (2001b). Effects of cannabinoids on sympathetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297:819-826
- SZABO B, THAN M, THORN D & WALLMICHATH I (2004). Analysis of the effects of cannabinoids on synaptic transmission between basket and Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:915-925
- SZABO B & SCHLICKER E (2005). Effects of cannabinoids on neurotransmission. In: Pertwee RG (Ed.) *Cannabinoids, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 168, pp 318–356, Springer, Berlin (im Druck)
- SZALLASI A & DI MARZO V (2000). New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* 23:491-497

- TANDA G, PONTIERI FE & DI CHIARA G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276:2048-2050
- TASHKIN DP, SHAPIRO BJ, LEE YE & HARPER CE (1976). Subacute effects of heavy marihuana smoking on pulmonary function in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 294:125-129
- TASHKIN DP, LEVISMAN JA, ABBASI AS, SHAPIRO BJ & ELLIS NM (1977). Short-term effects of smoked marihuana on left ventricular function in man. *Chest* 72:20-26
- TASHKIN DP, COULSON AH, CLARK VA, SIMMONS M, BOURQUE LB, DUANN S, SPIVEY GH & GONG H (1987). Respiratory symptoms and lung function in habitual heavy smokers of marijuana alone, smokers of marijuana and tobacco, smokers of tobacco alone, and nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:209-216
- TERRANOVA JP, STORME JJ, LAFON N, PERIO A, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G & SOUBRIE P (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB₁ cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology* 126:165-172
- TRENDELENBURG AU, COX SL, SCHEL B V, KLEBROFF W, KHAIRALLAH L & STARKE K (2000). Modulation of ³H-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and beta-adrenoceptors in mouse tissues. *Br. J. Pharmacol.* 130:321-330
- TSOU K, BROWN S, SANUDO-PENA MC, MACKIE K & WALKER JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411
- VALVERDE O, MALDONADO R, VALJENT E, ZIMMER AM & ZIMMER A (2000). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *J. Neurosci.* 20:9284-9289
- VARGA K, LAKE KD, HUANGFU D, GUYENET PG & KUNOS G (1996). Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension.* 28:682-686
- VARGA K, WAGNER JA, BRIDGEN DT & KUNOS G (1998). Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 12:1035-1044
- VIVIAN JA, KISHIOKA S, BUTELMAN ER, BROADBEAR J, LEE KO & WOODS JH (1998). Analgesic, respiratory and heart rate effects of cannabinoid and opioid agonists in rhesus monkeys: antagonist effects of SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:697-703

- VIZI ES, KATONA I & FREUND TF (2001). Evidence for presynaptic cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea pig lung. *Eur. J. Pharmacol.* 431:237-244
- VOLLMER RR, CAVERO I, ERTEL RJ, SOLOMON TA & BUCKLEY JP (1974). Role of the central autonomic nervous system in the hypotension and bradycardia induced by (-)-delta 9-trans-tetrahydrocannabinol. *J. Pharm. Pharmacol.* 26:186-192
- WAGNER JA, VARGA K, ELLIS EF, RZIGALINSKI BA, MARTIN BR & KUNOS G (1997). Activation of peripheral CB₁ cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 390:518-521
- WAGNER JA, VARGA K & KUNOS G (1998). Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J. Mol. Med.* 76:824-836
- WAGNER JA, HU K, BAUERSACHS J, KARCHER J, WIESLER M, GOPARAJU SK, KUNOS G & ERTL G (2001a). Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:2048-2054
- WAGNER JA, JARAI Z, BATKAI S & KUNOS G (2001b). Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 423:203-210
- WALLMICHATH I & SZABO B (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience* 113:671-682
- WALLMICHATH I & SZABO B (2004). Influence of exogenous and endogenous cannabinoids on synaptic transmission. *Recent Advances in Pharmacology of Cannabinoids* 2004:75-96
- WILSON RI & NICOLL RA (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592
- WILSON RI & NICOLL RA (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682
- WOLFF DW, GESEK FA & STRANDHOY JW (1987). In vivo assessment of rat renal alpha adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241:472-476
- WOLFF DW, COLINDRES RE & STRANDHOY JW (1989). Unmasking sensitive alpha 2-adrenoceptor-mediated renal vasoconstriction in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 257:F1132-1139
- XIE Q, ITOH M, MIYAMOTO K, LI L & TAKEUCHI Y (1999). Cardiac afferents to the nucleus of the tractus solitarius: A WGA-HRP study in the rat. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 5:370-375

- ZHANG J, HOFFERT C, VU HK, GROBLEWSKI T, AHMAD S & O'DONNELL D (2003). Induction of CB₂ receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur. J. Neurosci.* 17:2750-2754
- ZYGMUNT PM, PETERSSON J, ANDERSSON DA, CHUANG H, SORGARD M, DI MARZO V, JULIUS D & HOGESTATT ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457

Wissenschaftlicher Werdegang

Name: Torsten Pfitzer
Geburtsdatum: 12. April 1975
Geburtsort: Kirchheim/Teck
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1982 – 07/1986 Rauner-Grundschule Kirchheim/Teck
08/1986 – 06/1995 Schloss-Gymnasium Kirchheim/Teck
06/1995 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

10/1995 - 03/2000 Studium der Pharmazie an der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
03-04 und 07-08/1996 Famulatur in der Apotheke Schneider in
Kirchheim/Teck
09/1996 Praktikum an der Klinik für Tumorbologie der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
03/1998 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1998 – 01/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für
Pharmazeutische Chemie der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg im Breisgau
03/2000 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2000 – 09/2000 Praktikum in der Marien-Apotheke in Ravensburg
11/2000 – 05/2001 Praktikum im Medicines Information Centre und
Groote Schuur Hospital in Cape Town, RSA
06/2001 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
und Erteilung der Approbation als Apotheker
09/2001 – 01/2005 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
im Breisgau
Anfertigung einer Doktorarbeit mit dem Titel „Die
Wirkung von Cannabinoiden auf das Herz-
Kreislauf-System und die Atmung von Ratten“ am
Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg im Breisgau