

**DER EINFLUSS DES ENDOCANNABINOIDEN SYSTEMS
AUF DEN MAC-WERT VON ISOFLURAN -
UNTERSUCHUNGEN IN EINEM TRANSGENEN CB1
DEFIZIENTEN MAUSMODELL**

KATINKA SCHELLENBERGER

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(Direktor : Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. Phys. E. Kochs)
und aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen
Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung
des veterinärwissenschaftlichen Departements der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. vet. M. Erhard)

**DER EINFLUSS DES ENDOCANNABINOIDEN SYSTEMS AUF DEN MAC-WERT
VON ISOFLURAN -
UNTERSUCHUNGEN IN EINEM TRANSGENEN CB1 DEFIZIENTEN
MAUSMODELL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katinka Schellenberger
aus
Rheinzabern

München 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Erhard

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 13.02.2010

Meinen Eltern

Mehr als die Vergangenheit interessiert mich die Zukunft, denn in ihr gedenke ich zu leben
Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung.....</u>	<u>1</u>
<u>2. Schrifttum.....</u>	<u>3</u>
<u>1.1 Neurophysiologische Grundlagen.....</u>	<u>3</u>
<u>2.1.1. Das glutamaterge Neurotransmittersystem.....</u>	<u>3</u>
<u>2.1.2. Das GABAerge Neurotransmittersystem.....</u>	<u>6</u>
<u>1.2 Das Endocannabinoid- System.....</u>	<u>8</u>
<u>1.2.1 Cannabinoid-Rezeptoren.....</u>	<u>9</u>
<u>1.2.2 Endocannabinoide.....</u>	<u>12</u>
<u>1.2.3 Das Endocannabinoidsystem, seine Aufgaben und therapeutische Ansätze.....</u>	<u>16</u>
<u>1.2.4 Das Tiermodell.....</u>	<u>21</u>
<u>1.3 Isofluran.....</u>	<u>23</u>
<u>1.3.1 Die anästhetische Wirksamkeit.....</u>	<u>23</u>
<u>1.3.2 Wirkung von Isofluran auf die Rezeptoren im ZNS.....</u>	<u>24</u>
<u>1.3.3 Wirkung von Isofluran auf das kardiovaskuläre System und die Atmung.....</u>	<u>25</u>
<u>1.3.4 Minimal Alveolar Concentration.....</u>	<u>26</u>
<u>3. Eigene Untersuchungen.....</u>	<u>29</u>
<u>1.4 Zielvorstellung.....</u>	<u>29</u>
<u>1.5 Material und Methodik.....</u>	<u>29</u>
<u>1.5.1 Versuchstiere.....</u>	<u>29</u>
<u>1.5.2 Versuchsplan.....</u>	<u>30</u>
<u>1.5.3 Statistische Bewertung der Befunde.....</u>	<u>34</u>
<u>1.6 Ergebnisse.....</u>	<u>35</u>
<u>1.7 Körpergewicht, Atemfrequenz und Herzfrequenz.....</u>	<u>35</u>
<u>1.7.1 Körpergewicht.....</u>	<u>36</u>
<u>1.7.2 Atemfrequenz.....</u>	<u>38</u>
<u>1.7.3 Herzfrequenz.....</u>	<u>40</u>
<u>1.8 MAC-Wert.....</u>	<u>42</u>
<u>4. Diskussion.....</u>	<u>44</u>
<u>1.9 Diskussion der Methoden.....</u>	<u>44</u>
<u>1.9.1 MAC-Wert Bestimmung.....</u>	<u>44</u>
<u>1.9.2 Das Cannabis-Mausmodell.....</u>	<u>48</u>
<u>1.10 Diskussion der Ergebnisse.....</u>	<u>51</u>
<u>1.10.1 Herzfrequenz.....</u>	<u>51</u>
<u>1.10.2 Atemfrequenz.....</u>	<u>52</u>
<u>1.10.3 Körpergewicht.....</u>	<u>52</u>
<u>1.10.4 MAC-Wert.....</u>	<u>53</u>
<u>1.11 Abschließende Betrachtung und Ausblick.....</u>	<u>56</u>
<u>5. Zusammenfassung.....</u>	<u>58</u>
<u>6. Summary.....</u>	<u>60</u>
<u>7. Literaturverzeichnis.....</u>	<u>62</u>
<u>8. Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>78</u>
<u>9. Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>80</u>
<u>10. Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>81</u>
<u>11. Danksagung.....</u>	<u>82</u>

1. Einleitung

Die medizinische Bedeutung der Cannabis Pflanze, *Cannabis sativa*, ist schon sehr lange bekannt. In den arabischen Gebieten hat ihr Einsatz gegen die unterschiedlichsten Leiden eine lange Tradition. Im europäischen Raum begann der Siegeszug von Cannabis als Heilmittel gegen Schmerzen, Asthma, Angstzustände und Entzündungen im Mittelalter und erreichte seinen Höhepunkt im 19. Jahrhundert. Anfang des 20. Jahrhunderts führte die Forschung nach alternativen Mitteln, aber auch soziopolitische Gründe, dazu, dass die Pflanze im medizinischen Bereich kaum mehr Beachtung fand (BAKER et al., 2003).

Erst in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts lenkte die Forschung ihr Augenmerk wieder auf die Wirkung dieser Pflanze (MECHOULAM, 1970). Dies führte zur Entdeckung eines endogenen Cannabinoidsystems, das an einer Vielzahl physiologischer Abläufe beteiligt zu sein scheint (WILSON und NICOLL, 2002). Der Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) spielt dabei hauptsächlich bei Abläufen im Gehirn eine Rolle, während der Cannabinoidrezeptor 2 (CB2) vorwiegend in der Peripherie und im Immunsystem regulierend einzugreifen scheint.

Der CB1-Rezeptor wird in den meisten Arealen des Gehirns in hoher Anzahl exprimiert (HERKENHAM et al., 1990). Er reguliert hier die Ausschüttung der Neurotransmitter. Sowohl das exzitatorisch wirksame Glutamat, als auch das hemmende Neurotransmittersystem der γ -Aminobuttersäure (GABA) werden von den Endocannabinoiden und ihren Rezeptoren beeinflusst (WILSON und NICOLL, 2002). Viele andere Pharmaka und speziell die Anästhetika greifen in dieses Neurotransmittersystem ein und entfalten so ihre Wirkung. Dazu gehört auch das Isofluran, dessen Hauptangriffspunkt die Regulierung von GABA und Glutamat darstellt (NISHIKAWA und MACIVER, 2000; 2001). Isofluran ist eines der wichtigsten Inhalationsanästhetika und wird heute bei vielen langandauernden Eingriffen angewandt.

In bisherigen Studien konnte lediglich dargestellt werden, dass eine exogen zugeführte Dosis Δ^9 -Tetrahydrocannabinol die minimale alveolare Konzentration (MAC) verschiedener Inhalationsanästhetika beeinflusst (VITEZ et al., 1973; STOELTING et al., 1973)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine mögliche Interaktion des endocannabinoiden Systems mit Isofluran und eine daraus resultierende Beeinflussung der Narkose zu

untersuchen. Der MAC-Wert gilt als Maßeinheit für die Wirksamkeit eines Inhalationsanästhetikums und soll hier mit Hilfe zweier transgener Mausmodelle evaluiert werden. Die $CB^{-/-}$ -Mäuse exprimieren auf keinem Neuron den CB1-Rezeptor, während bei den $CB^{ffCaMKII\alpha Cre}$ Mäusen nur in den Hauptneuronen des basalen Vorderhirns kein CB1-Rezeptor ausgebildet ist. Die Expressierung des Rezeptors in den corticalen GABAergen Interneuronen bleibt hier jedoch erhalten (MARSICANO et al, 2003). Durch die Verwendung beider Tiergruppen könnten hinreichend genaue Aussagen über eine gegenseitige Beeinflussung von Isofluran und Endocannabinoidsystem getroffen werden.

2. Schrifttum

1.1 Neurophysiologische Grundlagen

Die Aufgaben des Gehirns sind vielfältig und erstrecken sich von seiner Beteiligung an Lern- und Gedächtnisvorgängen über die Kontrolle motorischer Abläufe bis hin zu Schmerzverarbeitung und der Regulierung kardiovaskulärer Effekte. All diese Funktionen werden über Aktionspotentiale gesteuert, innerhalb eines Neurons fortgeleitet und von elektrischen oder (häufiger) chemischen Synapsen auf das nächste Neuron übermittelt. Die Neuronen bilden ganze Netzwerke, die untereinander verbunden sind. So können Informationen weitergeleitet und verarbeitet werden (SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2007).

Die chemischen Synapsen funktionieren mit Hilfe von Neurotransmittern, welche in der Präsynapse in Vesikeln gespeichert werden. Sie gelangen in den synaptischen Spalt sobald durch eine Depolarisation der Nervenendigung spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden, die Calciumkonzentration intrazellulär ansteigt und die Vesikelmembran mit der Membran der Präsynapse verschmilzt. An der postsynaptischen Membran befinden sich spezifische Rezeptoren, an die die Transmitter nun binden können. Dadurch werden an die Rezeptoren gekoppelte Ionenkanäle geöffnet und es kommt zu einer Veränderung des postsynaptischen Membranpotentials. Handelt es sich um einen erregenden (exzitatorischen) Neurotransmitter, so bewirkt ein Kationeneinstrom ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP), was bei einer Überschreitung eines Schwellenwertes des Membranpotentials zur Bildung eines weiteren Aktionspotentials führt. Inhibitorische Neurotransmitter hingegen lösen einen Chlorideinstrom in die Zelle aus. Es entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), was der Bildung eines Aktionspotentials entgegenwirkt (KLINKE und SILBERNAGL, 1996).

2.1.1. Das glutamaterge Neurotransmittersystem

Der wichtigste erregende Neurotransmitter ist das L-Glutamat. Die Glutamatrezeptoren sind durch ihren Aufbau und ihre Funktionalität in zwei Gruppen zu unterteilen. Die ionotropen und die metabotropen Glutamatrezeptoren.

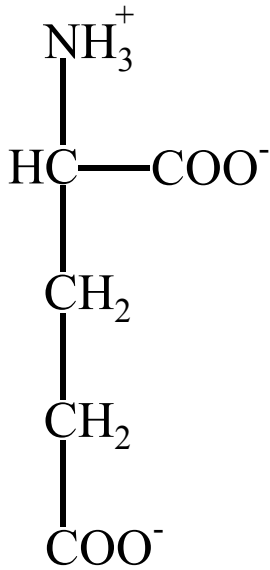


Abbildung 1: Strukturformel von Glutamat (HOFMANN, 2006)

2.1.1.1. Die ionotropen Glutamatrezeptoren

Die ionotropen Glutamatrezeptoren bestehen aus membranständigen Proteinuntereinheiten, die extrazelluläre Bindungsdomänen für Glutamat besitzen und einen Kationenkanal bilden (HOLLMANN et al., 1994). Eine Bindung des Glutamat an diese Rezeptoren zieht die Öffnung des Ionenkanals nach sich, was zu einer direkten Änderung des Membranpotentials führt und so die schnelle Komponente der postsynaptischen Potentiale (EPSPs) vermittelt. Zu den ionotropen Rezeptoren gehören der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor), der Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor) und der Kainat-Rezeptor. Die beiden Letzteren zählen zu den Non-NMDA-Rezeptoren (MORI und MISHINA, 1995).

N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

NMDA-Rezeptoren bestehen aus einer tetramerschen oder pentamerschen Struktur, die sich aus drei Klassen von Untereinheiten zusammensetzt: der NR1-Subtyp (NR1A-NR1H Varianten bekannt), der NR2-Subtyp (NR2A-NR2D) und der NR3-Subtyp (A und B). Der

Rezeptor selbst tritt im gesamten Gehirn auf, während sich regionenspezifisch die Varianten der Subtypen unterscheiden können. So lassen sich NR2C und D nur selten als Untereinheit des Rezeptors ausmachen, während NR2A am häufigsten vertreten ist. (DINGLELINE et al., 1999). Der Rezeptorkanal ist durchlässig für K^+ , Na^+ und vor allem Ca^{2+} Ionen (MCBAIN und MAYER, 1994). Die Öffnung des NMDA-Rezeptorkanals ist jedoch nicht nur liganden- sondern auch spannungsabhängig. So löst sich die natürliche Blockade von Mg^{2+} erst bei einem Membranpotential von unter $-50mV$, was eine vorherige Depolarisierung der Non-NMDA-Rezeptoren voraussetzt. Zusammen mit der Bindung eines Liganden kommt es dann erst zur Öffnung des Kationenkanals. Somit zählt der NMDA-Rezeptor zur mittelschnellen Komponente des postsynaptischen Potentials (HOLLMANN et al., 1994; DANYSZ und PARSONS, 1998).

Alpha-Amino-Hydroxy-5-Methyl-4-Propionsäure-Rezeptor

Der AMPA-Rezeptor setzt sich entweder aus vier oder fünf Untereinheiten zusammen. Bisher sind vier verschiedene Untereinheiten bekannt (GluR1-GluR4), die unterschiedlich kombiniert sein können. Der Anteil der GluR2-Untereinheit im Gesamtkomplex des Rezeptors bestimmt hierbei die Permeabilität des Kanals für Ca^{2+} . Während GluR1, GluR3 und GluR4 immer durchlässig für Ca^{2+} -Ionen sind, gilt dies nur in Ausnahmefällen für die GluR2-Einheit. Alle sind jedoch durchlässig für K^+ - und Na^+ -Ionen. Weiterhin kommen diese Untereinheiten in zwei Formen vor: die Flip-Variante zeichnet sich hierbei vor allem durch einen langsameren, desensitisierenden Kationenstrom gegenüber der Flop-Variante aus (HOLLMANN et al., 1994; DINGLELINE et al., 1999; SOMMER et al., 1990).

Kainat-Rezeptor

Der Kainat-Rezeptor setzt sich aus den Untereinheiten GluR5-7, KA1 und KA2 zusammen. Ähnlich wie bei dem AMPA-Rezeptor vermitteln die Untereinheiten, je nach Zusammensetzung, die Funktionalität des Rezeptors (DINGLELINE et al., 1999)

2.1.1.2. Die metabotropen Glutamatrezeptoren

Die metabotropen Glutamatrezeptoren sind funktional Homodimere, die man in drei verschiedene Gruppen einteilen kann (KUNISHIMA et al., 2000). Die metabotropen Rezeptoren agieren mit Hilfe einer intrazellulären Signalkaskade, also einem Second-Messenger-Weg und vertreten somit die langsame Komponente der postsynaptischen

Potentiale. Die drei Gruppen der metabotropen Glutamatrezeptoren besitzen alle eine Glutamatbindungsstelle, unterscheiden sich aber bei ihren intrazellulären Signalwegen und pharmakologischen Eigenschaften. Zur Gruppe 1 gehören mGluR1 und mGluR5. Sie sind positiv an Phospholipase C gekoppelt, welche dann die weitere Kaskade aktiviert. Im Gegensatz dazu sind Gruppe 2 (mGluR2, mGluR3) und Gruppe 3 (mGluR4, mGluR6-8) negativ gekoppelt zur Adenylatzyklase (CONN und PIN, 1997).

2.1.2. Das GABAerge Neurotransmittersystem

Der wichtigste hemmende Neurotransmitter ist die γ -Aminobuttersäure (GABA). Die ionotrop wirkenden GABA-Rezeptoren werden durch die GABA_A-Rezeptoren vertreten, während die GABA_B-Rezeptoren zu den metabotropen Rezeptoren zählen.

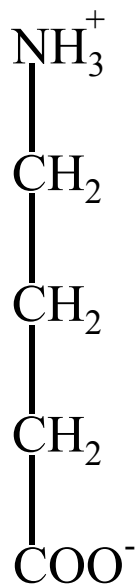


Abbildung 2: Strukturformel von γ -Aminobuttersäure (GABA) (HOFMANN, 2006)

2.1.2.1. Die ionotropen GABA_A-Rezeptoren

Bei dem GABA_A-Rezeptor handelt es sich um einen Rezeptor mit pentamerer Struktur. Er setzt sich meistens aus zwei α -Einheiten, zwei β -Einheiten und einer γ -Einheit zusammen. Diese Kombination ist auch am häufigsten im Gehirn vertreten. Mittlerweile sind aber mehr

als 20 Varianten dieser Untereinheiten bekannt, aus denen sich der Rezeptor zusammensetzen kann (SIEGHART et al., 1999). Nach einer Aktivierung des Rezeptors durch GABA (an der α - oder β - Untereinheit) kommt es über eine Konformationsänderung zur Öffnung eines Ionenkanals. Der daraus resultierende Einstrom von Chloridionen in die Synapse zieht die schnelle Variante des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) nach sich (MOHLER et al., 1996).

2.1.2.2. Die metabotropen GABA_B-Rezeptoren

Die G-proteingekoppelten GABA_B-Rezeptoren sind verantwortlich für die langsamere Komponente des inhibitorischen postsynaptischen Potentials über einen Second-Messenger-Weg. Strukturell handelt es sich um ein Heterodimer. Sie sind hauptsächlich prä- aber auch postsynaptisch lokalisiert. Eine Aktivierung des Rezeptors führt intrazellulär über die Modulation der Adenylatzyklase hin zum Verschließen der Calciumkanäle und einer Aktivierung der Kaliumkanäle (KUNER et al, 1999; KAUPMANN et al.,1998)

1.2 Das Endocannabinoid- System

Die Pflanze *Cannabis sativa* wurde jahrtausendlang sowohl als Nutzpflanze, als auch als Heilmittel gegen verschiedenste Leiden eingesetzt und man versuchte schon früh die Wirkstoffe des Nesselgewächses zu analysieren. Aber erst 1964 gelang der Durchbruch mit der Entdeckung und der Strukturanalyse von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (MECHOULAM, 1970).

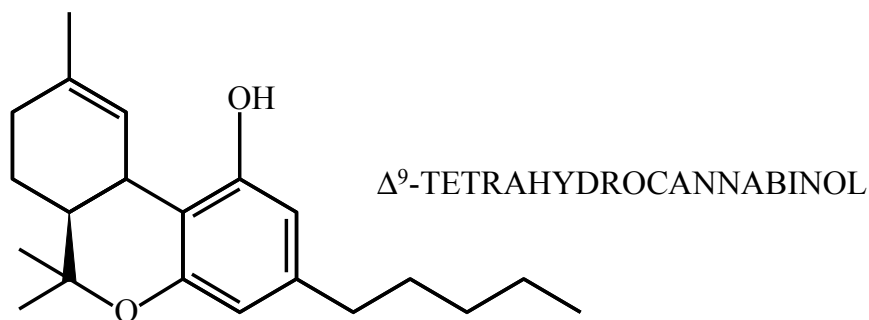


Abbildung 3: Strukturformel von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (HOWLETT et al., 2002)

In den kommenden Jahren erfolgte die Erforschung weiterer wirksamer Bestandteile der *Cannabis-sativa*-Pflanze, die man natürliche oder Phytocannabinoide nannte. Dazu gehören neben dem Δ^9 -THC auch Cannabidiol, Cannabinol und noch einige mehr. Alle bisher entdeckten Cannabinoide besitzen eine trizyklische Struktur, welche aus einem Phenolring mit einer Pentylgruppe, einem zentralen Pyranring und einem mehrfach ungesättigten Cyclohexylring besteht (MECHOULAM, 1970). Dieses Wissen diente als Grundlage zur Herstellung synthetischer Analoga, von denen heute einige in der experimentellen Erforschung Cannabinoidrezeptorvermittelter Wirkungen eine wichtige Rolle spielen.

1986 fand ein Forscherteam den ersten Hinweis auf eine rezeptorvermittelte Wirkungsweise der Cannabinoide (HOWLETT et al., 1986). Vier Jahre später konnte dann durch Klonierung der erste Cannabinoidrezeptor identifiziert werden (MATSUDA et al., 1990). Der Nachweis dieser Rezeptoren zog allerdings auch den Verdacht auf körpereigene Liganden, sogenannte Endocannabinoide, nach sich. 1992 wurde Anandamid als erstes einer Reihe von endogenen Cannabinoiden isoliert (DEVANE et al., 1992).

1.2.1 Cannabinoid-Rezeptoren

In der Forschung über das endocannabinoide System sind momentan zwei Rezeptoren, Cannabinoid (CB)-Rezeptor 1 und 2, eindeutig identifiziert. Es handelt sich um G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Sie besitzen sieben helikale hydrophobe Segmente, welche transmembran lokalisiert sind. Die Strukturähnlichkeit der CB1- und CB2-Rezeptoren beträgt innerhalb dieser transmembranären Anteile 68 % und insgesamt nur 44 % (MUNRO et al., 1993). Betrachtet man allerdings beispielsweise den CB1-Rezeptor unterschiedlicher Spezies können hier weitgehende Homologien festgestellt werden. So ähnelt sich der CB1-Rezeptor des Menschen und der Ratte insgesamt zu 97,3 % und im transmembranären Bereich sogar zu 100 % (GERARD et al., 1991).

Während der CB1-Rezeptor bisher hauptsächlich im zentralen Nervensystems (ZNS) und an den peripheren Nervenendigungen nachgewiesen werden konnte, findet sich der CB2-Rezeptor vornehmlich in Organen und Zellen, die der Regulierung des Immunsystems dienen. Hierzu zählen bisher der Thymus, die Milz und die Tonsillen, sowie auf zellulärer Ebene hauptsächlich B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen und Makrophagen. Bislang ist die Aufgabe des CB2-Rezeptors daher in der Immunmodulation und dabei vor allem in einer inhibitorischen Funktion zu sehen (GERARD et al., 1991; WALTER und STELLA, 2004). Allerdings befindet sich die Forschung hier noch am Anfang.

Neben den CB-Rezeptoren scheint der intrazellulär gelegene Vanilloid-Rezeptor (transient receptor potential vanilloid receptor 1= TRPV-1-Rezeptor) ebenfalls eine Rolle im Endocannabinoidsystem zu spielen. Er wird durch Capsaicin und Resiniferatoxin aktiviert, aber auch Anandamid, das wichtigste Endocannabinoid, scheint in Geweben mit hoher Rezeptordichte als reiner beziehungsweise partieller Agonist zu fungieren (ZYGMENT et al., 1999; ROSS, 2003).

Einige Forschungsergebnisse deuten zudem auf einen weiteren endocannabinoidsensiblen Rezeptor hin. So wies ein Forscherteam 2001 nach, dass im Hippocampus der Endocannabinoidagonist WIN55212-2 auch bei CB1-rezeptordefizienten Mäusen eine inhibitorische Wirkung auf das glutamaterge System besitzt. Auf das GABAerge System dieser Tiere hat es jedoch keinen Einfluss (HAJOS et al., 2001).

Eine andere Veröffentlichung lässt vermuten, dass einige kardiovaskuläre Effekte durch einen neuen Cannabinoidrezeptor ausgelöst werden könnten (JARAI et al., 1999). Bisher konnte allerdings keiner dieser möglichen neuen Cannabinoidrezeptoren isoliert werden.

1.2.1.1 Der CB1-Rezeptor

1990 selektierte man eine zerebrale mRNA der Ratte, erkannte diese als Transkript des CB1-Rezeptors und bestimmte seine Lokalisation im Gehirn (MATSUDA et al., 1990). HERKENHAM und Mitarbeiter (1990) nutzten dazu die quantitative invasive Autoradiographie mit dem Radioliganden ^3H -CP 55940. Die größte Dichte des CB1-Rezeptors im ZNS wurde in den Basalganglien, dem Cerebellum und dem Hippocampus gefunden. Aber auch im restlichen Vorderhirn ist der Rezeptor nachweisbar (HERKENHAM et al., 1990). Mittlerweile konnte der Rezeptor auch in weiteren Regionen des ZNS, sowie auf zentralen und peripheren Nervenendigungen (ONG und MACKIE, 1999; PERTWEE, 1997) nachgewiesen werden. Hier modulieren sie sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Neurotransmitterfreisetzung (KIM und THAYER, 2000).

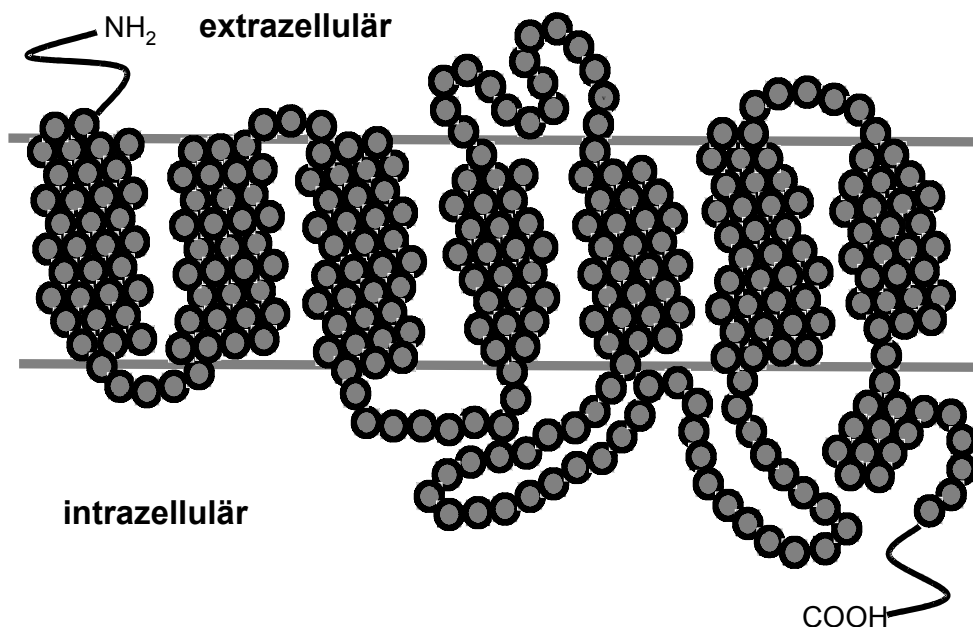


Abbildung 4: Schematische Darstellung des CB1-Rezeptors

1.2.1.1.1 Signaltransduktion

Der CB1-Rezeptor ist im Gehirn fast ausschließlich präsynaptisch lokalisiert. Sein Ligand hingegen wird meist postsynaptisch gebildet und gelangt über den synaptischen Spalt retrograd zum präsynaptisch lokalisierten Rezeptor. Er funktioniert also als retrograder Transmitter. Durch die Bindung eines Liganden an den CB1-Rezeptor werden $G_{i/o}$ -Proteine aktiviert, was zu einer Reihe intrazellulärer Veränderungen führt. Durch die Hemmung der Adenylatzyklase (AC) wird die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) reduziert (DEVANE et al., 1988, HOWLETT et al., 1990). Dies führt zu einer Abnahme der Proteinkinase A PKA-abhängigen Phosphorylierungsprozesse der Zelle. Desweiteren wird durch die Aktivierung des CB1-Rezeptors eine Veränderung der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle induziert. Der Calciumeinstrom an N- und P/Q-Kanälen wird vermindert (MACKIE und HILLE, 1992; MACKIE et al., 1995; TWITCHELL et al., 1997), während eine positive Wirkung auf K_{ir} und K_A - Kanäle nachgewiesen werden konnte (DEADWYLER et al., 1993; MACKIE et al., 1995).

CB1-Rezeptoren können außerdem Arachidonsäure mobilisieren sowie 5-HT₃-Rezeptor-Ionenkanäle schließen (PERTWEE, 1997). Zudem aktivieren sie unter bestimmten Bedingungen die Adenylatzyklase über G_s -Proteine (GLASS und FELDER, 1997; CALANDRA et al., 1999). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass CB1-Rezeptoren, die in glatten Muskelzellen von Hirnarterien der Katze gefunden wurden, dort negativ auf Dihydropyridin-sensitive L-Typ-Calciumkanäle einwirken (GEBREMEDHIN et al., 1999). SCHWEITZER et al. (2000) kamen darüberhinaus zu dem Schluss, dass einige CB1-Rezeptoren negativ an M-Typ-Kaliumkanäle gekoppelt sind.

Durch all diese CB1-rezeptorinduzierten Veränderungen der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle kommt es zu einer Hemmung der Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt. So senkt zum Beispiel die Senkung der Calciumleitfähigkeit die Transmitterfreisetzung (GUO und IKEDA, 2004), während die Aktivierung einwärtsgerichteter Kaliumkanäle das Membranpotential senken und so die Generation und Fortleitung von Aktionspotentialen unterdrücken kann (MACKIE et al., 1995)

1.2.2 Endocannabinoide

Mit der Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren stellte sich die Frage nach endogenen Liganden, die diese Rezeptoren aktivieren. 1992 wies ein Forscherteam eine Substanz im Schweinehirn nach, das selektiv an diese Rezeptoren bindet. Man nannte sie Anandamid, nach dem Wort Glückseligkeit aus dem Sanskrit. Drei Jahre später isolierte man 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) im Hundedarm. Neben Anandamid und 2-AG konnten bisher unter anderem Noladin und Virodhamin (O-Arachidonylethanolamin) zu dieser Gruppe ergänzt werden (HANUS et al., 2001; PORTER et al., 2002). Vor allem dem Anandamid und dem 2-AG galt bislang die Aufmerksamkeit der Wissenschaft, weswegen ihre Bildung und Abgabe im Körper schon gut erforscht ist.

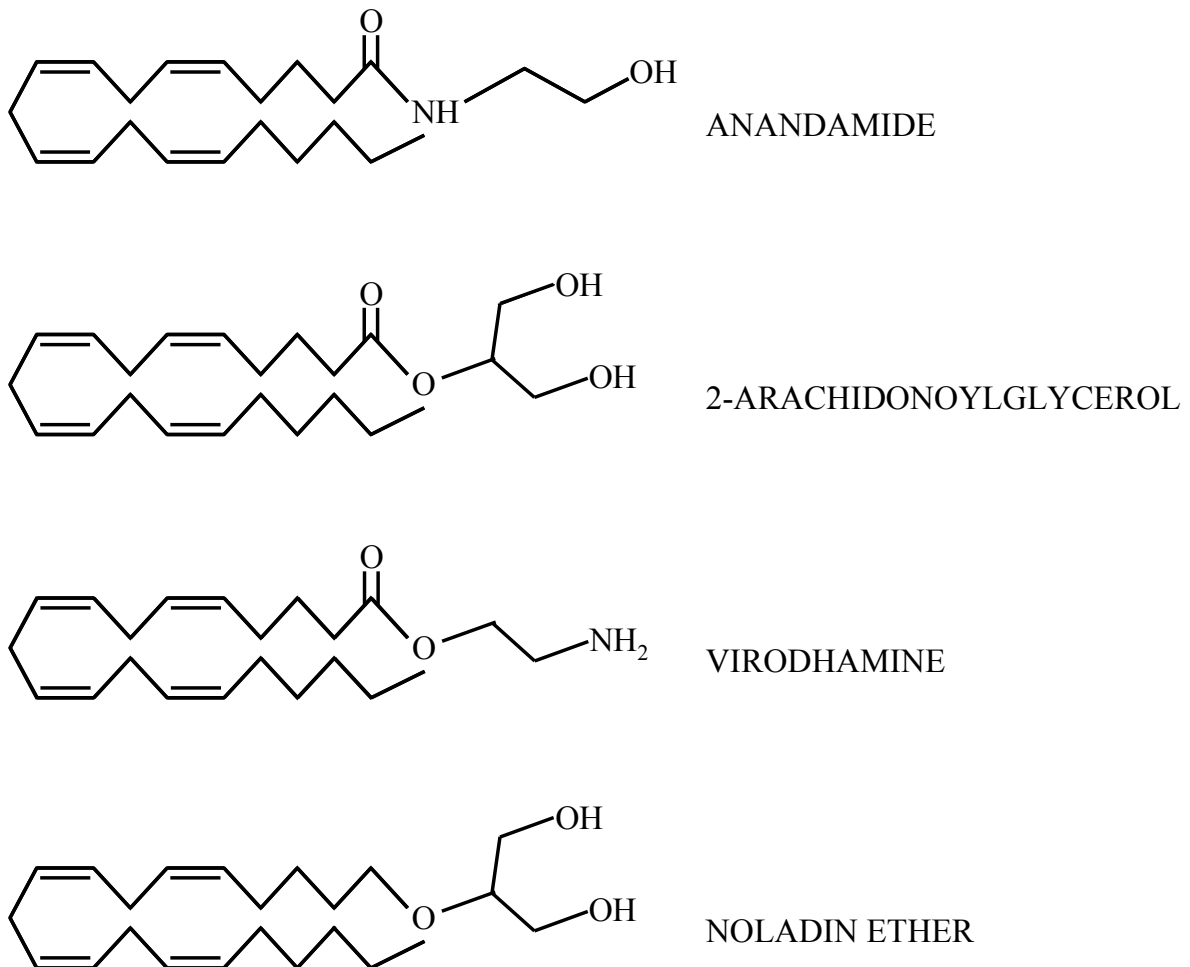


Abbildung 5: Strukturformeln verschiedener Endocannabinoide (DE PETROCELLIS et al., 2004)

Anandamid (AEA) entsteht durch die Spaltung von N-Arachidonoylphosphatidylethanolamin (NArPE) durch Phospholipase D (PLD) (OKAMOTO et al., 2007). Die Entstehung von NArPE wird durch das Enzym N-Acyltransferase (NAT) katalysiert, welches auf die Anwesenheit von Ca^{2+} und cAMP angewiesen ist (CADAS et al., 1996; PIOMELLI, 2003). Das intrazelluläre Ca^{2+} gelangt durch die Depolarisation direkter Calciumkanäle und die Aktivierung ionotroper NMDA-Rezeptoren in die Zelle. Die Aktivität der Phospholipase D ist abhängig von zwei Rezeptortypen, den ionotropen NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat), die bei einer Aktivierung ebenfalls den Einstrom von Calcium in die Zelle erhöhen, und den metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) (STELLA und PIOMELLI, 2001; VARMA et al., 2001)

In den synaptischen Spalt abgegeben, binden die Endocannabinoide an die CB-Rezeptoren und wirken so hemmend auf die Neurotransmitterfreisetzung (siehe Kapitel: Signaltransduktion).

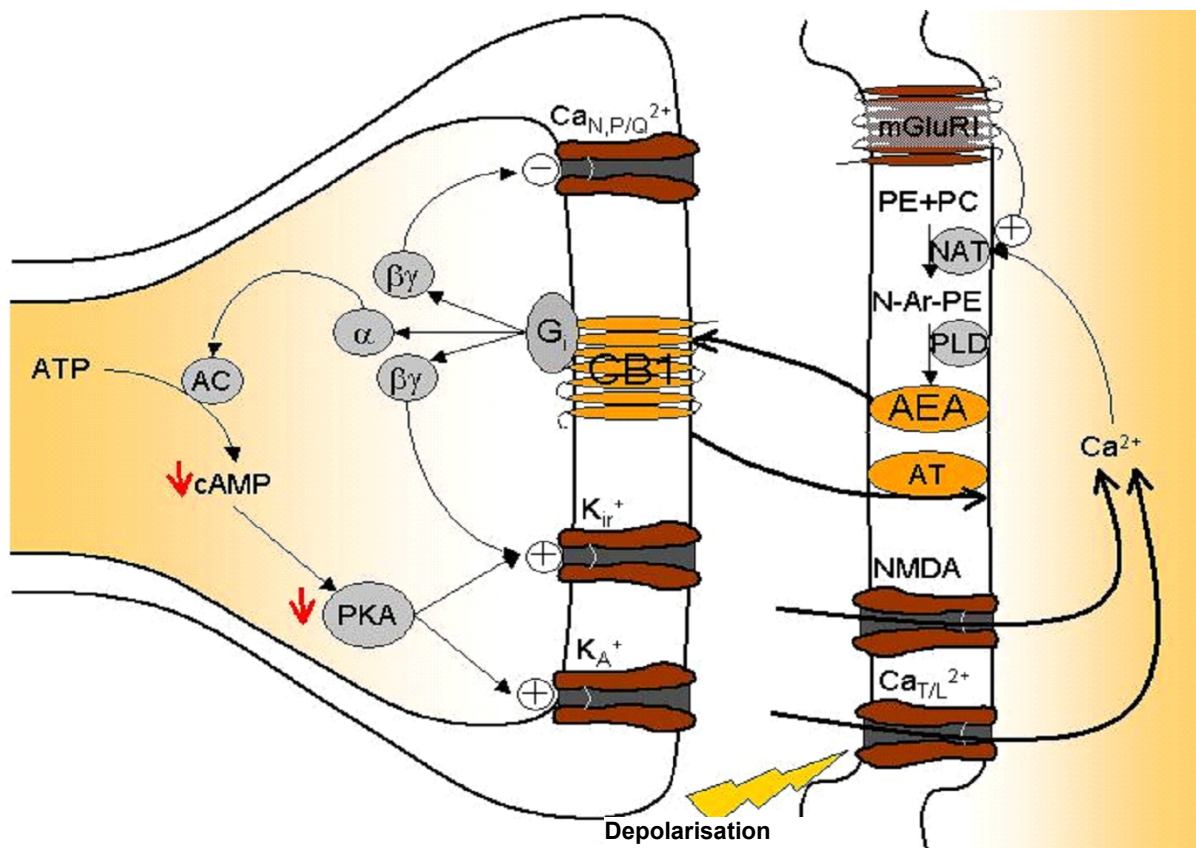


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Synthese und Wirkung von Endocannabinoiden.

Dieser Mechanismus wird an GABAergen Neuronen als „depolarisationsinduzierte Unterdrückung der Hemmung“ (depolarisation-induced suppression of inhibition, DSI) bezeichnet (WILSON und NICOLL, 2002). Durch die Depolarisation wird normalerweise präsynaptisch GABA ausgeschüttet. Dieses bindet an die postsynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren und an die prä- und postsynaptisch gelegenen GABA_B-Rezeptoren. An Ersteren vermittelt es einen Cl⁻-Einstrom und es kommt zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran (= schnelle Komponente der inhibitorischen postsynaptischen Potentiale). GABA_B-Rezeptoren hemmen die Ca²⁺-Kanäle und aktivieren K⁺-Kanäle über G-Protein-gekoppelte Mechanismen. Präsynaptisch bewirkt dies eine Hemmung der GABA-Ausschüttung und postsynaptisch die lange Komponente der IPSPs (MOHLER et al., 1996). Die Aktivierung des CB1-Rezeptors hemmt nun die Freisetzung von GABA an der Präsynapse und beeinflusst so die Entstehung eines IPSPs.

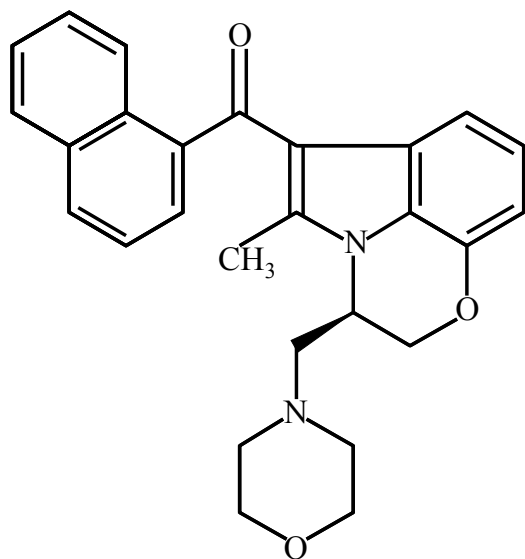
Auch das glutamaterge Neurotransmittersystem wird auf diese Weise von den Endocannabinoiden gehemmt. Hier wird dieser Mechanismus aufgrund des eigentlich exzitatorisch wirkenden Glutamats „deplarisationsinduzierte Unterdrückung der Stimulation“ (depolarisation-induced suppression of excitation, DSE) genannt (WILSON und NICOLL, 2002).

Der Abbau der Endocannabinoide, die zu den Fettsäureamiden gehören, wird bei Anandamid durch Fettsäureamidhydrolase (FAAH) und bei 2-AG durch Monoglyceridlipase (MGL) gewährleistet (CRAVATT et al., 1996; DINH et al., 2002). FAAH kommt im ganzen Körper vor, wobei die höchsten Konzentrationen in der Leber und im ZNS zu finden sind. Hier sind im Verteilungsmuster sogar signifikante Übereinstimmungen mit dem Vorkommen der CB1-Rezeptoren zu sehen (ROMERO et al., 2002). Um den therapeutischen Nutzen der CB1-Rezeptoren beispielsweise in der Schmerztherapie auszunutzen, wird in der Forschung mittlerweile auch mit FAAH-Inhibitoren gearbeitet, die eine längere Wirkung endogener oder exogener Cannabinoide gewährleisten sollen (BRACEY et al., 2002).

In letzter Zeit fällt das Augenmerk auch immer mehr auf die Metaboliten der Endocannabinoide. So entsteht bei der Verstoffwechslung von Anandamid über die Cyclooxygenase Prostaglandin E2 und beim Abbau von 2-AG Arachidonsäure. Beide stellen proinflammatorische Mediatoren dar (CHANG et al., 2001).

In der Erforschung der Cannabinoidrezeptor-vermittelten Wirkungen spielte die Entdeckung synthetischer Agonisten und Antagonisten eine große Rolle. 1991 wurde im Labor der Firma

STERLING-WINTHROP der CB-Rezeptoragonist WIN 55,212-2 entwickelt. Es handelt sich hierbei um ein Aminoalkylindol, das eine starke Affinität zu CB1-Rezeptoren besitzt (HOWLETT, 1995). Die Firma PFIZER synthetisierte einen Agonisten, den CP 55940, der weniger selektive Eigenschaften bezüglich der beiden bekannten CB-Rezeptoren aufweist. Aufgrund ihrer signifikant höheren Fähigkeit CB-Rezeptoren zu aktivieren, sind die beiden genannten Agonisten gerade in der Differenzierung in rezeptorvermittelte und unspezifische Effekte unverzichtbar (HALLER et al., 2004).



WIN 55,212-2

Abbildung 7: Strukturformel des CB1-Rezeptoragonisten WIN 55,212-2 (HOWLETT, 1995)

Der erste Antagonist wurde 1994 von der Firma SANOFI-RESEARCH synthetisiert. Bei SR141716A handelt es sich um einen CB1-Rezeptor-selektiven Stoff, der auch unter dem Namen Rimonabant bekannt ist (RINALDI-CARMONA et al., 1995).

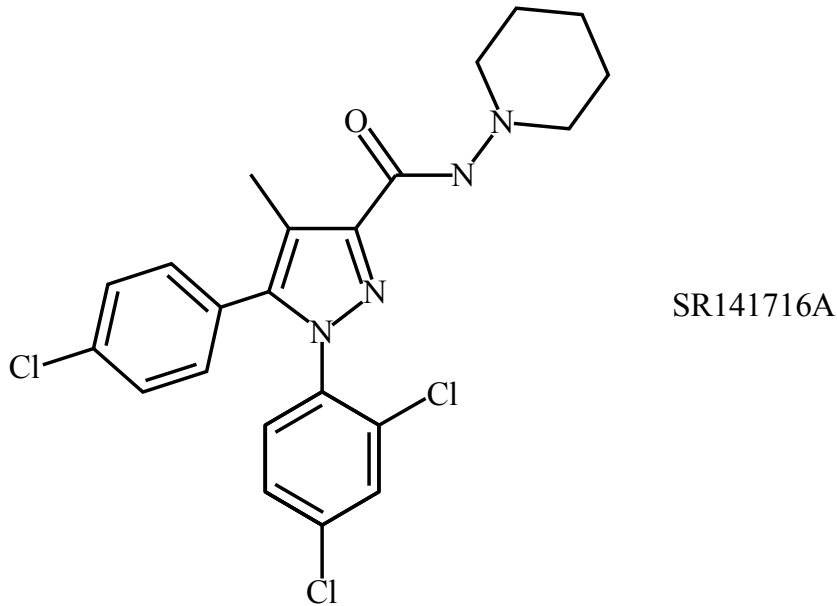


Abbildung 8: Strukturformel des CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A Rimonabant (RINALDI-CARMONA et al., 1995)

1.2.3 Das Endocannabinoidsystem, seine Aufgaben und therapeutische Ansätze

Die Aufgabe des endocannabinoiden Systems und ihre Beteiligung an physiologischen Abläufen ist vielfältig. Sowohl an Lern- und Gedächtnisprozessen, als auch an Schmerz- und Stressmodulation sind sie beteiligt. Die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich der Rolle des endocannabinoiden Systems bei Angstverhalten sind noch ungeklärt. Eindeutig ist jedoch, dass es auch an diesen Abläufen beteiligt ist (DEGROOT und NOMIKOS, 2004; HALLER et al., 2004)

1.2.3.1 Lern- und Gedächtnisprozesse

Die hohe Dichte der CB1-Rezeptoren in Bereichen des Hippocampus und der Amygdala weisen auf eine Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen hin. Dies wurde schon 1999 mit Hilfe eines Objekterkennungstests (Object-Recognition-Test) an Mäusen nachgewiesen (REIBAUD et al., 1999). Wenig später wurde am Beispiel der Angstkonditionierung gezeigt, dass dem endocannabinoiden System auch bei der Anpassung an Abneigung auslösende Situationen eine wichtige Rolle zugeschrieben werden kann. So zeigten Mäuse, die zuvor mit einem Ton- und Schmerzstimulus konditioniert worden waren, bei wiederholter

Tonpräsentation ohne Schmerzreiz an darauffolgenden Tagen eine stetige Abnahme der Angstreaktion. Bei CB1-Rezeptor-defizienten Tieren fehlte diese Anpassungsfähigkeit jedoch. Das Erlernen des Angstverhaltens (Ton-, Schmerzstimulus) und das Speichern des Erlernen ins Langzeitgedächtnis unterschied sich bei gesunden und CB1-Rezeptor-defizienten Tieren allerdings nicht (MARSICANO et al., 2002; AZAD et al., 2004). Die Beteiligung des endocannabinoiden Systems an diesen Verarbeitungsprozessen könnte zu neuartigen Therapieansätzen bei Patienten mit inadäquater Reaktion auf potentiell bedrohliche Ereignisse (Phobiker etc.) führen.

1.2.3.2 Neuroprotektivität

Neben ihrer Beteiligung an den physiologischen Prozessen im Gehirn scheint das endocannabinoide System auch bei Schadensereignissen, wie beispielsweise einem Schlaganfall, das Gehirn zu schützen. Der cerebrale Blutfluss, der während der Ischämie in den betroffenen Gebieten stark verringert ist, erholt sich (CB1-rezeptorvermittelt) schnell wieder. Weiterhin schützt es vermutlich durch einen noch unbekanntem Vorgang vor exzitotoxischer Schädigung (PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002). Es wird auch ein indirekter Schutz durch das Immunsystem des ZNS vermutet. Die unter Entzündungsbedingungen produzierten Endocannabinoide bewirken eine Migration der Mikrogliazellen (WALTER et al., 2003). Gleichzeitig scheint aber lokal eine Überaktivierung des Immunsystems durch die Hemmung des proinflammatorischen Zytokins TNF verhindert zu werden (FACCHINETTI et al., 2003).

1.2.3.3 Schmerz

In der Schmerztherapie erlangt das endocannabinoide System immer mehr Bedeutung. In schmerzverarbeitenden und -weiterleitenden Zentren, wie sensorischen afferenten und efferenten Nervenbahnen können die CB1-Rezeptoren nachgewiesen werden (MARTIN und LICHTMAN, 1998; HOHMANN und HERKENHAM, 1999; MARTIN et al., 1999). Das intravenöse Verabreichen von WIN 55,212-2 bei Ratten zog eine geringere Reaktion auf Schmerzstimuli nach sich und konnte als Prävention gegenüber der Bildung von Hyperalgesie angesehen werden (HOHMANN et al., 1995; LI et al., 1999).

Der genaue Angriffspunkt der endocannabinoiden antinociceptiven Wirkung im Gehirn ist noch nicht eindeutig geklärt. Bei intraventrikulären Gaben von WIN 55,212-2 und CP 55,940 wurden signifikant niedrigere Reaktionen auf thermische Stimuli erzielt. Einer der Wirkorte der Endocannabinoide scheint hierbei die ventromediale Medulla oblongata zu sein (MENG et al., 1998). Auch eine Beteiligung der rostralen ventromedialen Medulla oblongata und der periaqueductalen grauen Substanz konnte nachgewiesen werden (LICHTMAN et al., 1996; HEINRICHER und MCGARAUGHTY, 1998).

Hinweise auf eine spinale Grundlage der antinociceptiven Wirkung von Endocannabinoiden konnten ebenfalls gefunden werden. Sie scheinen im dorsalen Horn des Rückenmarks lokalisiert zu sein. Intrathecale Injektionen von THC bewirkten sowohl bei gesunden Mäusen als auch solchen mit einer Durchtrennung des Rückenmarks in Höhe des Th12 eine antinociceptive Wirkung. Ebenfalls hinweisend auf einen spinalen Mechanismus hinsichtlich einer schmerzreduzierenden Wirkung des endocannabinoiden Systems zeigt eine Studie aus dem Jahre 1998. Hier wurden die CB1-Rezeptoren mit Hilfe des Antagonisten SR 141716A blockiert, was zu einer Hyperalgesie führte. Diese Wirkung konnte durch den Einsatz eines NMDA-Rezeptorantagonisten geblockt werden. So resultiert aus einer Hypoaktivität des spinalen endocannabinoiden Systems eine NMDA-abhängige Hyperalgesie, die möglicherweise die Ätiologie vieler chronischer Schmerzerkrankungen darstellen dürfte (RICHARDSON et al., 1998)

Auch in der Peripherie ist das endocannabinoide System an der Schmerzverarbeitung beteiligt. Im peripheren Gewebe spielt vor allem der CB2-Rezeptor eine Rolle. Anhand von Rattenmodellen wurde seine Rolle bei visceralem und Entzündungsschmerz bewiesen. Eine analgetische Wirkung nach der Gabe von Anandamid und Palmitylethanolamid, einem selektiven CB2-Agonisten konnte eindeutig bestätigt werden. Diese schmerzreduzierende Wirkung ließ sich mit Hilfe des CB2-Antagonisten SR 144528 wieder aufheben, während der selektive CB1-Antagonist SR 141716A keinerlei Wirkung hatte. Ebenfalls auffällig war eine erhöhte antinociceptive Wirkung von Palmitylethanolamid bei lokaler Verabreichung (CALIGNANO et al., 1998).

In neueren Studien wird jetzt auch die Wirkung von Cannabinoiden am Menschen getestet. Sowohl postoperativ mit Hilfe eines oral gegebenen Cannabisextraktes (Cannador), als auch nach capsaicininduziertem Schmerzreiz beim wachen Patienten und gerauchtem Cannabis konnte eine dosisabhängige analgetische Wirkung festgestellt werden (HOLDCROFT et al.,

2006). Der mögliche zu rechtfertigende Einsatz der Endocannabinoide und Cannabinoide bei akuten und chronischen Schmerzpatienten wird weiter beforscht.

1.2.3.4 Kardiovaskuläres System

Schon früh wurde die Wirkung von Cannabinoiden auf das kardiovaskuläre System in Testreihen nachgewiesen. Bei wachen Ratten wurde nach der intravenösen Injektion eines CB1-Rezeptoragonisten nur eine leichte kardiovaskuläre Depression, aber auch kein Effekt oder sogar Bluthochdruck und Tachykardie ausgelöst (LAKE et al., 1997; NIEDERHOFFER und SZABO, 1999). Bei narkotisierten Tieren vermindern systemisch gegebene Cannabinoide üblicherweise den Blutdruck und die Herzfrequenz (CAVERO et al., 1973; VOLLMER et al., 1974; LAKE et al., 1997; NIEDERHOFFER und SZABO, 1999). Eine Aussage, inwiefern diese Effekte peripher oder zentral verursacht wurden, konnte in diesen ersten Tests auf Grund der lipophilen Eigenschaften und der damit verbundenen guten ZNS-Gängigkeit der Cannabinoide nicht eindeutig getroffen werden.

In der Peripherie deutet alles darauf hin, dass über Endocannabinoide ausgelöste kardiovaskuläre Effekte durch eine Sympathikushemmung ausgelöst werden. Bei despinalisierten Kaninchen mit präganglionärer Stimulation des Sympathikus verringerte die Gabe von CB-Rezeptoragonisten (WIN 55,212-2) signifikant die Freisetzung von Noradrenalin aus den postganglionären Neuronen. Der Plasma-Noradrenalin Spiegel sank und führte zum Abfall des Blutdrucks. Intravenös zugeführtes Noradrenalin führte dann zu einem Blutdruckanstieg und wurde somit nicht von dem Agonisten beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen direkten Effekt auf das periphere Gefäßendothel, sondern vielmehr für eine CB-Rezeptor-vermittelte Sympathikushemmung (NIEDERHOFFER und SZABO, 1999). Den Nachweis, dass das endocannabinoide System lokal auch einen direkten Einfluss auf den vaskulären Tonus hat, wurde 1999 erbracht. CB1-rezeptorvermittelt kommt es in den glatten Muskelzellen von Hirnarterien der Katze zur Hemmung Dihydropyridin-sensitiver L-Typ-Calciumkanäle und somit zur Vasodilatation. Darum kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in anderen Regionen eine lokale Wirkung auf das Gefäßendothel und die glatte Muskulatur nachgewiesen werden kann (GEBREMEDHIN et al., 1999).

Die Wirkung von Cannabinoiden an kardiovaskulären regulatorischen Zentren der Medulla oblongata wurde bisher nur in wenigen Studien beschrieben. VOLLMER und Mitarbeiter (1974) injizierten THC in den lateralen cerebralen Ventrikel der Katze und lösten so eine

Senkung des Blutdrucks und der Herzfrequenz aus. Diese Effekte wurden einer zentral vermittelten Sympathikushemmung zugesprochen (VOLLMER et al., 1974). Eine intracisternale Applikation von WIN 55,212-2 bei wachen Kaninchen führte zu einer Erhöhung des Blutdrucks und der Plasmakonzentration von Noradrenalin. Gleichzeitig kam es zur Bradykardie, die sich durch Atropin antagonisieren ließ. Während der erhöhte Blutdruck und die Noradrenalinwerte einer zentralen Aktivierung des Sympathikus zugeschrieben wurden, schloss man bei der Bradykardie auf eine zentrale Stimulation des Vagus (NIEDERHOFFER und SZABO, 1999). Um ein differenzierteres Bild über den Wirkort der Cannabinoide im Gehirn zu erhalten wurden Mikroinjektionen von WIN 55,212-2 in die rostrale ventrolaterale Medulla oblongata von Ratten durchgeführt. Auch hier kam es zu einem Blutdruckanstieg, der auf eine CB1-rezeptorvermittelte Sympathikusstimulation schließen lässt. Weitere kardiovaskulär aktive Zentren in der Medulla oblongata wurden jedoch noch nicht im einzelnen untersucht (PADLEY et al., 2003).

1.2.3.5 Essverhalten

Die Rolle des endocannabinoiden Systems bei der Regulation des Hungergefühls stellte gerade in Zeiten zunehmender Fettleibigkeit einen interessanten Forschungsansatz dar. In einer der ersten Studien zu diesem Thema bewiesen WILLIAMS und KIRKHAM 1999 die Beteiligung des endocannabinoiden Systems an der Regulation des Hungergefühls. Sie testeten an Ratten sowohl verschiedene Gaben von Anandamid, einem CB1-Agonisten, als auch Gaben eines Antagonisten, dem SR 141716. Die Futteraufnahme stieg durch die Gabe von Anandamid signifikant an und konnte durch den Einsatz des Antagonisten abgemildert werden (WILLIAMS und KIRKHAM, 1999). Bestätigt wurden diese Ergebnisse in weiteren Folgestudien mit restriktiv ernährten und bei CB1-rezeptordefizienten Mäusen (HAO et al., 2000). Diese Tiere zeigten gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine geringere Futteraufnahme (und ein daraus resultierendes geringeres Körpergewicht), die auch nicht weiter durch SR141716 gesenkt werden konnte. Zusätzlich versuchte man einen Zusammenhang zwischen dieser Wirkung des endocannabinoiden Systems und dem Hormon Leptin zu finden. Bei Leptin handelt es sich um ein von Fettzellen abgegebenes Hormon. In dem Hungerregulierungszentrum im Gehirn, dem Hypothalamus, befinden sich Rezeptoren für dieses Hormon, das dort hemmend auf das Hungergefühl wirkt. Hier nun konnte dieser Zusammenhang eindeutig bestätigt werden. Nach einer Gabe Leptin sanken innerhalb kürzerer Zeit die Spiegel von Anandamid und 2-AG im Hypothalamus ab. Bei Tieren mit

einem defekten Leptin-System konnten dem gegenüber stark erhöhte Werte von Anandamid gemessen werden (DI MARZO et al., 2001). Da adipöse Menschen allerdings meist unter einer Leptinresistenz leiden und dieses Hormon als mögliches Medikament ausschied, setzten die Forscher ihre Hoffnung auf den CB1-Rezeptorantagonisten Rimonabant (SR141716). In langjährigen Studien wurde es an fettleibigen Probanden getestet, ehe es 2006 als Medikament zur Fettreduktion auf den Markt kam. Neben der signifikanten Senkung des Körpergewichts reduziert es den Taillenumfang (ein Marker der intraabdominalen Adipositas) und verbessert die Insulinresistenz, sowie die Lipid- und Glukoseprofile (DESPRES et al., 2005).

Mittlerweile wird Rimonabant noch als Medikament gegen Nikotin- und Alkoholabhängigkeit getestet. So konnte in mehreren Studien ein positiver Effekt dieses CB1-Rezeptorantagonisten auf das Suchtverhalten von Tieren auf Nikotin und Ethanol beobachtet werden (COHEN et al., 2002; COHEN et al., 2005). Es sank die Nikotin- und Ethanol-induzierte Ausschüttung von Dopamin im Nucleus accumbens, was diesen modifizierenden Effekt erklären könnte (COHEN et al., 2002).

1.2.4 Das Tiermodell

In den letzten Jahren führte der Fortschritt in der Genetik auch in anderen Forschungsgebieten zu neuen Möglichkeiten. So konnten durch die Entwicklung homozygoter *Knockout*-Mäuse insbesondere in der Rezeptorforschung neue Ergebnisse erzielt werden. Allerdings birgt diese Art der Forschung auch Risiken. Inwiefern *Knockout*-Tiere außer dem Fehlen eines Rezeptortyps noch andere Veränderungen aufweisen gilt es zu erforschen.

1.2.4.1 CB1^{-/-} Mäuse

Die im ersten Teil der Studie eingesetzten CB1-Rezeptor-defizienten Mäuse wurden im Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München gezüchtet. Nach der Identifizierung des DNA-Fragments in der Keimbahn von Mäusen, das für die Bildung des CB1-Rezeptors verantwortlich ist, wurde dieses entfernt. Die erste Generation der Tiere, die diese ablesbare Löschung des CB1-Rezeptorgens besitzen, wurde über fünf Generationen mit C57BL/6NCrl Mäusen (Charles River, Bad Sulzfeld, Deutschland) rückgekreuzt um eine stabile Population zu erzielen. Mit Hilfe der Southern-Blot-Hybridisierung identifizierte man dann homozygote

CB1-Rezeptor-defiziente Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister. Diese wurden im ersten Teil der Studie eingesetzt.

1.2.4.2 CB^{f/fCaMKII α Cre} Mäuse

Im zweiten Teil der Studie wurden CB^{f/fCaMKII α Cre} Mäuse eingesetzt. Das DNA-Fragment für den CB1-Rezeptor wird mit Hilfe von zwei LoxP-Anteilen flankiert. Diese Mäuse werden dann wiederum mit Mäusen gekreuzt, die mit Hilfe eines Gens Cre-Recombinase exprimieren. Die Cre-Recombinase ist an den CaMKII-Promotor gekoppelt, wodurch das Ablesen nur in den glutamatergen Neuronen des Vorderhirns geschieht. So entstehen CB^{f/fCaMKII α Cre} Mäuse, bei denen in den glutamatergen Neuronen des Vorderhirns kein CB1-Rezeptor ausgebildet ist. Die Expressierung des Rezeptors in den cortikalen GABAergen Interneuronen bleibt jedoch erhalten (MARSICANO et al., 2003).

1.3 Isofluran

Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluor-methylether) wurde 1965 erstmals synthetisiert. Es ist ein Strukturisomer von Enfluran, besitzt eine chirale Struktur und gehört zur Gruppe der volatilen Anästhetika. Bei Raumtemperatur liegt es als farblose Flüssigkeit vor, besitzt einen etherartig milden Geruch und ist sehr stabil. Der Dampfdruck liegt bei ca. 239,5 mmHg, der Siedepunkt bei 48,5 °C und das Molekulargewicht beträgt 184,5 Dalton (ERHARDT et.al., 2004).

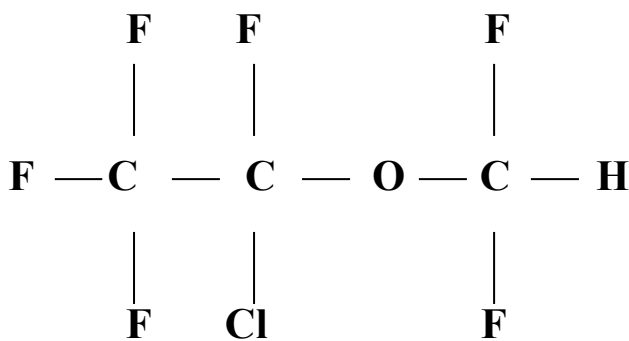


Abbildung 9: Strukturformel Isofluran (nach EGER, 1981)

Isofluran besitzt eine geringe Löslichkeit im Blut, flutet deshalb schnell an und wird auch schnell wieder abgeatmet (Blut/Gas-Verteilungskoeffizient 1,4). So ist die Narkose mit Isofluran gut steuerbar. Der Blut/Fettverteilungskoeffizient bei Isofluran liegt mit 45 im Gegensatz zu anderen volatilen Anästhetika (Desfluran 27) relativ hoch, was mit seiner hohen Fettlöslichkeit zu erklären ist (SALZ, 2003)

1.3.1 Die anästhetische Wirksamkeit

Eine wichtige Maßzahl für die Wirksamkeit eines Anästhetikums ist der Wert der minimalen alveolären Konzentration (MAC-Wert). Es handelt sich hierbei um die alveoläre Konzentration eines volatilen Anästhetikums, bei der 50% der Patienten keine gezielten Abwehrbewegungen mehr auf einen definierten Schmerzreiz zeigen (EGER et al., 1965). Der MAC-Wert kann je nach Spezies und Wahl des Anästhetikums stark variieren. So liegt bei einer Isoflurannarkose der MAC-Wert des Menschen bei ca. 1,27%, während die Katze 1,68% des Gases benötigt.

Auch andere Faktoren haben einen Einfluss auf den MAC-Wert. So vermindert sich beispielsweise bei älteren Patienten der MAC-Wert von Isofluran (KATOH et al., 1993).

1.3.2 Wirkung von Isofluran auf die Rezeptoren im ZNS

Zahlreiche Forschungsergebnisse zeigen, dass das GABAerge System der Hauptwirkungsort für volatile Anästhetika zu sein scheint (TANELIAN et al., 1993). Inhalationsanästhetika verstärken die GABAerge synaptische Transmission und die inhibitorischen Effekte (NISHIKAWA und MACIVER, 2001). Gleichzeitig wirken sie jedoch auch hemmend auf das exzitatorisch wirkende glutamaterge System (NISHIKAWA und MACIVER, 2000).

GABAerges System und Isofluran

Isofluran bewirkt eine vermehrte und stärkere Bindung von GABA an dem GABA_A-Rezeptor. Dies zeigt sich in Form von verlängerten GABA_A-IPSPs (BANKS und PEARCE, 1999; NISHIKAWA und MACIVER, 2001; RANFT et al., 2004). Die Amplitude des IPSPs bleibt hierbei konstant oder wird sogar für kurze Zeit kleiner. Dies erklärten NEUMAHR und Mitarbeiter (2000) mit dem Vorliegen eines Offen-Kanal-Blocks, der je nach Konzentration von GABA und volatilem Anästhetikum am GABA_A-Rezeptor verursacht wird. Trotzdem hat dieser bei klinisch relevanten Dosen keinen negativen Einfluss auf die Wirkung des Isofluran, da der potenzierende Effekt auf die inhibitorische Wirkung des Narkosegases überwiegt (NEUMAHR et al., 2000; HAPFELMEIER et al., 2001). Der GABA_B-Rezeptor, der die langsame Komponente der IPSPs darstellt, scheint hingegen keine große Rolle bei der Wirksamkeit der Isoflurannarkose zu spielen. Eine Verlängerung der GABA_B-Rezeptor-spezifischen IPSPs konnte nicht festgestellt werden (RANFT et al., 2004).

Mittlerweile versuchen die Studien zusehens die einzelnen Untereinheiten speziell auf ihre Rolle bei der Narkose zu untersuchen. Eine Veröffentlichung von SONNER et al. aus dem Jahr 2005 zeigt demnach auf, dass Mäuse, denen die α -1-Untereinheit der GABA-Rezeptoren fehlte, viel weniger empfindlich gegenüber der amnestischen Wirkung von Isofluran waren als ihre Wildtyp-Artgenossen. Der MAC-Wert war hingegen bei allen drei Gruppen unverändert. Dies spricht für eine geringe Beteiligung der α -1-Untereinheit bei der Immobilität, gemessen als Reaktion auf einen gesetzten Schmerzreiz (SONNER et al., 2005).

Glutamaterges System und Isofluran

Auch das glutamaterge System spielt bei dem Einsatz von volatilen Anästhetika eine Rolle. So wurden in Studien mit Hippocampuszellen von Ratten die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) an den verschiedenen Glutamatrezeptoren gemessen (NMDA-R, AMPA-R, Kainat-R). Unter Einsatz von Isofluran verringerten sich diese EPSPs (DE SOUSA et al., 2000). Bei weiteren Untersuchungen von NISHIKAWA und MACIVER (2000) an Rattenhirnen fanden sich Hinweise, dass dieser Mechanismus sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert ist. Es wurden die EPSPs gemessen und auch eine Unterteilung in NMDA oder Nicht-NMDA verursachte EPSPs getroffen. Die Ergebnisse zeigen auf, dass die hemmende Wirkung auf die NMDA-Rezeptoren ausgeprägter ist als die Wirkung auf die anderen Rezeptoren des glutamatergen Systems (NISHIKAWA und MACIVER, 2000).

Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren über einen anderen Weg an der Postsynapse wird scheinbar auch verhindert. Isofluran greift hier Ca^{2+} -Kanäle (L-, N-, P- und T-Typ) direkt an und verhindert den postsynaptischen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Dies wiederum wirkt einer ausreichenden Membrandepolarisation entgegen. Die spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockierungen an NMDA-Rezeptoren, die sich erst ab einem Membranpotential unter -5mV lösen, können somit vom Glutamat nicht aktiviert werden (STUDY, 1994)

1.3.3 Wirkung von Isofluran auf das kardiovaskuläre System und die Atmung

Auf das kardiovaskuläre System wirkt Isofluran in unterschiedlicher Weise. Es wirkt vasodilatativ, was wegen des stark verminderten peripheren Gefäßwiderstandes zu einem Blutdruckabfall führt. Der Grad der Vasodilatation ist allerdings nicht so ausgeprägt wie unter einer Halothannarkose. Es kommt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, so dass trotz des geringeren Schlagvolumens das Herzzeitvolumen kaum beeinflusst wird (MUTSCHLER und SCHUBERT-ZSILAVECZ, 2001; ALEF und OECHTERDING, 2003; ERHARDT et al, 2004). Außerdem besitzt Isofluran einen negativ inotropen Effekt (EGER, 1981).

Isofluran wirkt dosisabhängig atemdepressiv (ERHARDT et al., 2004). Ursache dafür ist die zentral hemmende Wirkung auf Areale der Medulla oblongata (STUTH et al., 1992)

1.3.4 Minimal Alveolar Concentration

1.3.4.1 Definition

Wie bereits erwähnt ist MAC eine wichtige Maßzahl für die Wirksamkeit eines volatilen Anästhetikums. Laut Definition handelt es sich hierbei um einen Wert, bei dem 50% der Patienten keine gezielten Abwehrbewegungen auf einen definierten Schmerz zeigen (EGER et al., 1965).

1.3.4.2 Ermittlung des MAC-Wertes

In den Testreihen, die zur Ermittlung des MAC-Wertes führten, wurde vor allem mit Tiermodellen gearbeitet. Hier wurden die Schmerzreize vornehmlich mit Hilfe einer Klemme, die an Pfote oder Schwanz gesetzt wurde, ausgelöst. Dieser Schmerzreiz wurde immer mindestens 30 Sekunden gesetzt, da auch eine verzögerte Reaktion auf die Klemme abgewartet werden muss. Der Vorteil des Tiermodells liegt daran, dass der MAC-Wert durch Erhöhen oder Erniedrigen der Gaskonzentration in der Einatemluft individuell ermittelt werden kann (MERKEL und EGER, 1963; EGER et al., 1965; QUASHA et al., 1980).

Bei Testreihen an Menschen wurde der Schmerzreiz mit Hilfe von Hautinzisionen am Unterarm gesetzt. Diese Untersuchungsmethode konnte keinen individuellen MAC-Wert, sondern immer nur den MAC-Wert einer Personengruppe ermitteln (SAIDMAN et al., 1967)

1.3.4.3 Beeinflussende Faktoren

Die minimale alveoläre Konzentration wird bei dem Druck von 1 Atmosphäre gemessen und der Anteil (in Prozent) in der Atemluft angegeben. Nach einer gewissen Anflutungsphase repräsentiert dieser Wert den Partialdruck des Narkosegases in den Alveolen, im Blut und im Gehirn. Sowohl der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient des Gases, als auch das Herzkreislaufsystem und das Alter spielen eine Rolle bei dem individuellen MAC-Wert des jeweiligen Organismus. So wurde schon 1952 in einer Studie mit Cyclopropan festgestellt, dass Kinder eine höhere Blutkonzentration als Erwachsene benötigen. Spätere Modelle bestätigten diese Ergebnisse. Eine Parallele zwischen altersbedingten Veränderungen des cerebralen Blutflusses, des cerebralen Sauerstoffverbrauchs und der Neuronendichte im

Gehirn konnte hierbei gefunden werden (DEMING, 1952; KETY, 1956; GREGORY et al., 1969; KATOH et al., 1993).

In weiteren Tests wurden mehrere wichtige Narkoseparameter oder mögliche Begleiterscheinungen innerhalb einer Anästhesie hinsichtlich ihres Einflusses auf den MAC-Wert untersucht. Die Dauer einer Narkose führte nicht zu einer Veränderung des Wertes (GREGORY et al., 1974). Auch konnten nur geringe Speziesunterschiede festgestellt werden. Auch Hyper- und Hypotension, Elektrolytverschiebungen, Hypoxie und Hyperoxie zeigen keine oder nur geringe Abweichungen hinsichtlich des normalen MAC-Wertes der Kontrollgruppen (EGER et al., 1965; EISELE et al., 1967). Ein Abfall der Körpertemperatur setzt den Bedarf an Narkosegas herab, während eine Erhöhung der Körpertemperatur einen Anstieg des Gasbedarfs nach sich zieht (EGER et al., 1965; STEFFEY und EGER, 1974).

Die Wirkung verschiedener zentral wirksamer Medikamente und Drogen auf den MAC-Wert spielt in der Medizin und Anästhesie eine große Rolle und wurde ebenfalls untersucht. Ephedrin, das die Norephedrinausschüttung im Gehirn erhöht, bewirkt eine Erhöhung des MAC-Wertes (STEFFEY und EGER, 1975). Auch Kokain und schnell wirksame Amphetamine erhöhen den MAC-Wert. Kokain verursacht im Gehirn eine Erhöhung extrazellulärer Katecholamine, während die Amphetamine ähnlich wie Ephedrin ihre Wirkung durch Norephedrinausschüttung im Gehirn entfalten (JOHNSTON et al., 1972)

1.3.4.4 MAC-Wert und Cannabinoide

Es gibt viele Testreihen, die die Wirkungsweise von Cannabinoiden im zentralen und peripheren Nervensystem untersuchen. Ein Zusammenhang zwischen einer möglichen Veränderung des MAC-Wertes und einer parallelen Gabe von Cannabinoiden ist jedoch kaum beurteilt worden.

Kurz nachdem die Definition des MAC-Wertes 1965 festgelegt wurde untersuchten gleich zwei Forschungsteams eine Beeinflussung dieses Narkoseparameters durch Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), einem der wirksamen Bestandteile der Cannabispflanze. VITEZ et al. (1973) injizierten Ratten während einer Narkose mit Cyclopropan unterschiedliche Mengen THC intraperitoneal. Je nach injizierter Dosis sank die notwendige minimale alveoläre Konzentration des Gases erheblich. Bei verabreichten 2,0mg/kg THC reduzierte sich der MAC-Wert zwei Stunden post injectionem sogar um 25,1% gegenüber den

Kontrolltieren (VITEZ et al., 1973). Eine Untersuchung von STOELTING et al. (1973) wurde unter Halothannarkose bei Hunden durchgeführt. Das THC wurde intravenös verabreicht. Auch hier verringerte schon eine Gabe von 0,5mg/kg den MAC-Wert 1 Stunde post injectionem um 32%. Wie auch im vorangegangenen Test war die Wirkung des THC hier bereits drei Stunden nach dem Verabreichen verflogen und die MAC-Werte der THC-Tiere nicht mehr von denen der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Bei höheren Gaben von intravenösen THC hielt die depressive Wirkung auf den MAC-Wert zwar länger an, konnte aber nach 24 Stunden auch nicht mehr nachgewiesen werden (STOELTING et al., 1973).

3. Eigene Untersuchungen

1.4 Zielvorstellung

Die vorliegende Studie soll Aufschluss darüber geben, ob genetische Veränderungen am CB1-Gen in vivo Einfluss auf die Wirkung einer Inhalationsnarkose haben. Hierfür werden MAC-Werte bestimmt: bei transgenen total CB1-Rezeptor-defizienten Mäusen (CB1^{-/-}) und bei transgenen Mäusen mit einer konditionalen Mutation, die den Rezeptor nur in GABAergen Interneuronen exprimieren (CB^{f/fCaMKII α Cre} Mäuse). Als Kontrollgruppe werden MAC-Werte bei den jeweiligen Wildtyp-Geschwistern evaluiert.

1.5 Material und Methodik

Der Versuch wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung vom 25.05.1998 BGBl I S.1105, zuletzt geändert am 06.08.2002, BGBl I S.3082) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

1.5.1 Versuchstiere

In der ersten Testreihe werden 13 CB1^{-/-} Mäuse und 13 Wildtyp-Wurfgeschwister verwendet. Eine weitere Testreihe wird mit 12 CB^{f/fCaMKII α Cre} Mäusen und 12 Wildtyp-Wurfgeschwistern (CB^{f/f}) durchgeführt.

1.5.1.1 Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere werden gemäß den Richtlinien zur Versuchstierhaltung untergebracht. In dem vollklimatisierten Stall herrscht eine Raumtemperatur von 22 Grad (+/- 2 Grad) sowie eine Luftfeuchte von 60 % (+/- 5 %). Der Hell-Dunkelrhythmus der Tiere (12/12) wird durch eine Zeitautomatik gewährleistet. Während der Hellphase, die 12 Stunden andauert, beträgt die Lichtintensität im Käfig etwa 50 Lux. Die Pflege und Kontrolle der Tiere wird immer von

derselben Person durchgeführt. Diese betritt die Räumlichkeiten erst nach gründlicher Desinfektion und in Schutzkleidung.

Die Tiere werden einzeln in Standardkäfigen aus Makrolon vom Typ II gehalten. Die Käfige sind mit entstaubter und entkeimter Holzgranulateinstreu (Altromin Faser, Altromin, Lage-Lippe) und Zellstoff (als Beschäftigungs- und Nestbaumaterial) versorgt. Die Tiere werden an einem festgelegten Tag der Woche in saubere Käfige umgesetzt.

Die Tiere erhalten Futterpellets im Futtergitter (Altromin – Haltung1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser aus der Nippelflasche ad libitum. Wasser und Flasche werden beim Umsetzen der Tiere ebenfalls ausgetauscht.

1.5.2 Versuchsplan

Die 50 Testmäuse (13 CB1^{-/-} und 13 CB1^{+/+}Mäuse sowie 12 CB^{f/fCaMKII α Cre} und 12 CB^{f/f}Mäuse) werden nach der Lieferung vom Züchter für 21 Tage zur Akklimatisierung im Tierstall gehalten.

Am Tag der Narkose werden die Mäuse aus ihrer gewohnten Umgebung in das Versuchslabor gebracht. Nach einer kurzen Beruhigungsphase wird die Narkose mit unterschiedlichen Isoflurankonzentrationen durchgeführt. . Danach wird die Gaskonzentration zwischen 0,8-1,9Vol% reguliert. Der Wechsel wird in Schritten von 0,1-0,2Vol% durchgeführt. Die Dosierung wird 15 Minuten gehalten bevor die Reaktion auf eine genormte Zehenklemme getestet wird. So kann der MAC-Wert für die einzelnen Tiere genau ermittelt werden. Nach dem Aufwachen werden die Tiere nach einer längeren Beobachtungsphase, um mögliche Komplikationen nach der Narkose auszuschließen, wieder in ihren Stall gebracht.

1.5.2.1 Narkoseeinleitung und -überwachung

Die Tiere werden von einer nicht am Test beteiligten Person aus ihrem Stall in das Narkoselabor transportiert und in ruhiger Atmosphäre untergebracht. Die markierten aber genetisch unterschiedlichen Tiere sind für den Tester nicht unterscheidbar und werden randomisiert im Versuch eingesetzt. Vor der Narkoseeinleitung unterzieht man alle Tiere einer kurzen adspektorischen Allgemeinuntersuchung und das aktuelle Gewicht wird dokumentiert. Dann wird die jeweilige Maus in eine mit 2,5Vol% Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in 97,5 Vol% Sauerstoff/Luftgemisch ($FiO_2=0,5$) vorgeflutete luftdichte Kammer aus Akryl (Eigenbau) gesetzt. Nachdem sie ihre Stellreflexe verliert und die Atemfrequenz geringgradig absinkt, wird sie über eine Nasenkammer in das mit 2,0 Vol% Isofluran vorgeflutete Narkosesystem integriert. Dieses verbindet über zwei gegenüberliegende Anschlüsse die Nasenkammer mit einem Kreissystem, welches einen ständigen Durchfluss von Isofluran und des Sauerstoff/Luftgemischs ($FiO_2=0,5$) von 3 l/min gewährleistet. Die Einstellung des positiv endexpiratorischen Drucks (PEEP) auf 3 mmHg verhindert die Entstehung von pulmonalen Atelektasen. Die Einhaltung dieses Wertes wird während der gesamten Narkosedauer überprüft. Zusätzlich ist in dem Narkosesystem noch ein Luftbefeuchter (Kendall, Respiflo Lyco Healthcare GmbH, Neustadt) integriert, der die durch die Respiration bedingten Feuchtigkeitsverluste der Tiere wieder ausgleichen soll. Einer Schädigung der Kornea durch den narkosebedingt fehlenden Lidreflex wird durch das Applizieren von Bepanthen Augensalbe (Bepanthen, Hoffmann- La Roche AG, Grenzach-Whylen) vorgebeugt. Eine rektale Temperatursonde (Medical Temperature Probe für Neonaten, Exacon, Asmut, Minden) und ein EKG (Cardiicap, Datex) werden an die Maus angeschlossen. So kann eine lückenlose Aufzeichnung (jeweils zum Ende einer jeden Teststufe) und Kontrolle von Temperatur, Herz- und Atemfrequenz während der gesamten Narkose gewährleistet werden. Für eine ständige Wärmezufuhr dient ein Wärmekissen (Warm Touch, Mallinckrodt Medical, Irland).

Die Initialdosis von 2,0 Vol% Isofluran, die dem Sauerstoff/Luftgemisch ($FiO_2=0,5$) zugeführt wird, wird 35 Minuten beibehalten. Es werden nach dieser Zeit Herzfrequenz, Temperatur und Atemfrequenz gemessen und notiert. Die motorische Reaktion auf einen Schmerzreiz wird mit einer Zehenklemme getestet. Die angewendete Zehenklemme übt immer denselben Druck auf die Zehen beim Ansetzen aus, sodass eine einheitliche Schmerzreaktion erwartet werden kann.

Tabelle 1 Versuchsablauf

Ablauf	Durchzuführende Elemente
Vor Einleitung der Narkose	<ul style="list-style-type: none"> • Verbringen des Tieres in das Versuchslabor • Adspektorische Allgemeinuntersuchung • Gewichtskontrolle
Einleitung der Narkose	<ul style="list-style-type: none"> • Narkoseeinleitung in Akrylkammer: 2,5Vol% Isofluran in 97,5 Vol% Sauerstoff/Luftgemisch ($FiO_2= 0,5$) • Nach Verlust der Stellreflexe Integrieren des Tieres in Narkosesystem über Nasenkammer (Durchfluss Isofluran (initial 2,0 Vol%) und Luft /Sauerstoffgemisch ($FiO_2= 0,5$) = 3l/min. endexpiratorischer Druck (PEEP) 3mmHg • An- bzw. Einbringen von EKG, Temperatursonde, Augensalbe und Wärmekissen
Narkose	<ul style="list-style-type: none"> • Erster Zehenklemmentest nach 35 Minuten 2,0 Vol% Isofluran -> Notieren aller Vitalparameter • Absenken auf 1,9 Vol% Isofluran, erneuter Test Vitalparameter und Zehenklemme nach 15 Minuten • Wechsel der Vol% Isofluran je nach Reaktion des Zehenklemmentests • Messung alle 15 Minuten Vitalparameter und Zehenklemmentest und anschließender Wechsel der Isoflurankonzentration • Nach 120 Minuten letzte Messung
Ausleitung der Narkose	<ul style="list-style-type: none"> • Entfernen aller Messinstrumente • Verbringen des Tieres in Akrylkammer (100% Sauerstoff) • Nach Erlangen aller Reflexe Verbringen der Tiere in den Stall und weitere Überwachung einige Stunden

Nun senkt man die Isofluranzufuhr auf 1,9 Vol% für 15 Minuten. Es werden wiederum am Ende des Zeitfensters alle Vitalparameter notiert und die Zehenklemme gesetzt. Anschließend wird die Isoflurankonzentration in 15 Minuten-Intervallen zwischen 0,8-1,9 Vol% variiert. So wird die minimale Isoflurankonzentration jedes Tieres bestimmt, die nötig ist, um die Reaktion auf die Zehenklemmen zu unterdrücken.

Tabelle 2 Beispiel eines Narkoseprotokolls

Zeit	Isofluran Vol % Testwert	Klemmtest	Isofluran Vol% Sollwert	Atemfrequenz Züge/min	Herzfrequenz Schläge/min
35 Min	2,0 Vol%	negativ	->1,9 Vol%	108	500
15 Min	1,9 Vol%	negativ	-> 1,3 Vol%	112	500
30Min	1,3 Vol%	positiv	-> 1,1 Vol%	112	520
45 Min	1,1 Vol%	positiv	-> 1,4 Vol%	116	520
60 Min	1,4 Vol%	negativ	-> 1,2 Vol%	116	540
75 Min	1,2 Vol%	positiv	-> 1,3 Vol%	120	520
90 Min	1,3 Vol%	positiv	-> 1,2 Vol%	116	508
105 Min	1,2 Vol%	positiv	->1,4 Vol%	120	520
120 Min	1,4 Vol%	negativ		112	520

1.5.2.2 Narkoseausleitung

Nachdem während der zweistündigen Testphase der individuelle MAC-Wert für das Tier ermittelt wurde, wird es von dem Narkosegerät, EKG und Temperaturmessern abgehängt und

zum Aufwachen wieder in die Akrylkammer gesetzt. Dort atmet es, bis es wieder völlig erwacht und alle Reflexe zurückgekehrt sind, 100% Sauerstoff. Danach werden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und in ihren Stall zurückgebracht, um sie weiter beobachten zu können.

1.5.3 Statistische Bewertung der Befunde

Die Ergebnisse werden mit einem unpaaren T-Test statistisch ausgewertet. Der Signifikanzgrenzwert liegt je nach Test (MAC-Wert, Gewicht, Atmung und Herzfrequenz) zwischen $p < 0.05$ und $p < 0,001$. Alle Größen werden als Mittelwerte \pm ihrer Standardabweichungen angegeben (MW \pm SD).

1.6 Ergebnisse

Bei der vorliegenden Studie wurden insgesamt 50 Tiere getestet. Sie sind unterteilt in zwei Gruppen: Wildtyp- ($CB^{+/+}$) und Cannabinoidrezeptor-defiziente ($CB^{-/-}$) Mäuse sowie $CB^{ffCaMKII\alpha Cre}$ Tieren und deren homozygoten Wildtypgeschwister. Die Mittelwerte (MW) der jeweiligen Gruppe und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) werden für jeden Parameter berechnet.

1.7 Körpergewicht, Atemfrequenz und Herzfrequenz

Das Körpergewicht, die Atemfrequenz und der Herzfrequenz werden während der Anästhesie jeweils vor dem Wechsel in eine andere Isoflurankonzentration dokumentiert. Durch Errechnen der Mittelwerte, (MW) unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Standardabweichungen ($\pm SD$), beider Gruppen werden herausgearbeitet.

Tabelle 3 Übersicht über die Messparameter Körpergewicht, Atem- und Herzfrequenz (MW \pm SD). $CB1^{-/-}$ (n=13), $CB1^{+/+}$ (n=13), $CB1^{ff;CaMKII\alpha Cre}$ (n=12), $CB1^{ff}$ (n=12)

Strain (Anzahl der Tiere)	Körpergewicht (g)		Atemfrequenz (min^{-1})		Herzfrequenz (Schläge/min)	
	MW \pm SD	p	MW \pm SD	p	MW \pm SD	p
$CB1^{-/-}$ (13)	26 \pm 2	p= 0,003	124 \pm 10	p < 0,001	528 \pm 24	p < 0,001
$CB1^{+/+}$ (13)	28 \pm 2		116 \pm 11		473 \pm 27	
$CB1^{ffCaMKII\alpha Cre}$ (12)	27 \pm 2	p= 0,043	112 \pm 9	p < 0,001	516 \pm 24	p < 0,001
$CB1^{ff}$ (12)	29 \pm 2		103 \pm 14		500 \pm 47	

1.7.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere wird unmittelbar vor Versuchsbeginn gemessen, notiert und schließlich der Mittelwert (mW) beider Gruppen berechnet.

Tabelle 4 Messparameter Körpergewicht (MW±SD). $CB1^{-/-}$ (n=13), $CB1^{+/+}$ (n=13), $CB1^{f/f;CaMKII\alpha Cre}$ (n=12), $CB1^{f/f}$ (n=12)

Strain (Anzahl der Tiere)	Körpergewicht (g)	
$CB1^{-/-}$ (13)	26 ± 2	p= 0,003
$CB1^{+/+}$ (13)	28 ± 2	
$CB1^{f/f;CaMKII\alpha Cre}$ (12)	27 ± 2	p= 0,043
$CB1^{f/f}$ (12)	29 ± 2	

Die Messparameter zeigen deutlich, dass das durchschnittliche Körpergewicht der $CB1$ -defizienten Tiere signifikant niedriger ist, als das ihrer Wildtyp-Artgenossen.

Gleiches spiegelt sich auch bei der zweiten Testgruppe wieder: Auch bei den $CB1^{f/f;CaMKII\alpha Cre}$ Mäusen ist das Körpergewicht niedriger als das ihrer Wildtyp-Geschwister ($CB1^{f/f}$).

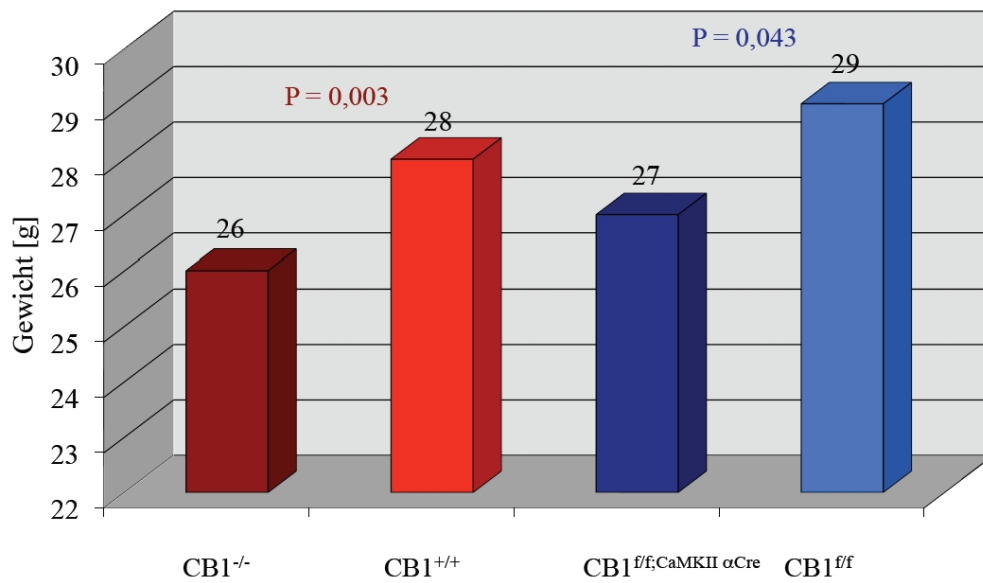


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung (MW±SD) des Gewichts in Gramm (g) aller vier Versuchsgruppen unmittelbar vor der Narkose. Signifikanz (*) p=0,003, p= 0,043

1.7.2 Atemfrequenz

Die Atemfrequenz (AF) der Versuchstiere wird während der Dauer der Narkose in regelmäßigen Abständen kontrolliert und notiert. Aus diesen Werten wird ein Mittelwert pro Tier gebildet, das dann wiederum in den Durchschnittswert der beiden Gruppen mit einfließt.

Tabelle 5 Messparameter Atemfrequenz (MW±SD). CB1^{-/-} (n=13), CB1^{+/+} (n=13),

CB1^{f/f;CaMKII α Cre} (n=12), CB1^{f/f} (n=12)

Strain (Anzahl der Tiere)	Atemfrequenz (min ⁻¹)	
CB1 ^{-/-} (13)	124 ± 10	p
CB1 ^{+/+} (13)	116 ± 11	
		< 0,001
CB1 ^{f/f;CaMKIIαCre} (12)	112 ± 9	p < 0,001
CB1 ^{f/f} (12)	103 ± 14	

Bei den CB1^{-/-} Mäusen liegt die durchschnittliche Atemfrequenz höher als die ihrer Wildtypwurfgeschwister.

Bei den CB1^{f/f;CaMKII α Cre} Mäusen ist die Atemfrequenz höher als die der Kontrolltiere.

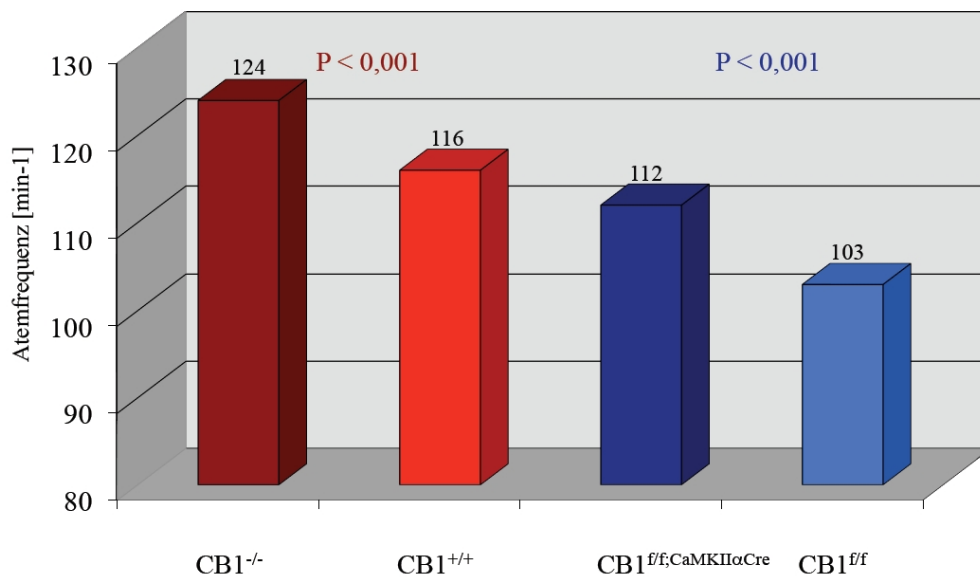


Abbildung 11: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) der Atemfrequenz (AF) pro Minute (min) aller vier Versuchsgruppen während der Narkose. Signifikanz (*) $p < 0,001$

1.7.3 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wird ebenfalls während der Dauer der Narkose in regelmäßigen Abständen kontrolliert und protokolliert. Der Mittelwert jedes Tieres fließt dann in die Berechnung des Gesamtmittelwertes der beiden Gruppen ein.

Tabelle 6 Messparameter Herzfrequenz (MW±SD). CB1^{-/-} (n=13), CB1^{+/+} (n=13),

CB1^{f/f;CaMKII α Cre} (n=12), CB1^{f/f} (n=12)

Strain (Anzahl der Tiere)	Herzfrequenz (Schläge/min)	
CB1 ^{-/-} (13)	528 ± 24	p < 0,001
CB1 ^{+/+} (13)	473 ± 27	
CB1 ^{f/f;CaMKIIαCre} (12)	516 ± 24	p < 0,001
CB1 ^{f/f} (12)	500 ± 47	

Die CB1-defizienten Tiere haben eine Herzfrequenz von 528 Schlägen pro Minute. Bei den Wildtyp-Mäusen liegt diese mit 473 Schlägen pro Minute signifikant niedriger.

Bei den CB1^{f/f;CaMKII α Cre} Mäusen liegt die mittlere Herzfrequenz bei 516 Schlägen pro Minute. Auch hier ergab die Messung der Wildtyp-Geschwister einen im Vergleich deutlich niedrigeren Wert bei durchschnittlich 500 Schlägen pro Minute.

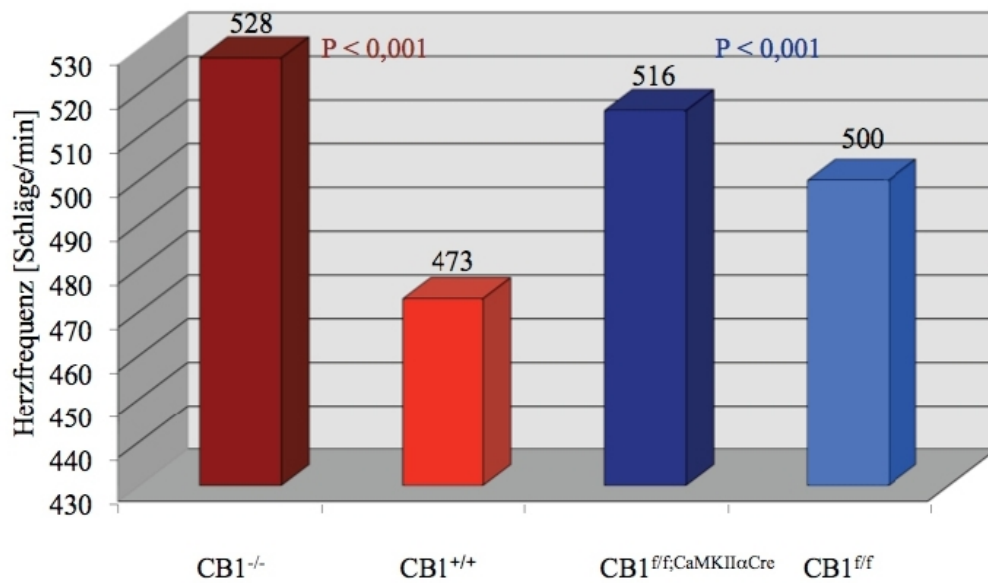


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) der Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro Minute (Schläge/min) aller vier Versuchsgruppen während der Narkose. Signifikanz (*) $p < 0,001$

1.8 MAC-Wert

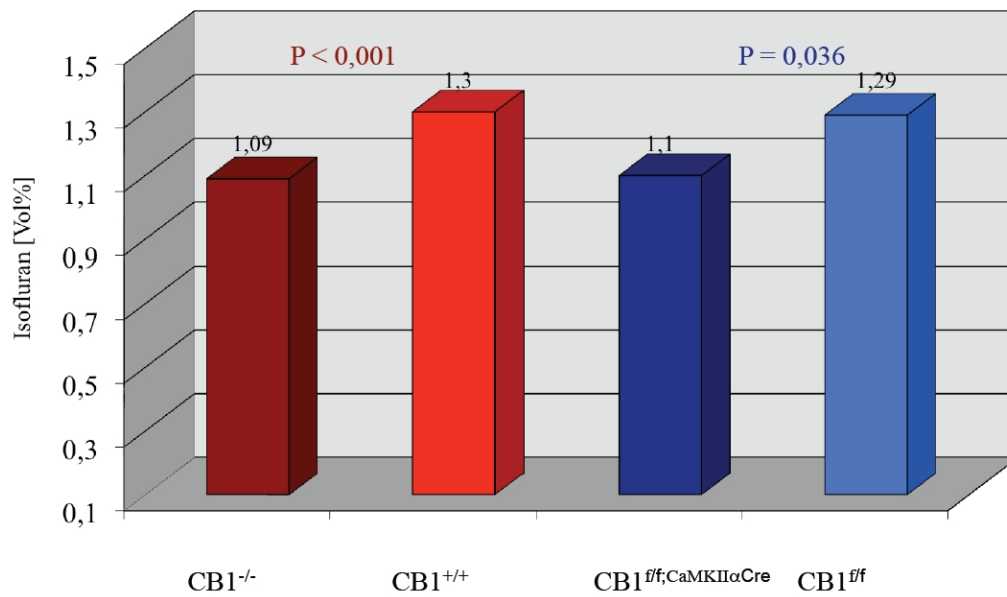
Der MAC-Wert wird in endexpiratorisch gemessen und in Vol% Isofluran angegeben. Der MAC-Wert wird für jedes Tier während der Narkose individuell ermittelt. Aus diesen Einzelwerten wird dann der Gesamtmittelwert (MW±SD) für jede Gruppe errechnet.

Tabelle 7 Übersicht über die Ergebnisse der MAC-Wertbestimmung

Strain (Anzahl der Tiere)	MAC-Wert	
CB1 ^{-/-} (13)	1,09 ± 0,14	p = 0,001
CB1 ^{+/+} (13)	1,30 ± 0,1	
CB1 ^{f/fCaMKIIαCre} (12)	1,10 ± 0,12	p= 0,036
CB1 ^{f/f} (12)	1,29 ± 0,27	

Bei den CB1^{-/-}-Mäusen wurde ein durchschnittlicher MAC-Wert von 1,09Vol% Isofluran gemessen. Die Wildtyp-Geschwister liegen mit einem MAC-Wert von 1,30Vol% Isofluran somit signifikant höher.

Die CB1^{f/fCaMKII α Cre} Mäuse benötigen durchschnittlich 1,10 Vol% Isofluran. Auch hier liegt der MAC-Wert der CB1^{f/f}-Tiere mit 1,29 Vol% Isofluran deutlich über dem Wert ihrer Wurfgeschwister-Mutanten.



**Abbildung 13: Vergleichende Darstellung (MW±SD) des errechneten MAC-Wertes.
Signifikanz: $p < 0,001$, $p = 0,036$**

4. Diskussion

1.9 Diskussion der Methoden

1.9.1 MAC-Wert Bestimmung

In der vorliegenden Studie wurde für jedes Tier der individuelle MAC-Wert ermittelt. Hierfür wird das Gaskemisch initial mit 2,0 Vol% Isofluran über 35 Minuten gehalten. Danach wird die Gaskonzentration zwischen 0,8-1,9Vol% reguliert. Der Wechsel wird in Schritten von 0,1-0,2Vol% durchgeführt. Die Dosierung wird 15 Minuten gehalten bevor eine erneute Messung stattfindet. In dieser Zeit können sich die Partialdrücke in den Alveolen, den Blutgefäßen und dem Gehirn angleichen damit die gemessene Isoflurankonzentration in der Ausatemluft auch der Konzentration im Gehirn entspricht. Diese Art von MAC-Wert-Ermittlung ergibt einen sehr individuellen Wert. Deshalb wird diese Methode in vielen Testreihen angewandt (EGER, 2002; SONNER, 2002).

Ursprünglich wurde zur Bestimmung des MAC-Wertes die Reaktion auf eine Hautinzision als definierter Schmerzstimulus gewertet. In einigen Studien stellte sich jedoch heraus, dass beispielsweise eine Reizung der Trachealschleimhaut bei der Intubation einen wesentlich stärkeren Reiz darstellt als eine Hautinzision. Deshalb wurden inzwischen verschiedene Stimuli zur MAC-Wertbestimmung verwendet. Man unterscheidet nicht-invasive von invasiven Methoden. Ein Vorteil der nicht-invasiven Methoden liegt dabei in der Unversehrtheit des Gewebes. Der daraus resultierende Schmerzreiz ist kurzfristig und sollte wenn möglich völlig reversibel sein, was vor allem bei einer wiederholten Bestimmung der Narkosetiefe bei unterschiedlichen Narkosegaskonzentrationen wichtig ist. Eine häufig angewendete nicht-invasive Methode ist das Setzen einer Klemme am rasierten Schwanz unterhalb der Schwanzwurzel (Tail-Clamp-Test) (EGER et al., 1965; RAMPIL et al., 1993). Ebenfalls häufig angewendet wird die elektrische Stimulation zur Eruiierung des MAC-Wertes. In einer Studie an Hunden von EGER et al. (1965) wurden diese Methoden und das Setzen einer Klemme an der Pfote beziehungsweise an der Zehe (Paw(Toe)-Clamp-Test) miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei dem Setzen der Schwanzklammer um den intensivsten Schmerzreiz handelt, während die Klammer an der

Zehe einen eher geringeren Schmerzreiz darstellt (EGER et al., 1965). Der Tail-Clamp-Test entspricht somit laut EGER et al. (1965) am ehesten dem Stimulus, der bei einem chirurgischen Eingriff gesetzt wird. Eine weitere vergleichende Studie, die ANTOGNINI et al. (1999) an Ratten durchgeführt haben, kommt jedoch zu einem anderen Ergebnis. Hier wurde vor allem auf die Stärke der Reaktion bei dem Tail-Clamp- und Paw-Clamp-Test geachtet. Obwohl sich der ermittelte MAC-Wert von beiden Testmethoden nicht unterschied, konnte beim Tail-Clamp-Test eine geringere Intensität in den Reaktionen beobachtet werden. Die erste Vermutung, dass die Ursache in der geringeren Sensibilität des Schwanzes zu sehen ist, erscheint unwahrscheinlich. Studien, bei denen der Reiz mit Hilfe von Hitze gesetzt wird, haben bei beiden Testmethoden denselben Schwellenwert erbracht (CARSTENS, 1993). Auch wurde in der Studie von ANTOGNINI et al. (1999) darauf geachtet, dass gleichmäßig viel Kraft beim Setzen des Reizes am Schwanz angewendet wurde, um mögliche Sensibilitätsunterschiede und damit Differenzen in den Ergebnissen auszuschließen. Aufgrund dieser Testresultate ist davon auszugehen, dass der Einsatz beider Testmethoden zur Evaluierung des MAC-Wertes geeignet ist, da die Homogenität der ermittelten Werte in beiden Testmethoden gewahrt bleibt. Auf eine gleichmäßig hohe Krafteinwirkung bei beiden Testmethoden muss jedoch geachtet werden (ANTOGNINI et al., 1999)

Die Ergebnisse weiterer Studien stellen dar, dass die Narkosevermittelte Immobilität, die mit Hilfe eines gesetzten Schmerzstimulus getestet wird, vor allem auf spinaler, aber auch auf übergeordneter Ebene im zentralen Nervensystem seinen Ursprung hat (ANTOGNINI et al., 1993; EGER et al. 1997; JINKS et al. 1999). In einer Studie von RAMPIL et al. (1994) änderte sich der MAC-Wert nach einer hypothermalen Schädigung des Rückenmarks im Bereich des Wirbels C7 nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies stellt die spinale Komponente der Narkose-vermittelten Immobilität in den Vordergrund. Basierend auf der speziellen Anatomie des Schafs war es in einer weiteren Studie möglich, Inhalationsnarkotika direkt in die zerebrale Zirkulation abzugeben. Der MAC-Wert für Isofluran lag hier deutlich höher als in der Vergleichsgruppe, in der Isofluran über den Atmungsstrakt aufgenommen wurde. Dies zeigt auf, dass die Narkose-vermittelte Immobilität sowohl supraspinalen- als auch spinalen Ursprungs ist (ANTOGNINI et al., 1993) Das Zusammenspiel beider Wirkmechanismen ist jedoch bisher noch nicht eindeutig erforscht. In beiden Studien wurde mit dem Paw-Clamp-Test (bzw. Dew-Claw-Clamp-Test) zur Überprüfung des MAC-Wertes gearbeitet, was die Nachvollziehbarkeit dieser Testmethode hervorhebt.

Unterschiede beim Anbringen der Klemme im Paw-Clamp-Test wurden in verschiedenen Studien dokumentiert. Einige Autoren bevorzugten das Anbringen der Klemme über allen Zehen (ANTOIGNINI et al., 1999), während andere die Klemme im Zwischenzehnbereich anbringen (ZUURBIER et al., 2002). Wichtig ist aber vor allem, dass immer an derselben Stelle getestet wird und der Kraftaufwand immer dergleiche bleibt. So sind die Tests nachvollziehbar und mögliche Abweichungen durch fehlerhafte Durchführung werden unterbunden.

Aus der Literatur kann man feststellen, dass die Wahl des bevorzugten Reizes mit der getesteten Tierart speziespezifisch ist. Bei Hunden und Ratten wird bevorzugt der Tail-Clamp-Test angewandt (EGER et al., 1965; RAMPIL et al., 1993; ZHANG et al., 2004; EGER et al., 2006), seltener wird er auch bei Mäusen eingesetzt (SONNER et al., 1999). Bei Mäusen und Gerbilen wird eher auf die Methode der Stimulation an der Pfote zurückgegriffen (HENKE et al., 2004).

Die genaue Definition der Reaktion, die nach dem Setzen der Pfotenklemme als positiv gewertet werden kann, ist von großer Bedeutung. Nur wenn eine Bewegung des Kopfes und/oder mehrerer Gliedmaßen erfolgt (EGER et al., 1965; RAMPIL et al., 1993), kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um einen Flexorreflex handelt. Dieser ist ein reiner Spinalreflex, der keinen Aufschluss über die Interaktion übergeordneter Zentren liefert. Bei Mäusen ist dieser Spinalreflex häufig bis in das chirurgische Toleranzstadium erhalten, was eine genaue Beurteilung zusätzlich erschwert (SMITH, 1993). Ein klassischer Flexorreflex ist das einfache Zurückziehen der Pfote. Aber auch ein einfaches Drehen des Kopfes ohne die Bewegung der Extremitäten kann nicht als positiv gewertet werden, da selbst bei hirntoten Menschen eine solche Reaktion nach dem Setzen eines Schmerzreizes beobachtet wurde (CHRISTIE et al., 1996). Eine solche Reaktion kann bei dem Ausfall jeglicher Hirnfunktionen jedoch nicht durch das zentrale Nervensystem koordiniert werden. Eine genaue Beobachtung des Tieres ist daher erforderlich, um diese Unterschiede in der Reaktion zu eruieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt in einer nachvollziehbaren und fehler-minimierenden Durchführung ist die Zeitdauer, über welche die Pfote geklemmt wird. In den bislang durchgeführten Studien reichen die Zeitspannen zehn Sekunden bis zu einer Minute. In der Studie von EGER et al. (1965) an Hunden galten 30 bis 40 Sekunden als angemessen, um eine adäquate Reaktion feststellen zu können. In einer weiteren Testreihe wird sogar eine Minute lang die Klemme gesetzt. Allerdings ist zu beachten, dass es sich dann meist um Studien an rückenmarksgeschädigten Tieren oder solchen, an denen größere invasive Eingriffe

vorgenommen wurden, handelt (RAMPIL, 1994; JINKS et al., 2005). In dem Versuch von ANTOGNINI et al (1999) wurde die Klemme 10 Sekunden gesetzt und erbrachte nachvollziehbare Ergebnisse. Sie verzichteten, bis auf das Legen eines Venenkatheters auf eine größere Manipulation neben dem Setzen des Schmerzstimulus.

In der vorliegenden Testreihe wird auf invasive Eingriffe verzichtet. Ein Legen eines Venenkatheters bedingt eine Hautinzision, die ebenfalls einen Schmerzstimulus darstellt und so die Ergebnisse verfälschen könnte (ANTOGNINI et al, 1999). In vielen Studien wird ein Hautschnitt per se zur MAC-Wertbestimmung als Stimulus genutzt (KEARSE et al., 1994; VERNON et al., 1995). Ein Verzicht auf Kanülierung von Gefäßen oder weitere Messungen, die eine solche Manipulation bedingen, wird deshalb in der vorliegenden Studie als sinnvoll erachtet. Diese Entscheidung wird auch dadurch gestützt, dass auch invasive Parametermessungen wie die des Blutdrucks oder der Blutsauerstoffgehalts eine invasiven Eingriff fordern. Zusätzlich ist nicht klar, ob ein Blutverlust, beispielsweise für die Blutgasanalyse, bei einem solch kleinen Tier nicht die Wirkung von Isofluran und anderer Vitalparameter beeinflusst und so Ergebnisse verfälscht. Aufgrund dieser Erkenntnis sieht man in der vorliegenden Studie von invasiven Eingriffen ab und hält 15 Sekunden für das Setzen der Klemme für ausreichend.

Isofluran wird in dieser Studie 35 Minuten angeflutet, bevor zum ersten Mal die Klemme gesetzt und die darauffolgende Reaktion protokolliert wird. Reagiert die Maus auf den Schmerzreiz, wird die Gaskonzentration um 15 bis 20% erhöht, ansonsten wird sie erniedrigt. Nach weiteren 15 Minuten, in denen der Wirkspiegel des Gases im Körper für diese Dosis erreicht wird und sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, erfolgt eine erneute Messung. Diese Testdurchführung wurde bereits in etlichen Versuchsreihen so durchgeführt. In einer der ersten Studien von EGER et al. (1965) wurde für Halothan eine Zeitspanne von 15 Minuten nach dem Wechsel der Narkosegaskonzentration für ausreichend erachtet, um einen Steady State für die Halothan-Partialdrücke im Blut, in den Alveolen und in den gut durchbluteten Geweben zu erreichen. Studien mit Isofluran untermauern dieses Vorgehen und bestätigen, dass bei Stabilität der Parameter, von Gasaustausch und Hämodynamik, ein 15 Minuten-Intervall von gleichbleibender Isoflurankonzentration als ausreichend erachtet werden kann (QUASHA et al., 1980; JINKS et al., 2005)

Eine physiologische Körpertemperatur wurde in der eigenen Untersuchung während der gesamten Narkosedauer in engen Grenzen gehalten. Andere Studien zeigen, dass der MAC-Wert eines Tieres durch die Körpertemperatur stark beeinflussbar ist. EGER et al. (1965)

beobachteten bei Hunden unter Halothannarkose eine Erniedrigung des MAC-Wertes um 50% bei gleichzeitiger Absenkung der Körpertemperatur um 10°C. Bei einer anderen Testreihe konnte bei Ratten unter Isoflurannarkose ein ähnliches Ergebnis erzielt werden (VITEZ et al., 1974). Eine Temperaturkontrolle mit Hilfe einer rektalen Sonde wird in mehreren Studien beschrieben (RAMPIL, 1994; SONNER et al., 1999; DUTTON et al., 2006). Die Methode zur Messung der Körpertemperatur ist bei Mäusen gut anwendbar und wird deshalb auch in der vorliegenden Versuchsreihe eingesetzt.

Der Einfluss des gewählten, spezifischen Mausstammes auf den MAC-Wert wurde in einer Versuchsreihe 1999 untersucht. Die MAC-Werte verschiedener Narkosegase, sowie die Vitalparameter wurden bei Tieren unterschiedlicher Mausstämme ermittelt. Sie variieren je nach Mäusestamm um 19 – 39 %. Dies deutet auf eine genetische Komponente bezüglich der Wirksamkeit des Narkosegases hin (SONNER et al., 1999) In der vorliegenden Studie wurden deshalb Tiere des gleichen Mausstammes und ihre transgenen Wurfgeschwister verwendet, um eine Beeinflussung des MAC-Wertes, verursacht durch Verwendung verschiedenener Mausstämme, ausschließen zu können.

1.9.2 Das Cannabis-Mausmodell

In den letzten Jahren konnten durch die Entwicklung homozygoter *Knockout*-Mäuse insbesondere in der Rezeptorforschung neue Ergebnisse erzielt werden. Allerdings birgt diese Art der Forschung auch Risiken. Inwieweit *Knockout*-Tiere außer des Fehlens eines Rezeptortyps noch andere Veränderungen aufweisen, wird bereits erforscht.

Eine wichtige Rolle scheint zum einen die Wahl des Hintergrundstammes zu sein. In dem ersten Teil dieser Studie wurde der C57BL/6NCrl-Stamm als Hintergrund verwendet. Von anderen Arbeitsgruppen werden Mutanten mit C57BL/6J-Hintergrund (ZIMMER et al., 1999) und CD1-Hintergrund (LEDENT et al., 1999) bei der Erforschung des Endocannabinoidsystems genutzt. Dabei fand man heraus, dass es bei Verhaltenstests zur Angstkonditionierung gewisse Diskrepanzen in den Ergebnissen im Vergleich mit den verwendeten Hintergrundstämmen gab. Es werden für Offenfeld-, Rotarod- und Angstkonditionierungstests vor allem BL6- und 129-Hintergrundstämme für genetische Manipulationen empfohlen (BOTHE et al., 2004), um möglichst homogene Ergebnisse zu erzielen. Eine Studie von KAMPRATH und WOTJAK (2004), die sowohl mit dem C57BL/6JolaHsd-Hintergrundstamm als auch mit C57BL/6NCrl-Tieren testeten, bestärkt mit

ihren Ergebnissen diese Theorie. Die Versuchsreihe bezog sich auf die Extinktion der Furchtkonditionierung. Hierbei kam es bei dem C57BL/6J OlaHsd-Hintergrundstamm zu weitaus homogeneren Ergebnissen, was auf eine genetische Beeinflussung schließen lässt (KAMPRATH und WOTJAK, 2004).

Interessant ist auch, dass die Veränderung am CB1-Gen das Lernvermögen zu beeinflussen scheint. CB1^{-/-}-Mäuse verlieren mit zunehmendem Alter schneller ihre kognitiven Fähigkeiten als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister. Während die Mäuse in einem Alter von 6 bis 7 Wochen noch gleich schnell lernten, zeigten bei den älteren Gruppen (3 bis 5- und 14 bis 17 Monate) die adulten CB1^{-/-}-Mäuse (3 bis 5 Monate) Lerndefizite, die denen der ältesten Wildtyp-Wurfgeschwister entsprachen. Bei den histologischen Untersuchungen der Gehirne konnte eine interessante Parallele festgestellt werden: Die zunehmende kognitive Beeinträchtigung bei den CB1^{-/-}-Mäusen ging einher mit dem Verlust von Neuronen in den Hippocampusregionen CA1 und CA3. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass das endocannabinoide System eine neuroprotektive „Schutzfunktion“ innehat, worin die CB1-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen (MARSICANO et al., 2003; BILKEI-GORZO et al., 2005).

Auch durch die direkte Deletion des Rezeptors scheinen Schädigungen aufzutreten. ZIMMER et al. (1999) berichteten in einer Studie von einer höheren Mortalität CB1-Rezeptor-defizienter Mäuse innerhalb der ersten 24 Lebenswochen, als die ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister. Die Ursache dieser vermehrten plötzlichen Todesfälle konnte nicht ermittelt werden. Die Tiere erscheinen bis zum plötzlichen Tod vollkommen gesund und unterschieden sich in ihrer Fertilität nicht von den Wurfgeschwistern. Die Ursache dieser vermehrten Todesfälle konnte auch nach eingehender pathologischer Untersuchung nicht geklärt werden (ZIMMER et al., 1999).

Bei der Züchtung solcher transgener Tiere sollten weitere Risiken beachtet werden. Vor allem auch die Möglichkeit einer genetischen Kompensation kann zur Verfälschung von Ergebnissen führen. In einer Studie von HAJOS et al. (2001) wurde an CB1-Rezeptor-defizienten Tieren und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern mit Hilfe des CB1-Agonisten WIN 55,212-2 die Interaktion zwischen dem inhibitorischen und exzitatorischen System getestet. Es kam trotz des Fehlens eines Rezeptors bei den *Knockout*-Tieren zu einer Beeinflussung des glutamatergen Systems. Es wurde daraufhin vermutet, dass diese Wirkung einem neuen cannabinoidsensitiven Rezeptor zugeschrieben werden könnte. In einem weiteren Versuch von DOMENICI et al. (2006) wurden CB1-Teilmutanten (CB^{f/fCaMKII α Cre}-Mäuse) verwendet,

welche in den Hauptneuronen des basalen Vorderhirns keinen CB1-Rezeptor ausbilden. Die Exprimierung des Rezeptors in den kortikalen GABAergen Interneuronen jedoch bleibt erhalten (MARSICANO et al., 2003). Die Ergebnisse nach dem Einsatz von WIN 55,212-2 zeigen bei DOMENICI et al. (2006) keinen Hinweis auf einen möglichen neuen Cannabinoidrezeptor. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in einer genetischen Kompensation liegen. Der Körper kann embryonal auf das Fehlen eines Rezeptors mit der Bildung eines neuen Rezeptortyps, der ähnliche Funktionen des entfernten Gens übernimmt, reagieren.

Ebenfalls möglich ist, dass die flankierenden Bereiche der entfernten Gensequenz in Mitleidenschaft gezogen werden und so zu Veränderungen führen, die fälschlicherweise dem entfernten Genkomplex zugeschrieben werden (ROUTTENBERG, 2002; CRUSIO, 2004). Der Einsatz von $CB^{f/fCaMKII\alpha Cre}$ Mäusen birgt keine Gefahren im Bezug auf Veränderungen im embryonalen Entwicklungsprozess. Das Gen wird von postmitotischen Zellen exprimiert. Weitere Rekombinationen des Gens finden vornehmlich in späten embryonalen, beziehungsweise frühen postnatalen Stadien statt. Auch handelt es sich um keine große Deletion eines Genareals, was die Risiken ebenfalls minimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der MAC-Wert sowohl bei $CB1^{-/-}$ Mäusen, als auch bei $CB^{f/fCaMKII\alpha Cre}$ Mäusen ermittelt. Eine Kompensationsmutation scheint aufgrund der homogenen Ergebnisse nicht vorzuliegen.

1.10 Diskussion der Ergebnisse

1.10.1 Herzfrequenz

Endocannabinoide beeinflussen auf vielfältige Weise das kardiovaskuläre System. In der Peripherie wird eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung aus postganglionär-sympathischen Neuronen durch die Aktivierung präsynaptisch gelegener CB1-Rezeptoren angenommen. Durch mehrere Studien wird die Richtigkeit dieser Behauptung untermauert. Bei NIEDERHOFFER und SCABO (1999) wurde durch Gabe eines CB1-Rezeptoragonisten ein Noradrenalinpiegelabfall und ein daraus resultierendes Sinken des Blutdrucks beobachtet. Durch den intravenösen Einsatz von Noradrenalin konnte der Blutdruck wieder normalisiert werden (VARGA et al., 1996; NIEDERHOFFER und SZABO, 1999).

Zentral verursachte kardiovaskuläre Effekte durch das endocannabinoide System werden ebenfalls angenommen. Auch hier wird eine Sympathikushemmung, allerdings zentral verursacht, als Ursache gesehen. Eine Studie, bei der Ratten direkt intracisternal CB1-Rezeptoragonisten injiziert wurde, resultierten in einem Noradrenalinpiegel- und Blutdruckanstieg und einem Sinken der Herzfrequenz (PFITZER et al., 2004).

In der vorliegenden Studie konnte bei beiden Gruppen, den CB^{-/-}- und den CB^{f/fCaMKII α Cre}-Mäusen eine erhöhte Herzfrequenz gemessen werden. Die Wildtypwurfgeschwister zeigten eine deutlich niedrigere Herzfrequenz. Deshalb wird ein durch das endocannabinoide System verursachter Effekt vermutet. Isofluran besitzt zwar ebenfalls eine Wirkung auf das Herzkreislaufsystem, allerdings wäre hier eher eine Erhöhung der Herzfrequenz bei beiden Gruppen zu erwarten gewesen (JENSEN et al., 1992; MUTSCHLER und SCHUBERT-ZSILAVECZ, 2001). Eher wahrscheinlich ist eine Absenkung der Herzfrequenz durch eine zentral verursachte Sympathikushemmung. Bei den CB^{-/-}-Mäusen fehlt das Gen für die Bildung des CB1-Rezeptors vollständig. Somit kann die Erhöhung der Herzfrequenz hier auch durch das Fehlen der peripher lokalisierten CB1-Rezeptoren verursacht werden. Allerdings zeigen die Selektivmutanten CB^{f/fCaMKII α Cre} ebenfalls eine Erhöhung der Herzfrequenz gegenüber der Kontrollgruppe. Da diese nur in bestimmten Hirnarealen keine CB1-Rezeptoren exprimieren spricht dies hier für eine zentral verursachte Sympathikushemmung durch CB1-Rezeptoren.

1.10.2 Atemfrequenz

Neben den kardiovaskulären Effekten lösen intracisternal injizierte CB-Rezeptoragonisten eine Erniedrigung der Atemfrequenz, des Atemminuten- sowie des Atemzugvolumens aus (PERTWEE, 1999). Neuere Studien deuten durch den Einsatz selektiver CB1-Rezeptoragonisten, die ebenfalls direkt intracisternal gegeben wurden, darauf hin, dass die atemdepressive Wirkung durch eine Aktivierung der CB1-Rezeptoren im Hirnstamm ausgelöst wird. Allerdings kann auch eine peripher wirksame Komponente nicht ausgeschlossen werden (PADLEY et al., 2003; PFITZER et al., 2004)

In der vorliegenden Studie zeigen beide Mutantengruppen eine leicht erhöhte Atemfrequenz gegenüber den Kontrolltieren, die aber nicht signifikant unterschiedlich ist. Auch hier wäre eher eine zentrale Wirkung der CB1-Rezeptoren auf die Atemfrequenz zu erwarten, da eine periphere CB1-Rezeptordefizienz bei einer Gruppe ausgeschlossen werden kann.

1.10.3 Körpergewicht

Ein Zusammenhang zwischen dem endocannabinoiden System und dem des Körpergewichtes stellten WILLIAMS und KIRKHAM schon 1999 mit Hilfe des CB1-Rezeptoragonisten Anandamid und dem Antagonisten Rimonabant fest. HAO et al. (2000) testeten ein Jahr später mit CB1-defizienten Mäusen und untermauerten diesen Aspekt. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher noch unbekannt, aber ein regulatorischer Effekt auf das Hungerzentrum wird angenommen (WILLIAMS und KIRKHAM, 1999; HAO et al., 2000).

Ein zweiter, ebenfalls wichtiger Aspekt darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Tiere denen ein Teil des Genmaterials entfernt wurde, erlangen häufig ein geringeres Gewicht als das der genetisch intakten Kontrolltiere. Die genaue Ursache ist unbekannt (THULLIER et al., 1997)

Ein Einfluss des Körpergewichts beim Einsatz von volatilen Anaesthetika ist bereits mehrfach erforscht worden. So zeigten GONG et al. (2003) in einer Studie auf, dass Personen mit einem höherem Body Mass Index auch einen höheren F_I/F_A Quotienten (Verhältnis der inspiratorischen Konzentration Narkosegas/Konzentration in den Alveolen) aufweisen. Diese Beobachtung wurde 2008 in einer weiteren Studie von LEMMONS et al. bekräftigt. Hier

wurden sowohl der F_D/F_A Quotient (Verhältnis der vom Verdampfer abgegeben Konzentration Narkosegas/Konzentration in den Alveolen), als auch der F_I/F_A Quotient während einer Isoflurannarkose ermittelt. In beiden Fällen lagen die Quotienten der fettleibigen Patienten über denen der normalgewichtigen Probanden.

Isofluran besitzt einen hohen Blut-Fettverteilungskoeffizienten. Von SALZ (2003) wurde bei adipösen Patienten dargestellt, dass die Aufwachphasen nach Isoflurannarkosen deutlich länger andauern als bei Desfluran. Eine Erklärung hierfür ist der hohe Blut-Fettverteilungskoeffizient von Isofluran. Es kommt während der Narkose zur vermehrten Speicherung von Isofluran im Fettgewebe, welches nach Beendigung der Narkose wieder ins Blut abgegeben werden kann.

Bei adipösen Patienten spielen neben der Folgen der guten Fettlöslichkeit von Isofluran noch andere Faktoren, die den MAC-Wert beeinflussen könnten, eine Rolle. Die funktionelle Residualkapazität (FRC), das Herzkreislaufsystem und auch andere Organfunktionen werden beeinflusst (SALZ, 2003; EGER et al. 2005).

In der vorliegenden Studie zeigen sowohl die $CB^{-/-}$ -Mäuse, als auch die $CB^{f/fCaMKII\alpha Cre}$ Tiere ein niedrigeres Körpergewicht im Vergleich ihrer Wildtyp-Wurfgeschwistern. Die Wildtyp-Wurfgeschwister wiesen jedoch keine Adipositas auf, sodass eine signifikante Beeinflussung des Fettgewebes auf den MAC-Wert nicht zu erwarten ist.

Als Erklärung hierfür wird der regulatorische Effekt von Endocannabinoiden auf das Hungerzentrum beziehungsweise auf die Futteraufnahme durch den CB1-Rezeptor angenommen.

1.10.4 MAC-Wert

Sowohl Isofluran als auch das Endocannabinoidsystem wirken indem sie die Gehirnaktivität verändern. Inwieweit sie sich jedoch gegenseitig beeinflussen ist bisher nicht erforscht.

Die Wirkung von Isofluran auf das GABAerge System ist hinreichend untersucht und zeigt auf, dass durch das Gas die Bindung von GABA an den $GABA_A$ -Rezeptoren forciert und verlängert wird. Bei BANKS und PEARCE (1999) zum Beispiel wurden die GABAergen inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSP) in den CA1-Pyramidalneuronen während

der Isoflurannarkose gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass auch das exzitatorische System von Isofluran moduliert wird (BANKS und PEARCE, 1999; NISHIKAWA und MACIVER, 2001). Das Endocannabinoidsystem besitzt ebenfalls einen regulierenden Einfluss auf diese Neurotransmittersysteme.

Über eine mögliche Rolle der CB1-Rezeptoren bei der Wirksamkeit einer Gasnarkose ist bisher wenig veröffentlicht worden. In vorangegangenen unspezifischen Testreihen mit verschiedenen Inhalationsanästhetika wurde eine solche Beeinflussung des MAC-Wertes durch THC zwar untersucht, ohne jedoch die neurophysiologischen Grundlagen der eingesetzten Stoffe genau zu kennen. Der MAC-Wert sank allerdings immer nach der Gabe von THC (STOELTING et al., 1973; VITEZ et al., 1973, 1974).

Im ersten Versuchsabschnitt der vorliegenden Studie wurde eine Narkose mit CB1-Rezeptordefizienten Mäusen und homozygoten Wildtyptieren durchgeführt und der individuelle MAC-Wert ermittelt. Der Wert der CB1-rezeptordefizienten Tiere lag im Durchschnitt 0,29 Vol% unter dem Wert der Wildtypwurfgeschwister. Der erniedrigte MAC-Wert deutet somit eindeutig auf eine Korrelation zwischen Isofluran und CB1-Rezeptoren hin.

Eine mögliche Erklärung wäre die Interaktion des CB1-Rezeptorsystems mit dem GABAergen Neurotransmittersystem, das den Hauptwirkort von Isofluran darstellt. Bei BANKS und PEARCE (1999) zum Beispiel wurden die GABAergen IPSP in den CA1-Pyramidalneuronen während der Isoflurannarkose gemessen. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass dieses Inhalationsnarkotikum die GABAerg induzierten IPSPs noch verstärkt und so die Narkose induziert. Eine weitere Testreihe differenziert die Wirkung von Isofluran noch genauer (BANKS und PEARCE, 1999). SONNER et al. (2005) stellten dar, dass eine Untereinheit des GABAergen Rezeptors ganz besonders auf das Inhalationsanästhetikum Isofluran anspricht. Sie nutzten *Knockout*-Mäuse, die die Untereinheit Alpha1 überhaupt nicht, und solche, die sie nicht im Hippocampus, dem Cortex und der Amygdala exprimieren. Beide Gruppen waren signifikant weniger sensitiv auf die anästhetischen Effekte von Isofluran, was darauf schließen lässt, dass das GABAerge System und speziell diese Untereinheit des Rezeptors mit Isofluran interagiert (NEUMAHR et al., 2000). Das endocannabinoide System beeinflusst das GABAerge System ebenfalls wie in folgender Studie aufgeführt werden kann: AZAD et al. (2003) testeten die synaptische Transmission an der Amygdala mit Hilfe des CB1-Rezeptoragonisten WIN 55,212-2. Eine reduzierte GABAerge Transmission konnte beobachtet werden. Da sowohl Isofluran als auch das Endocannabinoidsystem mit dem GABAergen Neurotransmittersystem interagieren, ist die

Theorie einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung wahrscheinlich und diene als Hypothese für die vorliegende Untersuchung, die anhand der gezeigten Ergebnisse auch bewiesen werden konnte. In der Studie von AZAD et al. (2003) wurde allerdings auch eine Korrelation zwischen endocannabinoiden und glutamatergem System vermutet. Dass Isofluran seine Wirkung auch durch eine Inhibition des exzitatorisch wirkenden glutamatergen Systems entfaltet, darauf deuten neuere Untersuchungen hin (DE SOUSA et al., 2000; NISHIKAWA und MACIVER, 2000). Im Einklang damit wurde in der vorliegenden Studie diese Wirkung in einer weiteren Testreihe untersucht und bestätigt.

Im eigenen Versuchsabschnitt wurde die Wirkung einer Narkose mit Isofluran auf $CB^{f/fCaMKII\alpha Cre}$ Mäuse und ihre Wildtypwurfgeschwister getestet. Diese genetisch veränderten Mäuse exprimieren keinen CB1-Rezeptor in den glutamatergen Neuronen des Vorderhirns. In den kortikalen GABAergen Interneuronen bleibt der Rezeptor jedoch erhalten (MARSICANO et al., 2003). Auch hier lagen die MAC-Werte der transgenen Tiere mit einem Unterschied von 0,19 Vol% deutlich unter denen der homozygoten Wildtyp-Mäuse.

Die zweite Versuchsreihe mit den $CB^{f/fCaMKII\alpha Cre}$ Mäusen zeigt also ähnliche Unterschiede in den gemessenen MAC-Werten wie die Testreihe mit den $CB^{-/-}$ -Mäusen, obwohl die CB1-Rezeptoren bei dem zweiten Test in den GABAergen Interneuronen des corticalen Bereiches noch vorhanden sind. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der beeinflussende Effekt des Endocannabinoidsystems auf die Isoflurannarkose nicht auf dem GABAergen System alleine, sondern in der zusätzlichen Interaktion mit einem anderen Neurotransmitter zu finden ist.

Man kann annehmen, dass die Verminderung des MAC-Wertes in der Beeinflussung des endocannabinoiden- auf das glutamaterge System zu suchen ist. Allerdings ist die genaue Art der Interaktion noch nicht vollständig nachvollziehbar. Das glutamaterge System wird bei einer Isoflurannarkose inhibitorisch beeinflusst; die exzitatorischen Aktionspotentiale werden herabgesetzt (DE SOUSA et al., 2000; NISHIKAWA und MACIVER, 2000). Das endocannabinoid System besitzt eine ähnliche Wirkung auf die glutamatergen EPSPs. Die Ausschüttung von Glutamat wird über die Aktivierung des CB1-Rezeptors verhindert und somit wird der Bildung weiterer EPSPs entgegengewirkt. Dies konnte schon in früheren Veröffentlichungen bestätigt werden. AZAD et al. (2003) ermittelten in der lateralen Amygdala nicht nur eine CB1-Rezeptor-vermittelte Reduktion GABAerger, sondern auch glutamaterger synaptischer Transmission (AZAD et al., 2003; TAKAHASHI und CASTILLO, 2006). Einer kürzlich erschienenen Arbeit von DOMENICI et al. (2006) zufolge kontrolliert der CB1-Rezeptor präsynaptisch die Ausschüttung von Glutamat und wirkt so negativ auf die

Bildung weiterer EPSP's. Sowohl Endocannabinoid, als auch Isofluran können also denselben Effekt auf das glutamaterge System haben. Eine mögliche Erklärung für den niedrigeren MAC-Wert bei $CB^{fCaMKII\alpha Cre}$ Mäusen könnte das Fehlen der Endocannabinoid-induzierten Verminderung der exzitatorischen Inputs auf inhibitorische GABAerge Interneurone sein. Somit wäre die Lokalisation der Interaktion Isofluran und CB1-Rezeptor in den exzitatorisch wirksamen Pyramidalneuronen zu finden.

1.11 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Obwohl das endocannabinoide System bisher noch wenig erforscht ist bietet es aufgrund seiner vielfältigen Aufgaben und Einflüsse bereits viele mögliche Therapieansätze, zum Beispiel in der Schmerztherapie.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals eine Interaktion des Endocannabinoidsystems mit der Isoflurannarkose nachgewiesen. Da sowohl die Narkose, als auch das endocannabinoide System das Gedächtnis beeinflussen können soll nun in weiteren Studien ermittelt werden, welche Auswirkungen diese Interaktion auf Lernen und Gedächtnis hat.

5. Zusammenfassung

Der Einfluss des endocannabinoiden Systems auf den MAC-Wert von Isofluran - Untersuchung in einem transgenen CB1-defizienten Mausmodell

Das endocannabinoid System spielt eine entscheidende Rolle bei vielen Abläufen in unserem Körper und bietet bei einigen Erkrankungen neue Therapieansätze. Im Gehirn kontrollieren Endocannabinoide die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Transmission. Die Aktivierung von CB1-Rezeptoren führt in den meisten Gehirnregionen zu einer Verminderung der GABAergen Inhibition der synaptischen Transmission. Demgegenüber erhöhen volatile Anästhetika die GABAerge Inhibition. Deshalb sollte bei Defizienz des CB1-Rezeptors durch eine erhöhte GABAerge Inhibition die minimale alveoläre Konzentration (MAC) von Isofluran vermindert sein.

MAC-Werte von Isofluran wurden bei Mäusen ermittelt, die keine CB1-Rezeptoren besitzen (CB1^{-/-}), sowie bei Mäusen mit einer konditionalen Mutation, bei denen der CB1-Rezeptor nur in den glutamatergen Neuronen des Vorderhirns fehlt, aber die Expression in den kortikalen GABAergen Interneuronen intakt ist (CB1^{f/fCaMKII α Cre}).

Die Anästhesie wurde mit Isofluran in einem Sauerstoff/Luftgemisch eingeleitet. Über eine kontinuierlich durchströmte Nasenkammer (3 l/min) atmeten die Mäuse dann zuerst spontan ein 2,0Vol% Isofluran/ Sauerstoff/Luftgemisch (FiO₂ = 0.5). Die Konzentrationen von Isofluran wurden dann stufenweise zwischen 0,8 und 1,9 Vol% variiert, die motorische Reaktion mit Hilfe des Zehenklemmentests geprüft, um speziesspezifisch den genauen MAC-Wert ermitteln zu können. Atem- und Herzfrequenz wurden ebenfalls bei jeder Messung kontrolliert. Wärmezufuhr unter Kontrolle einer rektalen Temperatursonde gewährleisteten eine stabile Temperatur. Sowohl CB1^{-/-} Mäuse, als auch die Tiere der CB1^{f/fCaMKII α Cre} Gruppe zeigten Unterschiede in Herz- und Atemfrequenz, Gewicht und MAC-Wert im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern.

Die Herzfrequenz bei den CB1^{-/-} Mäuse und CB1^{f/fCaMKII α Cre} Tieren war während der Narkose höher als die ihrer homozygoten Geschwisterwildtypiere (CB1^{-/-} 528 \pm 24 Schläge/min vs. Wildtyp 473 \pm 25 Schläge/min; p < 0.001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 516 \pm 24 Schläge/min vs. Wildtyp 500 \pm 47 Schläge/min; p < 0,001).

Die Atemfrequenz war bei beiden Mutanten nur leicht erhöht (CB1^{-/-} 124 ± 10 Atemfrequenz (min⁻¹) vs. Wildtyp 116 ± 11 Atemfrequenz (min⁻¹); p < 0,001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 112 ± 9 Atemfrequenz (min⁻¹) vs. Wildtyp 103 ± 14 Atemfrequenz (min⁻¹); p < 0,001).

Auch im Körpergewicht unterschieden sich die Testtiere. Sowohl die CB1^{-/-} Mäuse als auch die CB1^{f/fCaMKII α Cre}-Mäuse zeichneten sich durch ein niedrigeres Gewicht im Gegensatz zu den homozygoten Geschwisterwildtieren aus (CB1^{-/-} 26 ± 2 Gramm vs. Wildtyp 28 ± 2 Gramm; p = 0,003; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 27 ± 2 Gramm vs. Wildtyp 29 ± 2 Gramm; p = 0,043).

Die benötigte Isoflurankonzentration war bei den CB1^{-/-} Mäusen und CB1^{f/fCaMKII α Cre} Tieren geringer im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Diese benötigten mehr Isofluran, um eine adäquate Narkosetiefe zu erreichen (CB1^{-/-} 1.09 ± 0.14 Vol% vs. Wildtyp 1.30 ± 0.10 Vol%; p < 0,001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 1.10 ± 0.12 Vol% vs. Wildtyp 1.29 ± 0.27 Vol%; p = 0,036).

6. Summary

Interactions of isoflurane anesthesia with the endocannabinoid system in a transgenic CB1-deficient mouse-model

The endogenous cannabinoid system plays a crucial role in controlling neuronal excitability and synaptic transmission suggesting an option for cannabinoids as therapeutic agents. Activation of cannabinoid receptor 1 (CB1) decreases GABAergic inhibition of synaptic transmission within most brain regions, whereas volatile anesthetics enhance GABA_A receptor-mediated inhibition. Thus, deficiency of CB1 may increase GABAergic inhibition and consequently should decrease the minimal alveolar concentration (MAC) of isoflurane

We measured the MAC of isoflurane in mice lacking CB1 (CB1^{-/-}) and mice with a conditional mutation, expressing CB1 only on inhibitory GABAergic interneurons (CB1^{f/fCaMKII α Cre}).

Anesthesia was induced by isoflurane in oxygen/air. The mice's nose was put in a continuously flushed chamber (3 l/min) . There, the mice breathed isoflurane in air and oxygen (FiO₂ = 0.5) spontaneously. At first there was 2,0Vol% isoflurane over 35 minutes Then the concentration of isoflurane was varied between 0.8 and 1.9 Vol% and the motor reaction to toe-clamping was recorded. Furthermore, the rectal temperature was measured.

Both the CB1^{-/-} and the CB1^{f/fCaMKII α Cre} mice showed differences in heart rates, respiratory frequency, body weight and MAC when compared to the wild-type controls

Heart rate in CB1^{-/-} mice and CB1^{f/fCaMKII α Cre} animals higher under anesthesia when compared to wildtypes (CB1^{-/-} 528 \pm 24 rate/min vs. wildtype 473 \pm 25 rate/min; p < 0.001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 516 \pm 24 rate/min vs. wildtype 500 \pm 47 rate/min; p < 0,001).

The respiratory frequency showed only minimal differences between wildtype and CB1^{-/-} mice and CB1^{f/fCaMKII α Cre} animals CB1^{-/-} 124 \pm 10 respiratory rate (min⁻¹) vs. wildtype 116 \pm 11 respiratory rate (min⁻¹); p < 0.001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 112 \pm 9 respiratory rate (min⁻¹) vs. wildtype 103 \pm 14 respiratory rate (min⁻¹); p < 0.001).

Also body weight was different between testgroups. CB1^{-/-} mice and CB1^{f/fCaMKII α Cre} mice body weight was lower than the body weight of wildtypes (CB1^{-/-} 26 \pm 2 Gramm vs. wildtype 28 \pm 2 Gramm; p < 0.003; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 27 \pm 2 Gramm vs. wildtype 29 \pm 2 Gramm; p = 0.043).

Isoflurane concentration was lower in both, CB1^{-/-} and CB1^{f/fCaMKII α Cre} mice when compared to wildtypes, which needed more isoflurane to achieve an adequate anesthesia (CB1^{-/-} 1.09 \pm 0.14 Vol% vs. controls 1.30 \pm 0.10 Vol%; p < 0.001; CB1^{f/fCaMKII α Cre} 1.10 \pm 0.12 Vol% vs. controls 1.29 \pm 0.27 Vol%; p = 0.036).

7. Literaturverzeichnis

ALEF M , OECHTERDING G
Praxis der Inhalationsanästhesie
Enke Verlag
2003: 1-13

ANTOIGNINI JF, SCHWARTZ K
Exaggerated anesthetic requirements in preferentially anesthetized brain
Anesthesiology 1993; 79: 1244-1249

ANTOIGNINI JF, WANG XW, CARSTENS E
Quantitative and qualitative effects of isoflurane on movement occurring after noxious stimulation
Anesthesiology 1999; 91: 1064-71

AZAD SC, EDER M, MARSICANO G, LUTZ B, ZIEGLGANSBERGER W, RAMMES G
Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse
Learn Mem 2003; 10: 116-28

AZAD SC, MONORY K, MARSICANO G, CRAVATT BF, LUTZ B,
ZIEGLGANSBERGER W, RAMMES G
Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling
J Neurosci 2004; 24: 9953-61

BAKER D, PRYCE G, GIOVANNONI G, THOMPSON AJ
The therapeutic potential of cannabis
Lancet Neurol 2003; 2: 291-8

BANKS MI, PEARCE RA
Dual actions of volatile anesthetics on GABA(A) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects
Anesthesiology 1999; 90: 120-34

BILKEI-GORZO A, RACZ I, VALVERDE O, OTTO M, MICHEL K, SASTRE M, ZIMMER A
Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors
Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 15670-5

BOTHE HW, EVERS S, HUSSTEDT IW, GRALOW I, HURTER A, SCHILGEN M, WOLOWSKI A
["Facial pain" in german textbooks in pain medicine]
Schmerz 2004; 18: 218-20

BRACEY MH, HANSON MA, MASUDA KR, STEVENS RC, CRAVATT BF
Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling
Science 2002; 298: 1793-6

CADAS H, GAILLET S, BELTRAMO M, VENANCE L, PIOMELLI D
Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP
J Neurosci 1996; 16: 3934-42

CALANDRA B, PORTIER M, KERNEIS A, DELPECH M, CARILLON C, LE FUR G, FERRARA P, SHIRE D
Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor
Eur J Pharmacol 1999; 374: 445-55

CALIGNANO A, LA RANA G, GIUFFRIDA A, PIOMELLI D
Control of pain initiation by endogenous cannabinoids
Nature 1998; 394: 277-81

CARSTENS E
Quantitative assessment of nocifensive behavioral responses and the underlying neuronal circuitry
Schmerz 1993; 7: 204-15

CAVERO I, SOLOMON T, BUCKLEY JP, JANDHYALA BS
Studies on the bradycardia induced by (-)-trans-tetrahydrocannabinol in anesthetized dogs
Eur J Pharmacol 1973; 22: 263-9

CHANG YH, LEE ST, LIN WW
Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids
J Cell Biochem 2001; 81: 715-23

CHRISTIE JM, O'LENIC TD, CANE RD
Head turning in brain death
J Clin Anesth 1996; 8: 141-3

COHEN C, PERRAULT G, GRIEBEL G, SOUBRIE P
Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716)
Neuropsychopharmacology 2005; 30: 145-55

COHEN C, PERRAULT G, VOLTZ C, STEINBERG R, SOUBRIE P
SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats
Behav Pharmacol 2002; 13: 451-63

CONN PJ, PIN JP
Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997; 37: 205-37

CRAVATT BF, GIANG DK, MAYFIELD SP, BOGER DL, LERNER RA, GILULA NB
Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides
Nature 1996; 384: 83-7

CRUSIO WE

Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice
Biol Psychiatry 2004; 56: 381-5

DANYSZ W, PARSONS AC

Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications
Pharmacol Rev 1998; 50: 597-664

DE SOUSA SL, DICKINSON R, LIEB WR, FRANKS NP

Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon
Anesthesiology 2000; 92: 1055-66

DEADWYLER SA, HAMPSON RE, BENNETT BA, EDWARDS TA, MU J, PACHECO MA, WARD SJ, CHILDERS SR

Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons
Receptors Channels 1993; 1: 121-34

DEGROOT A, NOMIKOS GG

Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test
Eur J Neurosci 2004; 20: 1059-64

DEMING MV

Agents and techniques for induction of anesthesia in infants and young children
Curr Res Anesth Analg 1952; 31: 113-9

DE PETROCELLIS L, CASCIO MG, DI MARZO V

The endocannabinoid system: a general view and latest additions
Br J Pharmacol 2004; Mar 141(5): 765-74

DESPRES JP, GOLAY A, SJOSTROM L

Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia
N Engl J Med 2005; 353: 2121-34

DEVANE WA, DYSARZ FA, 3RD, JOHNSON MR, MELVIN LS, HOWLETT AC

Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain
Mol Pharmacol 1988; 34: 605-13

DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R

Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor
Science 1992; 258: 1946-9

DI MARZO V, GOPARAJU SK, WANG L, LIU J, BATKAI S, JARAI Z, FEZZA F, MIURA GI, PALMITER RD, SUGIURA T, KUNOS G

Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake
Nature 2001; 410: 822-5

DINGLELINE R, BORGES K, BOWIE D, TRAYNELIS SF
The glutamate receptor ion channels
Pharmacol Rev 1999; 51: 7-61

DINH TP, FREUND TF, PIOMELLI D
A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation
Chem Phys Lipids 2002; 121: 149-58

DOMENICI MR, AZAD SC, MARSICANO G, SCHIERLOH A, WOTJAK CT, DODT HU,
ZIEGLGANSBERGER W, LUTZ B, RAMMES G
Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the
forebrain controls glutamatergic synaptic transmission
J Neurosci 2006; 26: 5794-9

DE PETROCELLIS L., CASCIO MG., DI M.V.,
The endocannabinoid system: a general view and latest additions
Br J Pharmacol 2004; 141: 765-74

DUTTON RC, LASTER MJ, XING Y, SONNER JM, RAINES DE, SOLT K, EGER EI, 2ND
Do N-methyl-D-aspartate receptors mediate the capacity of inhaled anesthetics to suppress the
temporal summation that contributes to minimum alveolar concentration?
Anesth Analg 2006; 102: 1412-8

EGER EI, 2ND
Isoflurane: a review
Anesthesiology 1981; 55: 559-76

EGER EI, 2ND
A brief history of the origin of minimum alveolar concentration (MAC)
Anesthesiology 2002; 96: 238-9

EGER EI, 2ND, KOBLIN DD, HARRIS RA, KENDIG JJ, POHORILLE A, HALSEY MJ,
TRUDELL JR
Hypothesis: inhaled anesthetics produce immobility and amnesia by different mechanisms at
different sites
Anesth Analg 1997; 84: 915-8

EGER EI, LAWRENCE J, SAIDMAN MD
Illustrations of inhaled anesthetic uptake, including intertissue diffusion to and from fat
Anesth Analg 2005; 100: 1020-1033

EGER EI, 2ND, LIAO M, LASTER MJ, WON A, POPOVICH J, RAINES DE, SOLT K,
DUTTON RC, COBOS FV, 2ND, SONNER JM
Contrasting roles of the N-methyl-D-aspartate receptor in the production of immobilization by
conventional and aromatic anesthetics
Anesth Analg 2006; 102: 1397-406

EGER EI, 2ND, SAIDMAN LJ, BRANDSTATER B

Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency
Anesthesiology 1965; 26: 756-63

EISELE JH, EGER EI, 2ND, MUALLEM M
Narcotic properties of carbon dioxide in the dog
Anesthesiology 1967; 28: 856-65

ERHARDT W HENKE J, KROKER R
Inhalationsanästhetika
In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg.): Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heintier.
Stuttgart, Schattauer Verlag 2004

FACCHINETTI F, DEL GIUDICE E, FUREGATO S, PASSAROTTO M, LEON A
Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with
lypopolysaccharide
Glia 2003; 41: 161-8

GEBREMEDHIN D, LANGE AR, CAMPBELL WB, HILLARD CJ, HARDER DR
Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺
channel current
Am J Physiol 1999; 276: H2085-93

GERARD CM, MOLLEREAU C, VASSART G, PARMENTIER M
Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis
Biochem J 1991; 279 (Pt 1): 129-34

GLASS M, FELDER CC
Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP
accumulation in striatal neurons: evidence for a G_s linkage to the CB1 receptor
J Neurosci 1997; 17: 5327-33

GONG ZY, YE TH, HUANG YD, SANG NE, DUAN H, REN HZ
Influence of obesity on pharmacokinetics and pharmacodynamics of isoflurane
Zhongguo 2003; 25(5): 615-8

GREGORY GA, EGER EI, 2ND, MUNSON ES
The relationship between age and halothane requirement in man
Anesthesiology 1969; 30: 488-91

GREGORY GA, EGER EI, SMITH NT, CULLEN BF
The cardiovascular effects of carbon dioxide in man awake and during diethyl ether
anesthesia
Anesthesiology 1974; 40: 301-4

GUO J, IKEDA SR
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 2004; 65: 665-74

HAJOS N, LEDENT C, FREUND TF

Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus

Neuroscience 2001; 106: 1-4

HALLER J, VARGA B, LEDENT C, FREUND TF

CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents

Behav Pharmacol 2004; 15: 299-304

HANUS L, ABU-LAFI S, FRIDE E, BREUER A, VOGEL Z, SHALEV DE, KUSTANOVICH I, MECHOULAM R

2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor

Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 3662-5

HAO S, AVRAHAM Y, MECHOULAM R, BERRY EM

Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice

Eur J Pharmacol 2000; 392: 147-56

HAPFELMEIER G, HASENEDER R, EDER M, ADELSBERGER H, KOCHS E, RAMMES G, ZIEGLGANSBERGER W

Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block

Neurosci Lett 2001; 307: 97-100

HEINRICHER MM, MCGARAUGHTY S

Analysis of excitatory amino acid transmission within the rostral ventromedial medulla: implications for circuitry

Pain 1998; 75: 247-55

HENKE J, STRACK T, ERHARDT W

[Clinical comparison of isoflurane and sevoflurane anaesthesia in the gerbil (*Meriones unguiculatus*)]

Berl Munch Tierärztl Wschr 2004; 117: 296-303

HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC

Cannabinoid receptor localization in brain

Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 1932-6

HOHMANN AG, HERKENHAM M

Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves

Neuroscience 1999; 92: 1171-5

HOHMANN AG, MARTIN WJ, TSOU K, WALKER JM

Inhibition of noxious stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2
Life Sci 1995; 56: 2111-8

HOLDCROFT A, MAZE M, DORE C, TEBBS S, THOMPSON S
A multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management
Anesthesiology 2006; 104: 1040-6

HOLLMANN M, BOULTER J, MARON C, HEINEMANN S
Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc
Ren Physiol Biochem 1994; 17: 182-3

HOFMANN
Medizinische Biochemie
Verlag: Unimed, 4. Auflage, 2006

HOWLETT AC
Pharmacology of cannabinoid receptors
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995; 35: 607-34

HOWLETT AC, BIDAUT-RUSSELL M, DEVANE WA, MELVIN LS, JOHNSON MR, HERKENHAM M
The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization
Trends Neurosci 1990; 13: 420-3

HOWLETT AC, QUALY JM, KHACHATRIAN LL
Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs
Mol Pharmacol 1986; 29: 307-13

HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI, CABRAL G, CASELLAS P, DEVANE WA, FELDER CC, HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, MECHOULAM R, PERTWEE RG,
Classification of cannabinoid receptors
Pharmacol Rev 2002; 54: 161-202

JARAI Z, WAGNER JA, VARGA K, LAKE KD, COMPTON DR, MARTIN BR, ZIMMER AM, BONNER TI, BUCKLEY NE, MEZEY E, RAZDAN RK, ZIMMER A, KUNOS G
Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 14136-41

JENSEN NF, TODD MM, KRAMER DJ, LEONARD PA, WARNER DS
A comparison of the vasodilating effects of halothane and isoflurane on the isolated rabbit basilar artery with and without intact endothelium
Anesthesiology 1992; 76: 624-34

JINKS SL; ANTOGNINI JF, CARSTENS E, BUZIN V; SIMONS C

Isoflurane can indirectly depress lumbar dorsal horn activity in the goat via action within the brain

Br J Anaesth. 1999; 82(2): 244-9

JINKS SL, DOMINGUEZ CL, ANTOGNINI JF

Drastic decrease in isoflurane minimum alveolar concentration and limb movement forces after thoracic spinal cooling and chronic spinal transection in rats

Anesthesiology 2005; 102: 624-32

JOHNSTON RR, WAY WL, MILLER RD

Alteration of anesthetic requirement by amphetamine

Anesthesiology 1972; 36: 357-63

KAMPRATH K, WOTJAK CT

Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice

Learn Mem 2004; 11: 770-86

KATOH T, SUGURO Y, IKEDA T, KAZAMA T, IKEDA K

Influence of age on awakening concentrations of sevoflurane and isoflurane

Anesth Analg 1993; 76: 348-52

KAUPMANN K, MALITSCHKE B, SCHULER V, HEID J, FROESTL W, BECK P, MOSBACHER J, BISCHOFF S, KULIK A, SHIGEMOTO R, KARSCHIN A, BETTLER B
GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes

Nature 1998 ; 396 (6712): 683-7

KEARSE LA, JR., MANBERG P, CHAMOUN N, DEBROS F, ZASLAVSKY A

Bispectral analysis of the electroencephalogram correlates with patient movement to skin incision during propofol/nitrous oxide anesthesia

Anesthesiology 1994; 81: 1365-70

KETY SS

Human cerebral blood flow and oxygen consumption as related to aging

J Chronic Dis 1956; 3: 478-86

KIM DJ, THAYER SA

Activation of CB1 cannabinoid receptors inhibits neurotransmitter release from identified synaptic sites in rat hippocampal cultures

Brain Res 2000; 852: 398-405

KLINKE R, SILBERNAGL S

THIEMEVERLAG

1996

KUNER R, KÖHR G, GRÜNEWALD S, EISENHARDT G, BACH A, KORNAU H,

Role of heteromer formation in GABA receptor function

Science 1999; 283: 74-77

KUNISHIMA N, SHIMADA Y, TSUJI Y, SATO T, YAMAMOTO M, KUMASAKA T, NAKANISHI S, JINGAMI H, MORIKAWA K
Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor
Nature 2000; 407: 971-7

LAKE KD, MARTIN BR, KUNOS G, VARGA K
Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats
Hypertension 1997; 29: 1204-10

LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G, PETITET F, AUBERT JF, BESLOT F, BOHME GA, IMPERATO A, PEDRAZZINI T, ROQUES BP, VASSART G, FRATTA W, PARMENTIER M
Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice
Science 1999; 283: 401-4

LEMMENS HJ, SAIDMAN LJ, EGER EI, LASTER MJ
Obesity modestly affects inhaled anesthetic kinetics in humans
Anesth Analg 2008; 107: 1864-1870

LI J, DAUGHTERS RS, BULLIS C, BENGIAMIN R, STUCKY MW, BRENNAN J, SIMONE DA
The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats
Pain 1999; 81: 25-33

LICHTMAN AH, COOK SA, MARTIN BR
Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement
J Pharmacol Exp Ther 1996; 276: 585-93

MCBAIN CJ und MAYER ML
N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor Structure and Function
Physiol. Rev 1994; 74: 723-760

MACKIE K, HILLE B
Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells
Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 3825-9

MACKIE K, LAI Y, WESTENBROEK R, MITCHELL R
Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor
J Neurosci 1995; 15: 6552-61

MARSICANO G, GOODENOUGH S, MONORY K, HERMANN H, EDER M, CANNICH A, AZAD SC, CASCIO MG, GUTIERREZ SO, VAN DER STELT M, LOPEZ-RODRIGUEZ ML, CASANOVA E, SCHUTZ G, ZIEGLGANSBERGER W, DI MARZO V, BEHL C, LUTZ B

CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity
Science 2003; 302: 84-8

MARSICANO G, WOTJAK CT, AZAD SC, BISOGNO T, RAMMES G, CASCIO MG, HERMANN H, TANG J, HOFMANN C, ZIEGLGANSBERGER W, DI MARZO V, LUTZ B
The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories
Nature 2002; 418: 530-4

MARTIN BR, LICHTMAN AH
Cannabinoid transmission and pain perception
Neurobiol Dis 1998; 5: 447-61

MARTIN WJ, LOO CM, BASBAUM AI
Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation
Pain 1999; 82: 199-205

MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI
Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA
Nature 1990; 346: 561-4

MECHOULAM R
Marihuana chemistry
Science 1970; 168: 1159-66

MENG ID, MANNING BH, MARTIN WJ, FIELDS HL
An analgesia circuit activated by cannabinoids
Nature 1998; 395: 381-3

MERKEL G, EGER EI, 2ND
A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency
Anesthesiology 1963; 24: 346-57

MOHLER H, FRITSCHY JM, LUSCHER B, RUDOLPH U, BENSON J, BENKE D
The GABAA receptors. From subunits to diverse functions
Ion Channels 1996; 4: 89-113

MORI H, MISHINA M
Structure and function of the NMDA receptor channel
Neuropharmacol. 1995; 34(10): 1219-37

MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M
Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids
Nature 1993; 365: 61-5

MUTSCHLER E, SCHUBERT-ZSILAVECZ M
[Risk factors in hypertension: a disease with fatal consequences]
Pharm Unserer Zeit 2001; 30: 279

NEUMAHR S, HAPFELMEIER G, SCHELLER M, SCHNECK H, FRANKE C, KOCHS E
Dual action of isoflurane on the gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated currents
through recombinant alpha(1)beta(2)gamma(2L)-GABA(A)-receptor channels
Anesth Analg 2000; 90: 1184-90

NIEDERHOFFER N, SZABO B
Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on sympathetic cardiovascular
regulation
Br J Pharmacol 1999; 126: 457-66

NISHIKAWA K, MACIVER MB
Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and
inhibitory interneurons
J Neurosci 2000; 20: 5915-23

NISHIKAWA K, MACIVER MB
Agent-selective effects of volatile anesthetics on GABAA receptor-mediated synaptic
inhibition in hippocampal interneurons
Anesthesiology 2001; 94: 340-7

OKAMOTO Y, WANG J, MORISHITA J, UEDA N
Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide
Chem Biodivers 2007; 4: 1842-57

ONG WY, MACKIE K
A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in the primate spinal
cord
J Neurocytol 1999; 28: 39-45

PADLEY JR, LI Q, PILOWSKY PM, GOODCHILD AK
Cannabinoid receptor activation in the rostral ventrolateral medulla oblongata evokes
cardiorespiratory effects in anaesthetised rats
Br J Pharmacol 2003; 140: 384-94

PARMENTIER-BATTEUR S, JIN K, MAO XO, XIE L, GREENBERG DA
Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice
J Neurosci 2002; 22: 9771-5

PERTWEE RG
Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors
Pharmacol Ther 1997; 74:129-80

PERTWEE RG
Pharmacology of cannabinoid receptor ligands
Curr Med Chem 1999; 6: 635-64

PFITZER T, NIEDERHOFFER N, SZABO B

Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats
Br J Pharmacol 2004; 142: 943-52

PIOMELLI D
The molecular logic of endocannabinoid signalling
Nat Rev Neurosci 2003; 4: 873-84

PORTER AC, SAUER JM, KNIERMAN MD, BECKER GW, BERNA MJ, BAO J, NOMIKOS GG, CARTER P, BYMASTER FP, LEESE AB, FELDER CC
Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor
J Pharmacol Exp Ther 2002; 301: 1020-4

QUASHA AL, EGER EI, 2ND, TINKER JH
Determination and applications of MAC
Anesthesiology 1980; 53: 315-34

RAMPIL IJ
Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats
Anesthesiology 1994; 80: 606-10

RAMPIL IJ, MASON P, SINGH H
Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat
Anesthesiology 1993; 78: 707-12

RANFT A, KURZ J, DEURINGER M, HASENEDER R, DODT HU, ZIEGLGANSBERGER W, KOCHS E, EDER M, HAPFELMEIER G
Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala
Eur J Neurosci 2004; 20: 1276-80

REIBAUD M, OBINU MC, LEDENT C, PARMENTIER M, BOHME GA, IMPERATO A
Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice
Eur J Pharmacol 1999; 379: R1-2

RICHARDSON JD, AANONSEN L, HARGREAVES KM
Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia
J Neurosci 1998; 18: 451-7

RINALDI-CARMONA M, BARTH F, HÉAULME M, SHIRE D, CONGY C, SOUBRIE P, BRELIÈRE JC, LE FUR G
Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist
Life Sci 1995; 56: 1941-7

ROMERO J, HILLARD CJ, CALERO M, RABANO A
Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study
Brain Res Mol Brain Res 2002; 100: 85-93

ROSS RA

Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors
Br J Pharmacol 2003; 140: 790-801

ROUTTENBERG A
Targeting the "species gene ensemble"
Hippocampus 2002; 12: 105-8

SAIDMAN LJ, EGER EI, 2ND, MUNSON ES, BABAD AA, MUALLEM M
Minimum alveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, ether and cyclopropane in man: correlation with theories of anesthesia
Anesthesiology 1967; 28: 994-1002

SALZ S
Aufwachverhalten von adipösen Patienten nach Narkosen mit Desfluran und Isofluran
Inauguraldissertation, Ruhr-Universität Bochum

SCHWEITZER P
Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons
J Neurosci 2000; 20: 51-8

SIEGHART W, FUCHS K, TRETTER V, EBERT V, JECHLINGER M, HOGER H, ADAMIKER D
Structure and subunit composition of GABA(A) receptors
Neurochem Int 1999; 34: 379-85

SILBERNAGEL, DESPOPOULOS
Taschenatlas Physiologie
Thieme 2007

SMITH W
Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics
Lab Anim 1993; 27: 30-9

SOMMER B, KEIMÄNEN K, VERDOORN TA, WISDEN W, BURNASHEV N, HERB A, KÖHLER M, TAKAGI T, SAKMANN B; SEEBURG PH
Science 1990; 249: 1580-5

SONNER JM
Issues in the design and interpretation of minimum alveolar anesthetic concentration (MAC) studies
Anesth Analg 2002; 95: 609-14, table of contents

SONNER JM, CASCIO M, XING Y, FANSELOW MS, KRALIC JE, MORROW AL, KORPIER, HARDY S, SLOAT B, EGER EI, 2ND, HOMANICS GE
Alpha 1 subunit-containing GABA type A receptors in forebrain contribute to the effect of inhaled anesthetics on conditioned fear
Mol Pharmacol 2005; 68: 61-8

SONNER JM, GONG D, LI J, EGER EI, 2ND, LASTER MJ

Mouse strain modestly influences minimum alveolar anesthetic concentration and convulsivity of inhaled compounds
Anesth Analg 1999; 89: 1030-4

STEFFEY EP, EGER EI
The effect of seven vasopressors of halothane MAC in dogs
Br J Anaesth 1975; 47: 435-8

STEFFEY EP, EGER EI, 2ND
Hyperthermia and halothane MAC in the dog
Anesthesiology 1974; 41: 392-6

STELLA N, PIOMELLI D
Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons
Eur J Pharmacol 2001; 425: 189-96

STOELTING RK, MARTZ RC, GARTNER J, CREASSER C, BROWN DJ, FORNEY RB
Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on halothane MAC in dogs
Anesthesiology 1973; 38: 521-4

STUDY RE
Isoflurane inhibits multiple voltage-gated calcium currents in hippocampal pyramidal neurons
Anesthesiology 1994; 81: 104-16

STUTH EA, TONKOVIC-CAPIN M, KAMPINE JP, ZUPERKU EJ
Dose-dependent effects of isoflurane on the CO₂ responses of expiratory medullary neurons and the phrenic nerve activities in dogs
Anesthesiology 1992; 76: 763-74

TAKAHASHI KA, CASTILLO PE
The CB₁ cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus
Neuroscience 2006; 139: 795-802

TANELIAN DL, KOSEK P, MODY I, MACIVER MB
The role of the GABA_A receptor/chloride channel complex in anesthesia
Anesthesiology 1993; 78: 757-76

THULLIER F, LALONDE R, COUSIN X, LESTIENNE F
Neurobehavioral evaluation of lurcher mutant mice during ontogeny
Brain Res Dev Brain Res 1997; 100: 22-8

TWITCHELL W, BROWN S, MACKIE K
Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons
J Neurophysiol 1997; 78: 43-50

VARGA K, LAKE KD, HUANGFU D, GUYENET PG, KUNOS G
Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats
Hypertension 1996; 28: 682-6

- VARMA N, CARLSON GC, LEDENT C, ALGER BE
Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus
J Neurosci 2001; 21: RC188
- VERNON JM, LANG E, SEBEL PS, MANBERG P
Prediction of movement using bispectral electroencephalographic analysis during propofol/alfentanil or isoflurane/alfentanil anesthesia
Anesth Analg 1995; 80: 780-5
- VITEZ TS, WAY WL, MILLER RD, EGER EI, 2ND
Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on cyclopropane MAC in the rat
Anesthesiology 1973; 38: 525-7
- VITEZ TS, WHITE PF, EGER EI, 2ND
Effects of hypothermia on halothane MAC and isoflurane MAC in the rat
Anesthesiology 1974; 41: 80-1
- VOLLMER RR, CAVERO I, ERTEL RJ, SOLOMON TA, BUCKLEY JP
Role of the central autonomic nervous system in the hypotension and bradycardia induced by (-)-delta 9-trans-tetrahydrocannabinol
J Pharm Pharmacol 1974; 26: 186-92
- WALTER L, STELLA N
Cannabinoids and neuroinflammation
Br J Pharmacol 2004; 141: 775-785
- WALTER L, FRANKLIN A, WITTING A, WADE C, XIE Y, KUNOS G, MACKIE K, STELLA N
Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration
J Neurosci 2003; 23: 1398-405
- WILLIAMS CM, KIRKHAM TC
Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors
Psychopharmacology (Berl) 1999; 143: 315-7
- WILSON RI, NICOLL RA
Endocannabinoid signaling in the brain
Science 2002; 296: 678-82
- ZHANG Y, SONNER JM, EGER EI, 2ND, STABERNACK CR, LASTER MJ, RAINES DE, HARRIS RA
Gamma-aminobutyric acidA receptors do not mediate the immobility produced by isoflurane
Anesth Analg 2004; 99: 85-90
- ZIMMER A, ZIMMER AM, HOHMANN AG, HERKENHAM M, BONNER TI
Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 5780-5
- ZUURBIER CJ, EMONS VM, INCE C

Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282: H2099-105

ZYGMUNT PM, PETERSSON J, ANDERSSON DA, CHUANG H, SORGARD M, DI MARZO V, JULIUS D, HOGESTATT ED

Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide
Nature 1999; 400: 452-7

8. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u> <u>Versuchsablauf</u>	32
<u>Tabelle 2</u> <u>Beispiel eines Narkoseprotokolls</u>	33
<u>Tabelle 3</u> <u>Übersicht über die Messparameter Körpergewicht, Atem- und Herzfrequenz (MW±SD). CBI-/- (n=13), CBI+/+ (n=13), CBIff;CaMKIIαCre (n=12), CBIff (n=12)</u>	35
<u>Tabelle 4</u> <u>Messparameter Körpergewicht (MW±SD). CBI-/- (n=13), CBI+/+ (n=13), CBIff;CaMKIIαCre (n=12), CBIff (n=12)</u>	36
<u>Strain (Anzahl der Tiere)</u>	36
<u>Körpergewicht (g)</u>	36
<u>CBI-/- (13)</u>	36
<u>26 ± 2</u>	36
<u>p= 0,003</u>	36
<u>CBI+/+ (13)</u>	36
<u>28 ± 2</u>	36
<u>CBIffCaMKIIαCre (12)</u>	36
<u>27 ± 2</u>	36
<u>p= 0,043</u>	36
<u>CBIff (12)</u>	36
<u>29 ± 2</u>	36
<u>Tabelle 5</u> <u>Messparameter Atemfrequenz (MW±SD). CBI-/- (n=13), CBI+/+ (n=13), CBIff;CaMKIIαCre (n=12), CBIff (n=12)</u>	38
<u>Strain (Anzahl der Tiere)</u>	38
<u>Atemfrequenz (min-1)</u>	38
<u>CBI-/- (13)</u>	38
<u>124 ± 10</u>	38
<u>p< 0,001</u>	38
<u>CBI+/+ (13)</u>	38
<u>116 ± 11</u>	38
<u>CBIffCaMKIIαCre (12)</u>	38
<u>112 ± 9</u>	38
<u>p< 0,001</u>	38
<u>CBIff (12)</u>	38
<u>103 ± 14</u>	38
<u>Tabelle 6</u> <u>Messparameter Herzfrequenz (MW±SD). CBI-/- (n=13), CBI+/+ (n=13), CBIff;CaMKIIαCre (n=12), CBIff (n=12)</u>	40
<u>Strain (Anzahl der Tiere)</u>	40
<u>Herzfrequenz (Schläge/min)</u>	40
<u>CBI-/- (13)</u>	40
<u>528 ± 24</u>	40
<u>p< 0,001</u>	40
<u>CBI+/+ (13)</u>	40
<u>473 ± 27</u>	40
<u>CBIffCaMKIIαCre (12)</u>	40
<u>516 ± 24</u>	40
<u>p< 0,001</u>	40
<u>CBIff (12)</u>	40
<u>500 ± 47</u>	40

9. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturformel von Glutamat (HOFMANN, 2006)</i>	4
<i>Abbildung 2: Strukturformel von γ-Aminobuttersäure (GABA) (HOFMANN, 2006)</i>	6
<i>Abbildung 3: Strukturformel von Δ^9-Tetrahydrocannabinol (HOWLETT et al., 2002)</i>	8
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des CB1-Rezeptors</i>	10
<i>Abbildung 5: Strukturformeln verschiedener Endocannabinoide (DE PETROCELLIS et al., 2004)</i>	12
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung der Synthese und Wirkung von Endocannabinoiden.</i>	13
<i>Abbildung 7: Strukturformel des CB1-Rezeptoragonisten WIN 55,212-2 (HOWLETT, 1995)</i>	15
<i>Abbildung 8: Strukturformel des CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A Rimonabant (RINALDI-CARMONA et al., 1995)</i>	16
<i>Abbildung 9: Strukturformel Isofluran (nach EGER, 1981)</i>	23
<i>Abbildung 10: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) des Gewichts in Gramm (g) aller vier Versuchsgruppen unmittelbar vor der Narkose. Signifikanz (*) $p=0,003$, $p=0,043$</i>	37
<i>Abbildung 11: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) der Atemfrequenz (AF) pro Minute (min) aller vier Versuchsgruppen während der Narkose. Signifikanz (*) $p<0,001$</i>	39
<i>Abbildung 12: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) der Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro Minute (Schläge/min) aller vier Versuchsgruppen während der Narkose. Signifikanz (*) $p<0,001$</i>	41
<i>Abbildung 13: Vergleichende Darstellung ($MW \pm SD$) des errechneten MAC-Wertes. Signifikanz: $p<0,001$, $p=0,036$</i>	43

10. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
AEA	Anandamid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA1-3	Hippocampusregion 1-3
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid
Cl	Clorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DSE	depolarisation-induced suppression of excitation
DSI	depolarisation-induced suppression of inhibition
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
ggf.	Gegebenenfalls
h	Stunde
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
K	Kalium
MAC	minimal alveolar Concentration
MGL	Monoglyceridlipase
mGluR	metabotropen Glutamat-Rezeptoren
min	Minute
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
NArPE	N-Arachidonoylphosphatidylethanolamin
NAT	N-Acyltransferase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
PKA	Proteinkinase A
PLD	Phospholipase D
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
THC	Tetrahydrocannabinol
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vallinoid Receptor
Vol%	Volumen Prozent
ZNS	zentrales Nervensystem
2-AG	2-Arachidonoylglycerol

11. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Erhard danke ich für die Übernahme meiner Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München.

Ebenso großer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.phys. E. F. Kochs, Direktor und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München für die Überlassung des Themas.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die unermüdliche Durchsicht des Manuskripts und die immerzu freundliche Unterstützung, Beratung und Motivation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Laura Starker für ihre Geduld, ihre Motivation und die fachliche Unterstützung.

Dank auch an Frau Doris Droese und Frau Anne Frye für die Zusammenarbeit im Labor, sowie meinen Kolleginnen Katja Klemmer, Claudia Steinbicker und Nadja Dertinger für die gute Zusammenarbeit und stete moralische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Florian Weiß, der mir in Layoutfragen jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Gisela und Volker, meinen Geschwistern Rouven, Moritz und Fee, meinen Großeltern, meiner Großtante und Familie Bauer für die großartige Unterstützung und Geduld danken. Ihr habt immer an mich geglaubt und mir das Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht!