

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Zwißler

Pharmakologische Beeinflussung des humanen Endocannabinoidsystems durch Tetrahydrocannabinol (THC)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrike Thieme

aus Halle (Saale)

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller:

Prof. Dr. med. Alexander Choukèr

Mitberichterstellerinnen:

PD Dr. Gabriele Koller

Prof. Dr. Sabine Marten-Steffens

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. Gustav Schelling

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

26.05.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Ulrike Thieme, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel ‚Pharmakologische Beeinflussung des humanen Endocannabinoidsystems durch Tetrahydrocannabinol (THC)‘ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 31.05.2020

Ulrike Thieme

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
Endocannabinoidsystem	6
Funktionen des ECS	8
<i>Reaktionen auf Stress</i>	8
<i>Reaktionen auf THC Applikation</i>	10
Cannabinoide	11
<i>Pharmakologie und Wirkung der Cannabinoide</i>	11
2. Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
Rahmenbedingungen	16
Studienprotokoll	16
<i>Probanden</i>	16
<i>THC Applikation und Abnahmezeitpunkte</i>	17
Probenanalytik	17
<i>Chemikalien, Lösungen, Puffer</i>	17
<i>Probenaufbereitung</i>	18
<i>Probenauswahl</i>	19
<i>Messverfahren</i>	20
Statistische Auswertung	23
4. Ergebnisse	24
THC, THC-OH und THC-COOH	24
Endocannabinoide AEA und 2-AG	29
5. Diskussion	31
THC	31
Endocannabinoide	32
6. Zusammenfassung	35
7. Literaturverzeichnis	38
8. Anhang	44
I Abkürzungsverzeichnis	44
II Abbildungsverzeichnis	45
III Tabellenverzeichnis	46
IV zugrundeliegende Originaldaten	46
9. Danksagung	53

1. Einleitung

Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem (ECS) besteht aus den Cannabinoidrezeptoren (CB) und deren Liganden und dient verschiedenen Funktionen, die im Weiteren vorgestellt werden. Die Wirkungen von Cannabinoiden beruhen u.a. auf der kompetitiven Bindung und Aktivierung spezieller Cannabinoidrezeptoren, wovon bisher 2 CB's strukturell beschrieben wurden. CB1 (1) liegt in hohen Konzentrationen im ZNS vor und ist an der Vermittlung von Gedächtnis, Schmerz, Essverhalten und Übelkeit beteiligt (2). CB2 (3) wird v.a. von Zellen des Immunsystems, dem peripheren Nervensystem und Zellen des Magen- Darm- Traktes exprimiert (2). Bei den Cannabinoidrezeptoren 1 & 2 handelt es sich um an inhibitorische G-Proteine gekoppelte Rezeptoren, welche nach Aktivierung zur Inhibition der Adenylylcyclase und Aktivierung der MAP-Kinase führen (4). Die Existenz weiterer CB ist Inhalt zahlreicher Untersuchungen. In diesem Rahmen konnte nachgewiesen werden, dass körpereigene Cannabinoide den Rezeptor GPR55 aktivieren (5). Körpereigene Liganden der Cannabinoidrezeptoren werden als Endocannabinoide (EC) bezeichnet. 1992 gelang es erstmals einen Vertreter der Endocannabinoide zu isolieren und zu synthetisieren. Auf die Entdeckung von Anandamid (AEA) 1992 (6) (Abbildung 1) folgten in kurzen Abständen die Entdeckungen weiterer EC's (Tabelle 1). Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Abbildung 2), welches 1995 erstmals beschrieben wurde (7), gelten als die bekanntesten Endocannabinoide. 2-AG wirkt als Agonist an CB1 und CB2. AEA hingegen wirkt als Partialagonist auf CB1 (8) und als schwacher Partialagonist auf CB2 (9). Des Weiteren ist AEA in der Lage am Vanilloid Receptor TRPV 1, der besonders stark an freien Nervenendigungen zur Nozizeption exprimiert wird (10), zu binden.

Endocannabinoide	Abkürzung
2-Arachidonoylglycerol	2-AG
2- Arachidonoylglycerylether	2-AG Ether
Arachidonylethanolamin	AEA
Docosatetraenoyl-Ethanolamid	DEA
Linoleoylethanolamid	DLE
N-Arachidonoyl-Dopamin	NADA
N-Arachidonyl Glycin	NAGly
O-Arachidonoyl -Ethanolamid	O-AEA
N-Oleoyl Dopamin	OLDA
Oleoyl Ethanolamid	OEA
Palmitoyl -Ethanolamid	PEA
Stearoyl -Ethanolamid	SEA

Tabelle 1: Endocannabinoide

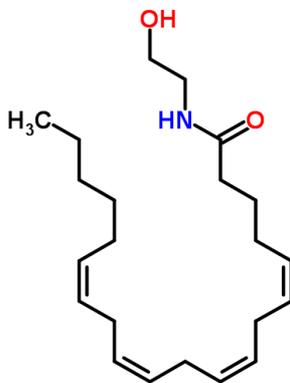


Abbildung 1: Strukturformel Anandamid (aus: www.chemspider.com)

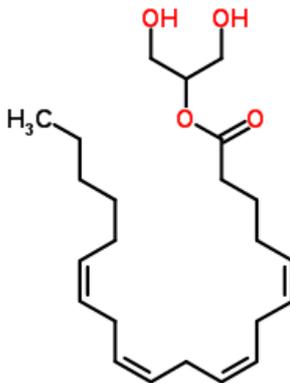


Abbildung 2: Strukturformel 2-AG (aus: www.chemspider.com)

Unterschiede zwischen 2-AG und AEA sind nicht nur anhand unterschiedlicher Bindungsaktivitäten erkennbar, sondern auch in Bezug auf deren Verteilung in Geweben und Plasma. So sind extrazelluläre Konzentrationen von 2-AG höher als die von AEA. Aufgrund dieser Erkenntnis und dem Wissen, dass AEA als Partialagonist am CB1 wirkt, ist es denkbar,

dass AEA für die Aufrechterhaltung einer Grundaktivierung von CB1 verantwortlich ist, während 2-AG für die Vermittlung phasischer Signale zuständig ist (8).

Endocannabinoide werden bei Bedarf durch Membranphospholipide synthetisiert und mit Hilfe membranständiger Transportsysteme in den interzellulären Raum geschleust. Der Abbau der EC findet enzymatisch nach Wiederaufnahme in die Zelle statt. AEA wird durch Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) und Fatty Acid Amide Hydrolase-2 (FAAH-2) abgebaut (11). Der Abbau von 2-AG erfolgt größtenteils durch Monoacylglycerol Lipase (MAGL) (12).

Funktionen des ECS

Endocannabinoide wirken auf verschiedene Prozesse im Körper. Einflüsse auf kardiovaskuläre Funktionen, Immunsystem, Stressreaktionen, Regulation des Essverhaltens und Übelkeit und Einflüsse auf den Schlaf-Wach Rhythmus, sowie die Schlafphasen wurden bisher beschrieben. Ziel der im Rahmen der Dissertation vorgestellten Studien war es Veränderungen im Endocannabinoidsystem nach Applikation von THC als direkter CB Ligand oder Propofol, welches den EC Abbau durch die Hemmung von FAAH vermindert, nachzuweisen, um so zu einem besseren Verständnis der Funktionen von Endocannabinoiden beizutragen und ggf. künftigen therapeutischen Möglichkeiten zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck werden im Folgenden die bisher bekannten Zusammenhänge des Endocannabinoidsystems unter verschiedenen Stresssituationen und die Beeinflussbarkeit durch Cannabinoidapplikation vorgestellt.

Reaktionen auf Stress

Durch Stressexposition wird die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenachse (HPA-Achse) aktiviert. Diese Aktivierung führt zur kaskadenartigen Ausschüttung von hypothalamischen Corticotropin-releasing Hormon, hypophysärem Adrenocorticotropen Hormon und letztlich Ausschüttung von Cortisol aus der Nebennierenrinde. Die Feinabstimmungen innerhalb dieses Regelkreises erfolgen durch Rückkopplungen innerhalb fast aller Ebenen dieses Systems. Nachgewiesenermaßen wirkt auch das ECS innerhalb der HPA-Achse regulatorisch auf die Aktivierung dieser ein. Eine Vielzahl von Studien hat sich bisher mit Veränderungen peripherer und zentraler EC Konzentrationen unter verschiedenen Stresssituationen beschäftigt. So war es möglich einen zeitlich unterschiedlichen Verlauf von AEA und 2-AG Blutkonzentrationen vor, während und nach Parabelflügen, welche als gesicherter Stressor gelten, nachzuweisen. Es wurde gezeigt, dass AEA Blutkonzentrationen sich bereits in der Stresssituation und 2-AG Blutkonzentrationen verzögert verändern, was zur Annahme führte,

dass AEA und 2-AG unterschiedliche Funktionen in der Stressbewältigung einnehmen. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs erschien es plausibel, dass AEA für die akute Stressbewältigung und 2-AG für die Erholungsphase zuständig sind (13). Diese Erkenntnis passt zum bisherigen Wissen, dass CB1, welcher primär selektiv durch 2-AG aktiviert wird, eine zentrale Rolle in der Poststress-Erholungsphase spielt (14).

Weitere Studien zu Änderungen des ECS im ZNS unter Stress zeigten, dass 2-AG in akuten Stresssituationen mobilisiert wird, während AEA Konzentrationen in limbischen Strukturen abnehmen. Hierzu erfolgte im Mausmodell die genetische oder pharmakologische Blockade von CB1 (2-AG affin), was zu einer übermäßigen neuroendokrinen Reaktion der HPA-Achse und somit gestörten Homöostase in Stresssituationen führte. In mehreren Studien konnten die Zusammenhänge bei genetisch ausgeschalteter CB1 Funktion im Mausmodell und die übermäßige Sekretion von Stresshormonen unter Aussetzung verschiedener psychologischer Stressoren nachgewiesen werden. Auch die pharmakologische Blockade von CB1 führte zu einer Potenzierung der Glucocorticoidkonzentrationen. Zusammenfassend legten diese Erkenntnisse nahe, dass das ECS die neuroendokrinen Stressantworten inhibieren. Störungen dieses Systems führen zu einer übermäßigen und potenziell schädlichen Stressantwort. Eine denkbare Erklärung für die potenzierte Überreaktion der HPA-Achse unter Ausschaltung des ECS, wäre dass die unter Stress sezernierten Hormone rückwirkend auf hypothalamischer Ebene das ECS aktivieren und darüber die Feinabstimmung dieses Regelkreises bewerkstelligt wird.

In Studien war es möglich, eine direkte Wirkung des ECS auf neuronale Aktivität nachzuweisen. Hierbei, wirkte das ECS dämpfend auf neuronale Aktivierung und Transmitterausschüttung in limbischen Strukturen.

Des Weiteren wurden EC vermittelte regulatorische Prozesse in verhaltensbiologischen Prozessen gezeigt. Hierzu kam ein Mausmodell zur Anwendung, in welchem Mäuse mit fehlendem CB1 (CB1- Mäuse) und Wildtypen bereits Wochen vor dem Aussetzen von Stresssituationen ungehinderten Zugang zu Ethanolösungen hatten. Nach Stressexposition war ein erhöhter Alkoholkonsum bis zu 24h nach dem Ereignis in den Wildtypen nachweisbar. Ein Effekt der bei den CB1- Mäusen fehlte (15).

Auch ein stressbedingt herabgesetzter Sexualtrieb, zeigt deutliche Besserung nach pharmakologischer Blockade von CB1 (16).

Um ein besseres Verständnis für die Abnahme der AEA Konzentration in limbischen Strukturen nach Stressexposition zu erhalten, erfolgte die Messung von Glucocorticoiden nach pharmakologischer Inhibierung der Verstoffwechslung durch Hemmung der Wiederaufnahme bzw. des enzymatischen Abbaus. Hierunter war eine verminderte, Stress induzierte Sekretion von Glucocorticoiden nachweisbar (17), so dass in diesem Zusammenhang von einer tonischen Funktion des AEA bzgl. Stress ausgegangen werden kann. Eine weitere Studie die den Zusammenhang von AEA Konzentration und der Aktivierung der HPA nach Stress stützt, wies nach, dass die Applikation von FAAH Inhibitoren in der basolateralen Amygdala, zu einer verminderten Aktivierung der HPA-Achse führt (18). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass das ECS unter Stress regulatorisch auf neuronale, neuroendokrine und verhaltensbiologische Prozesse einwirkt.

Reaktionen auf THC Applikation

Chronischer THC Missbrauch führt zu einer Desensibilisierung des ECS und der Down Regulation von CB1. Eine aktuelle Studie wies einen Zusammenhang von dauerhaftem THC Konsum und der zerebralen Signalaktivität an CB1 nach (19). Hierzu erfolgte die Quantifizierung von CB1 durch eine Positronen-Emission-Tomographie (PET). Zur Anwendung kam der Radioligand [18F] FMPEP-d2, welcher eine hohe Affinität und Spezifität für CB1 zeigt. Es zeigte sich eine Down Regulation von ca. 20% von kortikalem CB1 bei den untersuchten THC Konsumenten im Vergleich zur nicht konsumierenden Kontrollgruppe. Des Weiteren war es möglich nachzuweisen, dass sich auch die Dauer des chronischen THC Konsums negativ auf die Signalaktivität von CB1 in der PET auswirkt (s. Abbildung). Nach einer 4-wöchigen Abstinenz, war bereits eine signifikante Verbesserung dieser nachweisbar. Unklar blieb, ob dauerhafter THC Konsum zu einer verminderten Rezeptorausprägung oder einer verminderten Rezeptoraffinität führt. Entsprechende Mausmodelle (20) ließen jedoch vermuten, dass eine verminderte Rezeptorausprägung ursächlich für die herabgesetzte Signalaktivität ursächlich war. Hierzu passend gelang es auch in sog. post mortem Studien eine deutlich verminderte zerebrale Konzentration von CB1 Rezeptoren bei chronischen THC Konsumenten nachzuweisen (21). Auch wird vermutet, dass eine fehlerhafte Phosphorylierung von CB1 zu einer verminderten wirksamen Signalaktivität führt (22). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem THC Konsum (23).

Bisher gelang es nicht, die akuten Wirkungen von THC auf das humane ECS nachzuweisen. Es wurde vermutet, dass die Applikation von Cannabinoiden den Endocannabinoidhaushalt

derart beeinflusst, dass eine Suppression der EC Synthese oder ein gesteigerter Abbau von EC resultiert. Diese Störung des Endocannabinoidhaushaltes kann theoretisch wiederum zu einem erhöhten bzw. frequentierten Konsum führen, so dass eine THC Abhängigkeit entstünde, bzw. Entzugssymptome bei Abstinenz zu erwarten wären (24). Um akute Einflüsse auf Endocannabinoidkonzentrationen im Plasma nachzuweisen, wurden in Plasmaproben, welche im Rahmen einer Applikationsstudie zur Untersuchung der THC-Pharmakokinetik in Abhängigkeit von verschiedenen genetischen Polymorphismen gewonnen wurden, neben THC auch die Endocannabinoide AEA und 2-AG gemessen. Aufgrund des zuvor dargelegten engen Zusammenspiels von 2-AG und AEA mit der HPA-Achse, sowie daraus resultierender Konzentrationen von Stresshormonen, erfolgte außerdem die Bestimmung von Cortisol.

Cannabinoide

Pharmakologie und Wirkung der Cannabinoide

Cannabinoide finden sich in unterschiedlichen Konzentrationen in allen Bestandteilen der Hanfpflanze, wobei die höchsten Konzentrationen im weiblichen Blütenstand detektierbar sind. Die Pflanze ist in der Lage mehr als 60 Cannabinoide zu synthetisieren (25) (26). Zu den gängigsten Cannabinoiden gehören Cannabinol, Cannabidiol (CBD), Isomere von Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinolsäure (s. Abbildung). 1960 gelang es erstmals Δ^9 -THC und CBD zu isolieren und zu synthetisieren (27). Δ^9 -THC ist die am stärksten psychoaktive Verbindung, während CBD ein inaktives Cannabinoid darstellt. Abhängig von Faktoren wie Inhalationstiefe und -technik können beim Rauchen von Marihuana bis zu 60% des Δ^9 -THC Gehalts in die Blutbahn gelangen, wobei Angaben zur Bioverfügbarkeit bei inhalativer Applikation stark schwanken (28-30). Die maximalen Plasmakonzentrationen werden dabei nach 3-10 min erreicht (31, 32). Oral wird Δ^9 -THC in geringen Mengen im Darm abgebaut und durch den *first pass* Effekt weitestgehend metabolisiert, so dass eine Bioverfügbarkeit von bis zu 20% verbleibt. Angaben zur oralen Bioverfügbarkeit schwanken stark zwischen 6-20%. Aufgrund der verzögerten Aufnahme werden maximale Plasmakonzentrationen je nach Zubereitungsform nach 1-6h erreicht (26, 33, 34).

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von THC und seiner Metabolite erfolgt eine rasche Umlagerung vom Blut in das Fettgewebe (26). Im Rahmen der THC-Metabolisierung entsteht durch Hydroxylierung der aktive Metabolit 11-OH- Δ^9 -THC (THC-OH). Die weitere Verstoffwechselung führt zu inaktiven Metaboliten, wie 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THC-

Carbonsäure, THC-COOH)(Abbildung 3). Insgesamt konnten in Untersuchungen von Mensch und Tier über 100 überwiegend inaktive THC Metabolite im Rahmen der Verstoffwechslung auffindig gemacht werden (35). Die Metabolisierung erfolgt in der Leber durch verschiedene Cytochrom P 450 Enzyme (33), sowie extrahepatisch in Hirn (Med. oblongata, Cerebellum), Darm, Lunge u.a. (29, 30).

Die Ausscheidung erfolgt überwiegend fäkal (>65%) und renal (ca. 20%). THC-OH macht den größten Anteil bei der fäkalen Ausscheidung aus, während THC-COOH (als Glucuronid) der am höchsten konzentrierte Metabolit im Urin ist (29, 30). Über diesen Weg werden innerhalb von 5 Tagen 80-90% des THC's ausgeschieden Δ 9-THC bzw. seine Metabolite sind für längere Zeit im Serum und Urin nachweisbar. Die Angaben von Nachweisgrenzen zeigen abhängig von Konsumverhalten, Dosierung, Applikationsform, angewandten Messverfahren u.a. starke Schwankungen. Es finden sich sowohl Studien, welche die Nachweisbarkeit von Δ 9-THC im Serum auf 3-5h limitieren, als auch Veröffentlichungen, die eine Nachweisbarkeit von bis zu 13 Tagen bei Langzeitkonsumenten feststellen konnten (26). THC-Metabolite sind hierbei noch länger in Urin und Serum nachweisbar. Die Angaben schwanken z.B. für THC-COOH zwischen 1-7 Tagen für den Nachweis in Urin, wobei Einzelfälle, in denen THC-COOH bis zu 24 Tage nachgewiesen werden konnte, dokumentiert sind (36).

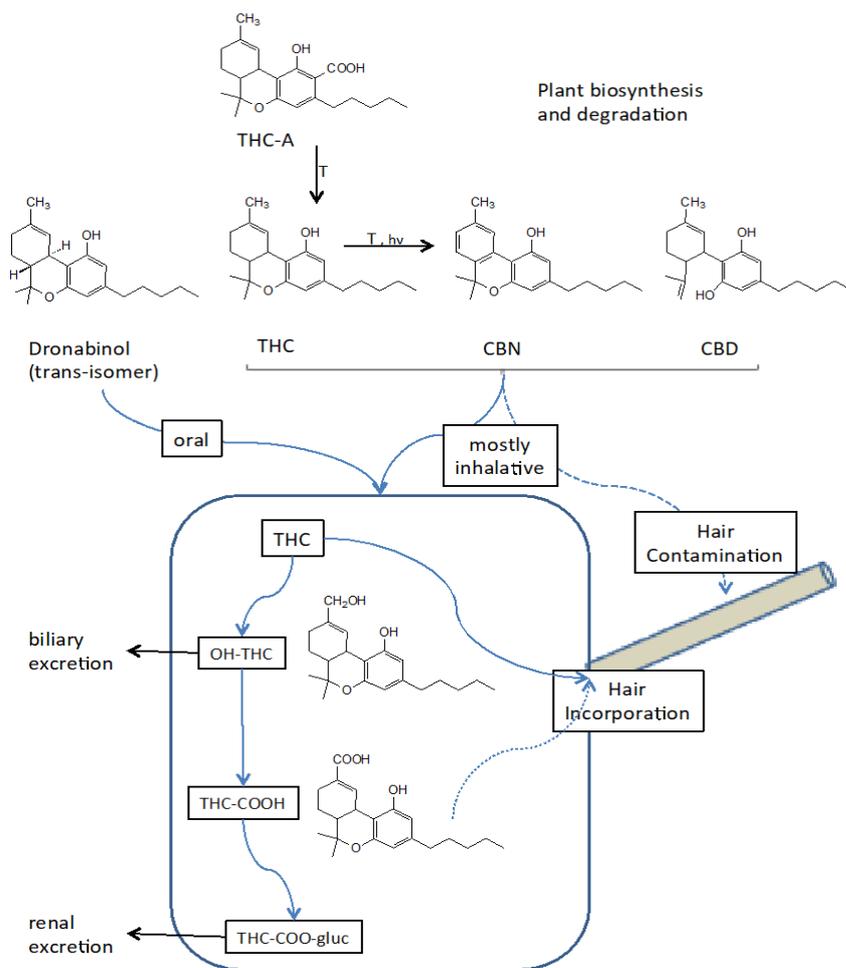
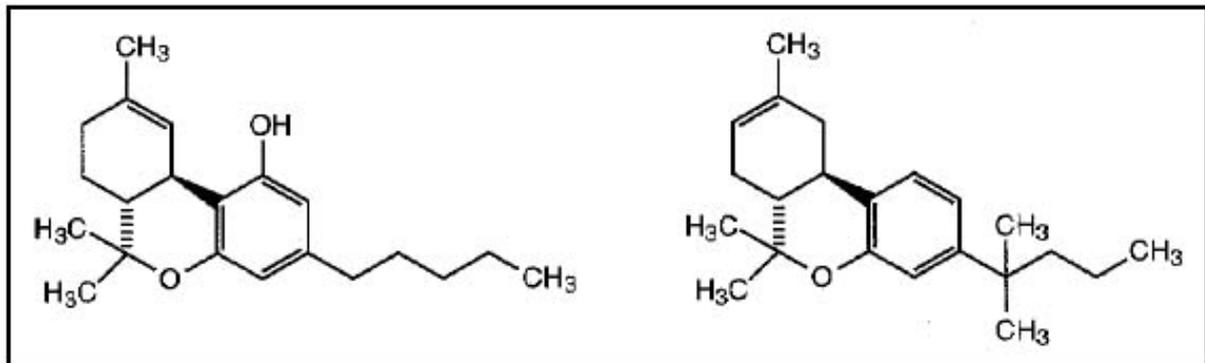


Abbildung 3: Umwandlung, Abbau und Ausscheidung von THC (37)

Neben den natürlich vorkommenden Cannabinoiden begannen J.W. Huffman und sein Team bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Herstellung von synthetischen Cannabinoiden. Der Grundgedanke war es diese vor allem für die Weiterentwicklung medikamentöser Therapien nutzbar zu machen und durch spezifische Rezeptorbindung (s. Abbildung 4) die Funktionen von Cannabinoidrezeptoren in Gehirn und anderen Organen zu untersuchen (38, 39).

Besondere Aufmerksamkeit erlangten synthetische Cannabinoide jedoch auch aufgrund des relativ einfachen Herstellungsprozesses und den zum Teil hochpotenten, psychoaktiven Wirkungen. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts erschienen zunehmend Substanzgemische wie z.B. Spice- und verschiedene Kräutermischungen, welche diverse synthetische Cannabinoide enthalten, im Gegensatz zu Cannabis jedoch legal erworben werden können. Ein in fast allen Produkten enthaltenes synthetisches Cannabinoid ist JWH-018 (s. **Abbildung 5**), welches eine

besonders hohe Affinität zu CB1 zeigt und für die psychoaktive Wirkung der Kräutermischungen verantwortlich ist (40).



Δ^9 -THC, the psychoactive ingredient of marijuana

JWH-133, a synthetic, non-psychoactive cannabinoid which is selective for the CB₂ receptor

Abbildung 4: Strukturformeln d9-THC und synthetisches Cannabinoid JWH-133 im Vergleich, aus www.clemson.edu

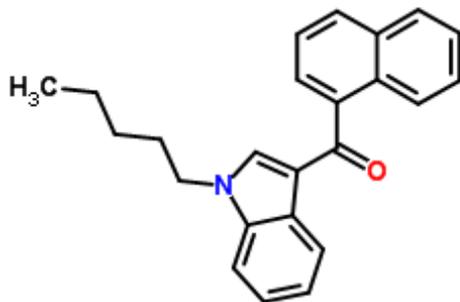


Abbildung 5: synthetisches, psychoaktives Cannabinoid JWH-018, aus: www.chemspider.com

Die Wirkungen von Cannabinoiden sind vielfältig. Bei vegetativen Wirkungen sind Antiemese und ein gesteigerter Appetit im Fokus von Untersuchungen Cannabinoide künftig medikamentös einzusetzen. So ist z.B. Nabilone, ein synthetisches THC- Derivat, in Großbritannien als Antiemetikum zugelassen. In den USA findet Dronabinol, das psychoaktiv wirksamere Isomer (-)- Δ^9 -trans-THC, zur Behandlung von Übelkeit bei Patienten im Rahmen einer Chemotherapie, sowie zur Appetitssteigerung bei AIDS Patienten mit starkem Gewichtsverlust Anwendung (41).

In Deutschland ist Nabiximols (ein Gemisch aus THC und CBD im Verhältnis 1:1) seit 2011 zur Behandlung therapieresistenter Spasmen und neuropathischer Schmerzen bei Multipler Sklerose (MS) zugelassen (41). Seit März 2017 ist die Verschreibung von Cannabisblüten und Cannabisextrakten in kontrollierter Qualität möglich, wobei die Kosten von den Krankenkassen übernommen werden. Um die Versorgung sicherzustellen wird außerdem der kontrollierte Cannabisanbau zu medizinischen Zwecken in Deutschland ermöglicht. (42)

THC Konsum kann dosisabhängig unterschiedlich schwere neurologische Defizite auslösen. Ein eingeschränktes Gleichgewicht, Verlangsamung komplexer Bewegungsabläufe und Beeinträchtigung der Reaktionszeit können schon bei niedrigen Dosierungen (inhalativ) zwischen 5-10mg beobachtet werden (43, 44). Diese Defizite halten in der Regel länger an als die Euphorie (4-7h), wodurch auch nach Ende des Rauscherlebens Beeinträchtigungen bestehen können. Diese Effekte finden häufig Beachtung bei der Beurteilung der Fahrtüchtigkeit und es ist von Leistungseinbußen bei THC- Serumkonzentrationen von 7-15ng/ml auszugehen (45).

Die psychischen Wirkungen von THC werden von Konsumenten hauptsächlich als Grund des THC Konsums angegeben und tragen zur Entstehung von Suchtverhalten bei. In niedrigen Dosierungen stellt sich neben einer Verbesserung der Affektivität bis hin zur Euphorisierung oder einem läppischen Affekt häufig eine psychomotorische Verlangsamung ein. Beeinträchtigungen von Konzentration und Gedächtnis bis hin zu Zeitgitterstörungen können bereits in niedrigen Dosierungen auftreten. In höheren Dosierungen kann es zu Panik und Angstgefühlen kommen (46). Die ICD-10 Kriterien für akute Cannabisintoxikation beinhalten verschiedene Symptome aus dem schizophrenen Formenkreis wie Wahrnehmungsstörungen, Ich-Störungen, formale und inhaltliche Denkstörungen. Bisherige Studien zeigten, dass THC Konsum unabhängig von Wirkgraden und Dosierungen das Risiko für das Auftreten psychotischer Episoden oder auch die Entstehung chronischer Psychosen erhöhen kann (43, 46).

2. Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel der Arbeit war es, Erkenntnisse über die Funktionen des humanen Endocannabinoidsystems zu erlangen. Hierfür wurden Serumkonzentrationen verschiedener Endocannabinoide und deren zeitlicher Verlauf nach Applikation von THC untersucht. Durch

die Applikation war es möglich über den Konzentrationsverlauf der Cannabinoide Rückschlüsse auf deren Pharmakokinetik zu ziehen. Aufgrund der spezifischen Pharmakodynamik von Cannabinoiden mit kompetitiver Bindung an Cannabinoidrezeptoren, können Veränderungen von Endocannabinoidkonzentrationen vermutet werden. Eine noch nach Elimination der Cannabinoide nachgewiesene Down-Regulation des Endocannabinoidsystems mit entsprechend verringerten Serumkonzentrationen von EC's, könnte eine Abhängigkeitsentwicklung ähnlich wie bei anderen Substanzen erklären. Die für die Messung erforderliche Extraktionen und Auswertungen der Proben erfolgte durch die Doktorandin im Forensisch Toxikologischen Centrum (FTC) in München. Des Weiteren wurde der Fachartikel zur Untersuchung von Endocannabinoidkonzentrationen nach intravenöser THC Applikation (47) von der Doktorandin als Erstautorin verfasst.

3. Material und Methoden

Rahmenbedingungen

Probengewinnung:	Universitätsklinik für Anästhesiologie und Schmerztherapie Inselspital Bern
Ethikvotum	Nummer KEK 241–09, ISRCTN53019164, Ethikkommission der Universität Bern, Schweiz
Analytik:	FTC (Forensisch Toxikologisches Centrum München)
Untersuchungszeitraum:	2011 bis 2012

Studienprotokoll

Probanden

25 Gesunde Probanden nahmen an der Studie teil. Ausgeschlossen wurden chronische THC Konsumenten, sowie Probanden, deren letzter Konsum weniger als 3 Monate zurück lag. Alle Teilnehmer erhielten am Morgen der Applikationsstudie ein leichtes Frühstück. Die THC Applikationen erfolgten zwischen 9:00 Uhr und 10:00 Uhr. Zuvor wurden alle Probanden gemessen und gewogen. Des Weiteren wurden der Körperfettanteil gemessen, sowie Blutproben laborchemisch auf Kreatinin, Albumin-Aspartat-Aminotransferase und Glutamat-Oxalazetattransaminase untersucht. Über die Messung der Transaminasen sollten

unbekannte Lebererkrankungen ausgeschlossen werden, welche einen veränderten THC Metabolismus oder verfälschte Ausgangswerten zur Folge haben könnten.

Jeder Proband erhielt einen arteriellen Zugang, über welchen die ersten 5 nach THC Applikation eine durchgehende Blutdruckmessung gewährleistet war und die Blutproben abgenommen wurden. Ergänzend erfolgte eine Monitorüberwachung mittels 12-Kanal EKG und Pulsoxymetrie.

THC Applikation und Abnahmezeitpunkte

THC wurde mit einer Dosis von 0,10 mg/kg Körpergewicht intravenös appliziert. Die Substanz wurde durch THC-Pharma, Frankfurt am Main, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der zu applizierenden Lösung erfolgte nach der vorgegebenen Methodik von Naef et al. (48) durch die Apotheke des Inselspitals in Bern, Schweiz.

Um mögliche zirkadiane Einflüsse auf mögliche Veränderungen der Plasmakonzentrationen der Endocannabinoide besser beurteilen zu können wurden bei 20 gesunden Probanden ohne medikamentöse Einflüsse Anandamid und 2-AG Konzentrationen um 8:00 Uhr und 15:00 Uhr gemessen.

Blutproben wurden zu folgenden Zeitpunkten nach THC Applikation abgenommen:

akute Phase											Langzeitanalyse	
0 min	1 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	90 min	180 min	360 min	24h	48h

Die ersten 6 Stunden repräsentieren die akute Phase der Analyse. Den Probanden stand es nach der akuten Phase frei im Beisein einer vertrauten Person nach Hause zu gehen. Um Langzeiteffekte zu beurteilen erfolgten weitere Blutentnahmen nach 24 h und 48 h.

Probenanalytik

Chemikalien, Lösungen, Puffer

Verwendete Substanzen zur analytischen Untersuchung:

- MTBE (tert- Butylmethylether, Firma Merck, KGaA, Darmstadt Deutschland)
- Acetonitril LC-MS, Chromasol V®, Firma SigmaAldrich®
- Lösungsmittel A: 2 mM NH₄OAc in 5 % Acetonitril mit 0,02% Ameisensäure. (154 mg NH₄OAc in 950 mL Wasser mit 50 mL Acetonitril und 0.2 mL Ameisensäure 98%ig)

- Lösungsmittel B: 2 mM NH₄OAc in 95 % Acetonitril (154 mg NH₄OAc in 950 mL Acetonitril mit 50 mL Wasser)
- R1 Puffer: 5mM Ammoniumformiat in Wasser mit 15% Methanol
- R2 Puffer: 5mM Ammoniumformiat in Wasser mit 50% Methanol
- R3 Puffer: R1 + R2 im Verhältnis 1/1
- interne Standards THC- d₃, OH-THC-d₃, THC-COOH-d₉, 2AG-d₅, AEA-d₃, PEA-d₄

Probenaufbereitung

Die Blutabnahme erfolgte über einen arteriellen Zugang. Die so gewonnenen Vollblutproben wurden direkt nach Entnahme auf 0°C abgekühlt und eine Zentrifugation erfolgte innerhalb von 30-60 Minuten nach Entnahme. Die Serumproben wurden bei -20°C gelagert und transportiert um Veränderungen der Endocannabinoidkonzentrationen durch Neubildung/Freisetzung und Zerfall bei wiederholtem Auftauen zu verhindern (49). Aufgrund früherer Beobachtungen, welche vermuten ließen, dass die verwendete Antikoagulans bei den Blutproben Einflüsse auf die Endocannabinoidkonzentrationen haben, wurden zu allen Zeitpunkten simultan Blutproben mit Heparinröhrchen und EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Probenaufbereitung (s. Abbildung 6) und Messungen von THC und der Metabolite THC-OH und THC-COOH, sowie den Endocannabinoiden erfolgten im Forensisch Toxikologischen Centrum in München.

Extraktionsprotokoll

Kalibrierung

- o 500 µl Kälberserum in von Cal 0 bis Cal 8 beschriftete 2 ml Eppendorf Vials vorlegen
 - o aufsteigend je Eppendorf Vial
 - o 0 - 1,25 - 2,5 - 5 - 12,5 - 25 - 50 - 100 - 150 µl THC-Standard Mix pipettieren
- weiter wie Serumproben.

Serumproben

- o 500 µl Blut in beschriftete 2 ml Eppendorf Vials vorlegen
- o je 5 µl Interner Standard-Mix und AEA Interner Standard
- o 1 ml Extraktionslösung (Ethylacetat:Cyclohexan= 1:7)
- o Vials fest verschließen und je 1 Minute vortexen
- o verschlossene Vials 5 Minuten bei 14500 U/min zentrifugieren
- o Überstand in neu beschriftete 2 ml Eppendorf Vials abpipettieren; Vial mit Zentrifugat verwerfen
- o Lösung unter Stickstoffstrom bei ca. 37°C eindampfen
- o 20 µl Acetonitril; 5 Minuten ruhen lassen, dann vortexen
- o 110 µl Puffer R2
- o anrütteln, 5 Minuten ruhen lassen, dann erneut vortexen
- o Lösung in beschriftete HPLC-Vials überführen und mit roten Deckel verschließen
- o Luftblasen durch Klopfen entfernen, HPLC-Vials kühl lagern,
oder sofort zur Messung in Autosampler stellen

Abbildung 6: Extraktionsprotokoll

Probenauswahl

Der Auswahl einer geeigneten Probenmatrix und adäquater Probenvorbereitung kommt – insbesondere bei der Untersuchung von Endocannabinoiden – eine entscheidende Bedeutung zu, da diese infolge von Instabilität, Neogenese oder Adsorption an Probengefäßen erheblichen Veränderungen unterliegen. Im Tierversuch wird oft Hirngewebe, ggf. differenziert nach Hirnarealen, zur gezielten Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen EC-Konzentrationen und psychotropen Wirkungen (50, 51) verwendet. Klassische Probenmaterialien, wie sie in der klinischen oder forensischen Diagnostik aufgrund ihrer nicht-

invasiven Verfügbarkeit verbreitet sind (z.B. Urin, Speichel), scheiden aufgrund geringer Ausscheidungsraten der lipophilen Substanzen weitgehend aus, da die Zielkonzentrationen und/oder die zeitliche Korrelation mit einer biologischen Wirkung unzureichend sind. Folglich hat sich Blut (Plasma oder Serum) als Kompromiss etabliert, um Zusammenhänge aktuell zirkulierender Wirkstoffmengen mit biologischen Effekten zu untersuchen.

Dabei bleibt immer kritisch zu hinterfragen, ob EC- Serumkonzentrationen für eine lokale Verfügbarkeit am jeweiligen Wirkort (z.B. Gehirn) repräsentativ sind, oder durch eingeschränkte Diffusionsmöglichkeit (Blut-Hirn Schranke) oder alternative Bildungsmechanismen von Endocannabinoiden (z.B. unter Beteiligung von Haut, Verdauungssystem) verfälscht werden. Für die Bestimmung reproduzierbarer EC Konzentrationen im Blut hat sich die Notwendigkeit einer sofortigen Abtrennung zellulären Bestandteile und umgehendes Einfrieren (bei -20°C) als unverzichtbar für die Stabilisierung der Proben erwiesen (52, 53). Die Anwendung von Inhibitoren der beteiligten Enzyme – d.h. FAAH zur Hydrolyse von Ethanolamiden bzw. MAGL als Katalysator der Verseifung von 2-AG können zur zusätzlichen Stabilisierung beitragen(54-56).

Serum und Plasma zeigten keine qualitativen Unterschiede im Konzentrationsverlauf der betrachteten Analyte und erscheinen für die Analytik gleichermaßen geeignet.

Messverfahren

Für die Quantifizierung von Endocannabinoiden sind verschiedene Kombinationen aus chromatographischer Trennung (Flüssigchromatographie (49) oder Gaschromatographie nach Derivatisierung (57)) mit nachfolgender massenspektrometrischer Detektion verfügbar.

Wegen der hohen Sensitivität und Spezifität wurden alle Proben mittels HPLC, gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie (HPLC/MS-MS, API 4000, Sciex), gemessen.

Die jeweilige Probe bildet mit dem Eluenten die mobile Phase, während die Trennsäule mit der stationären Phase gefüllt ist. In der klassischen LC ist die mobile Phase relativ unpolar und die stationäre Phase, welche meistens aus Kieselgel besteht, polar. Während die mobile Phase mitsamt der Probe durch die Trennsäule läuft, erfolgt die Trennung des Substanzgemisches. Aufgrund individuell variabler Van-der-Waals Wechselwirkungen mit der stationären Phase fließt jedes Molekül des Gemisches je nach Zusammensetzung unterschiedlich schnell durch die Trennsäule und wird zu einem charakteristischen Zeitpunkt nach Verlassen der Säule (Retentionszeit, RT) vom Detektor erfasst. Bei der hier

angewendeten *reversed-phase*-HPLC sind die Polaritäten der jeweiligen Phase vertauscht. Die Polarität des Kieselgels wird durch organische Substituenten unterschiedlich lange Kohlenstoffketten optimiert. Dabei kam eine mit 8 Kohlenstoffatomen modifizierte (Octadecyl, Zorbax XDB C8 5micron 4.5*150 mm) Säule zum Einsatz.

Als Mobilphase kamen folgende Mischungen aus Wasser und Acetonitril zur Anwendung, die zur Verbesserung der Ionisation mit 2mM Ammoniumacetat modifiziert wurden.

- Lösungsmittel A: 2 mM NH₄OAc in 5 % Acetonitril mit 0,02% Ameisensäure. (154 mg NH₄OAc in 950 mL Wasser mit 50 mL Acetonitril und 0.2 mL Ameisensäure 98%ig)
- Lösungsmittel B: 2 mM NH₄OAc in 95 % Acetonitril (154 mg NH₄OAc in 950 mL Acetonitril mit 50 mL Wasser)

Eine hinreichende Trennung aller Substanzen wurde durch eine Gradientenprogrammierung ermöglicht, indem der Anteil der organischen Phase B -ausgehend von 55% zum Injektionszeitpunkt- in 3 Minuten auf 100%B erhöht und diese Zusammensetzung für 2 Minuten konstant gehalten wird.

Als Detektor wurde ein Tandem Massenspektrometer verwendet, welches aus 2 in Reihe geschalteten Massenspektrometern besteht, die durch eine Kollisionszelle getrennt sind. In der Elektrospray-Ionenquelle (ESI) werden die zu detektierenden Moleküle zunächst durch Anlagerung von Protonen (positiver Ionisationsmodus, typisch für basische Wirkstoffe, wie Endocannabinoide) bzw. Deprotonierung (Negativionisation von Säuren, wie THC-COOH) ionisiert. Die einfach geladen, protonierten bzw. deprotonierten Moleküle werden im Vakuum nach ihrem Molekulargewicht isoliert und anschließend in der Kollisionszelle mit Hilfe eines Kollisionsgases (Stickstoff) bei variabler, substanzspezifischer Kollisionsenergie (CE) fragmentiert. Aus den gebildeten Bruchstücken können Rückschlüsse auf die jeweilige Struktur der Stoffe gezogen werden, da jedes Molekül eine strukturspezifische Fragmentierung erfährt. Zur Quantifizierung werden mehrere charakteristische Fragmentierungsreaktionen ausgewählt (*multi-reaction monitoring*, MRM) um die Zielanalyten selektiv von störenden Matrixbestandteilen unterscheiden zu können.

Zur Überwachung des Extraktions- und Analyseverfahrens wurde jede Probe zu Beginn der Extraktion mit 5µl des internen Standards (IS) versetzt. Der IS für Anandamid besteht aus 3-fach deuteriertem AEA (AEA-d3); für alle anderen Ethanolamide (OEA, SEA, OEA) wird PEA-d4

verwendet. Für die untersuchten Cannabinoide wurden 3-fach (THC-d3, OH-THC-d3) bzw. 9-fach deuterierte (THC-COOH-d9) Analoga verwendet. Wegen verbreiteter Hydrolyseprobleme von 2-AG wurden zwei alternative IS (2-AG-d5 sowie 2-AG-d8) getestet. Durch Deuterierung wird im betreffenden Molekül eine bestimmte Anzahl an Wasserstoffionen durch ein Deuterium ersetzt. Dies hat zur Folge, dass sich n-fach deuterierte Endocannabinoide ein um n Dalton erhöhte Molekulargewicht besitzen, sich aber ansonsten im chemischen Verhalten nicht unterscheiden. Hierdurch ist gesichert, dass sich EC's und interne Standards analytisch identisch verhalten und Variationen (z.B. Extraktionsverluste) optimal kompensiert werden. Lediglich die Retentionszeiten deuterierter Standards sind geringfügig kleiner.

Des Weiteren erfolgte eine quantitative Bestimmung der THC- und EC-Werte über eine zusätzlich erstellte Kalibrierungsreihe. Die jeweiligen Kalibratoren enthalten eine definierte Menge des jeweiligen IS, so dass in der Messung Peaks mit unterschiedlicher Intensität aber nahezu gleicher Retentionszeit entstehen. Hierdurch können Peaks mit einer bestimmten Intensität eine Konzentration zugeordnet werden. Betrachtet man abschließend die Peaks der zu messenden Substanzen können diesen, anhand der Kalibrierungsreihe, ein quantitativer Wert zugeordnet werden.

Die Blutentnahmen, Kühlung und Zentrifugation der Proben, sowie die weitere Betreuung der Probanden über 48h erfolgten im Inselspital Bern, Universitätsklinik für Anästhesiologie und Schmerztherapie. Die Probenaufbereitung, Messungen und Auswertung von THC und der Metabolite THC-OH und THC-COOH, sowie den Endocannabinoiden erfolgten durch die Doktorandin selbst im Forensisch Toxikologischen Centrum in München. Die Linearität, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der angewandten Methoden wurde für THC, OH-THC, THC-COOH validiert. Die Nachweisgrenzen (bzw. Bestimmungsgrenzen in Klammern) betragen für THC 0,35 (0,5) ng/ml, OH-THC 0,18 (0,48) ng/ml sowie für THC-COOH 1,4 (2) ng/ml.

Substanz	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	DP (V)	CE (eV)
2-AG	379,2	<u>287,3</u>	61	<u>21</u>
		269,2		25
2-AG-d5	384,2	287	11	21
2-AG-d8	387,2	<u>295,2</u>	11	<u>21</u>
		341,2		11
AEA	348,1	<u>287</u>	61	<u>17</u>
		62		16
AEA-d4	352,3	<u>287</u>	61	<u>17</u>
		66		16
OEA	326,2	309	61	21
		62		22
PEA	300,1	<u>283</u>	61	<u>21</u>
		62		22
PEA-d4	304,3	287	66	22
SEA	328,3	<u>311</u>	61	<u>21</u>
		<u>62</u>		<u>22</u>
		66		16
THC	313,2	191.200	-80	-40
		245.200	-80	-38
THC d3	316,2	248.2	-80	-38
OH-THC	329,2	311,2	-85	-24
		268,2	-85	-36
OH-THC d3	332,2	271,2	-85	-36
THC-COOH	343,2	299,2	-85	-28
		245,1	-85	-38
THC-COOH d9	352,2	254,1	-85	-38

Tabelle 2: MS/MS Parameter der Analyten

Ion Source	Turbo Spray IonDrive
Curtain gas	20
Collision gas	Medium
Ion Spray Voltage	Endocannabinoide +5500 V Cannabinoide -4000 V
Quellentemperatur	550 °C
Ion Source Gas 1	40
Ion Source Gas 2	70

Tabelle 3: Quellenparameter

Statistische Auswertung

Die Plasmakonzentrationen von Endocannabinoiden wurden zu 13 verschiedenen

Zeitpunkten gemessen. Zur Auswertung wurden folgende 4 Zeitpunkte herangezogen:

- Ausgangskonzentration,
- maximale Serumkonzentration
- geringste Serumkonzentration
- Endkonzentration

Maximum und Minimum wurden mittels One Way ANOVA Bonferri Verfahren verglichen. Außerdem wurden die Werte der Endocannabinoide, THC und der THC Metabolite in Abhängigkeit ihrer Einbettung in EDTA oder Heparin verglichen. Hierzu kam der Wilcoxon Vorzeichen Rang Test zur Anwendung. Ausreißer wurden durch Anwendung des Grubb's Tests detektiert.

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der GraphpadPrism Software. Die Daten wurden als Mittelwerte einschließlich +/- Standardabweichung dargestellt. P- Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Für die gesamte Analytik kamen zweiseitige Testungen zum Einsatz.

4. Ergebnisse

THC, THC-OH und THC-COOH

Die höchsten THC Plasmakonzentrationen wurden 1 Minute nach Applikation mit durchschnittlich 949 ng/ml (SD 293,9 ng/ml) gemessen. Im Anschluss zeigte sich bis zum Ende der akuten Phase ein exponentieller Verlauf der THC Plasmakonzentrationen (s. Abbildung 5) und im weiteren Verlauf der Langzeitanalyse eine weitere Elimination bis zu einem durchschnittlichen Wert von 0,75 ng/ml (SD 0,15 ng/ml) nach 24h und 0,25 ng/ml (SD 0,15 ng/ml) nach 48h.

Ein signifikanter Konzentrationsanstieg der THC- Metabolite war bereits 1 Minute nach THC Gabe messbar. Die höchsten Konzentrationen von THC-OH, welches ein starker psychoaktiver Metabolit des THC ist, wurden nach 5 min verzeichnet und betragen durchschnittlich 32,5 ng/ml (SD 14,9 ng/ml). Im weiteren Verlauf fielen die Werte und erreichten zum Ende der Akutphase ungefähr das Niveau der Konzentrationen von THC.

Der inaktive Metabolit THC-COOH erreichte die höchsten Konzentrationen nach 10 min mit Werten von durchschnittlich 85.6 ng/ml (SD 48.1 ng/ml). Wie auch THC zeigte THC-COOH nach Erreichen des maximalen Wertes im weiteren Verlauf einen exponentiellen Konzentrationsabfall (s. Abbildung 7: THC, THC-OH, THC-COOH). Die Werte von THC-COOH

waren im direkten Vergleich am Ende der Langzeitanalyse jedoch noch deutlich höher als die von THC und THC-OH.

Insgesamt waren nach Ablauf der Langzeitanalyse mit 48 h sowohl die Plasmakonzentrationen von THC mit Durchschnittswerten von 0.25 ng/ml (SD 0.15 ng/ml), als auch die Plasmakonzentrationen von dessen Metaboliten THC-OH mit Durchschnittswerten von 0,13 ng/ml (SD 0.06 ng/ml) und THC-COOH mit Durchschnittswerten von 6.82 ng/ml (SD 6.3 ng/ml) noch als signifikant erhöht zu werten.

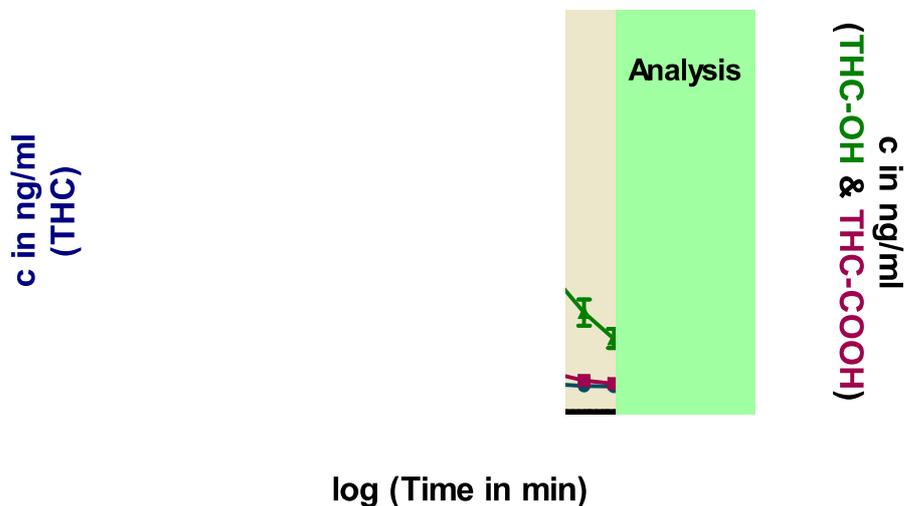


Abbildung 7: THC, THC-OH, THC-COOH

In einem weiteren Schritt wurden die Konzentrationen von THC und den Metaboliten je nach Stabilisierung in Heparin bzw. EDTA verglichen.

Bei Betrachtung der THC Werte ähnelte der Konzentrationsverlauf in EDTA dem von THC in Heparin. Zu einzelnen Zeitpunkten in hohen Konzentrationsbereichen waren marginale Unterschiede der Konzentrationen messbar, welche jedoch innerhalb der Messunsicherheit lagen und somit keine gesonderte Bewertung erfuhren. So erreichte THC in Heparin maximale Werte von durchschnittlich 996,85 ng/ml, während in EDTA durchschnittlich 842,05 ng/ml gemessen wurden. Die THC Konzentrationen näherten sich in den folgenden Minuten aneinander an und zeigten nach 5 Minuten innerhalb der niedrigen Konzentrationsbereiche keine relevanten Unterschiede mehr (s. Abbildung 8).

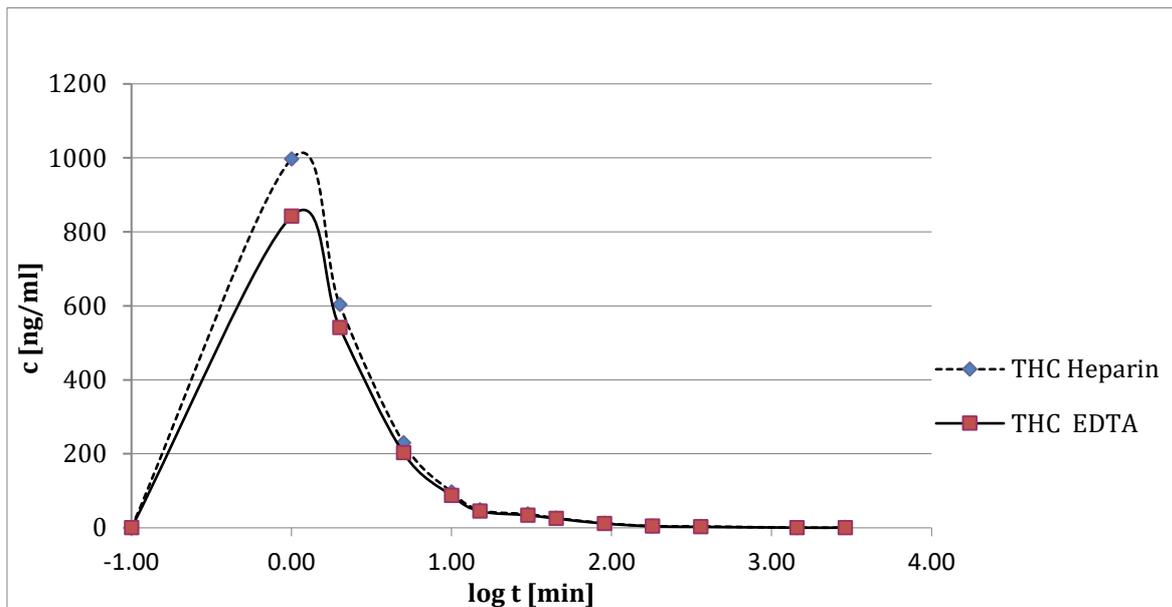


Abbildung 8: Vergleich Mittelwerte THC in Heparin und EDTA

Beim Vergleich der Konzentrationsverläufe von THC-OH je nach Stabilisierung durch die jeweiligen Antikoagulanzen waren ebenfalls, im Rahmen der Messunsicherheit, diskrete Unterschiede der mittleren Konzentrationen innerhalb der ersten Minuten nach Applikation messbar. Wie auch bei THC glichen sich die Werte innerhalb der ersten 5 Minuten bei Erreichen der niedrigeren Konzentrationsbereiche aneinander an und zeigten im weiteren Verlauf keine Unterschiede (s. Abbildung 9).

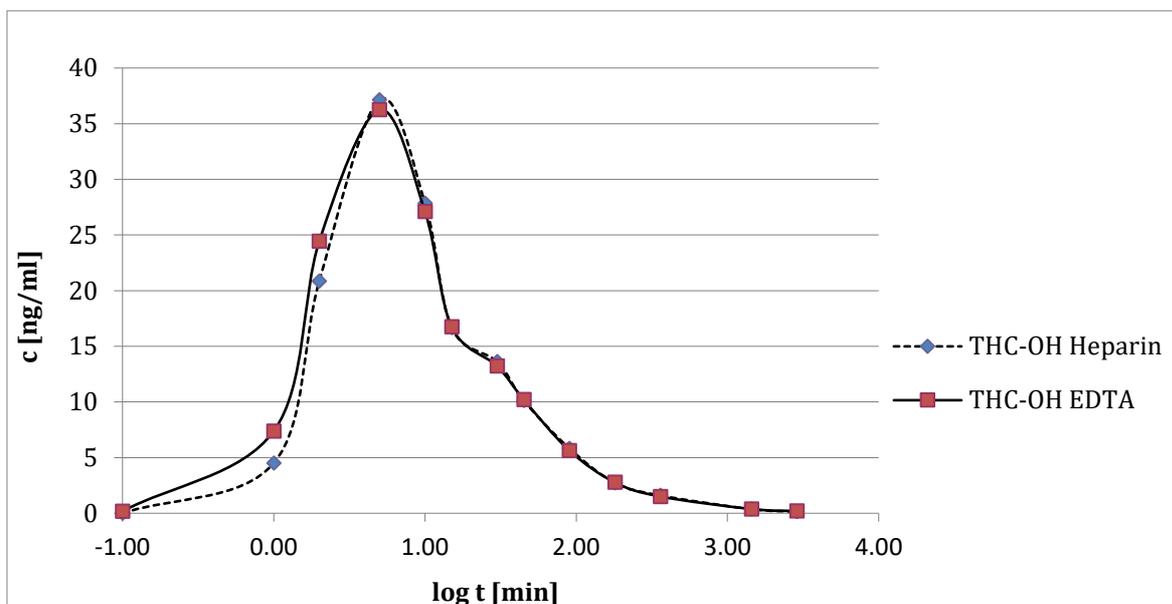


Abbildung 9: Vergleich Mittelwerte von THC- OH in Heparin und EDTA

Die Konzentrationen von THC-COOH zeigten nach Stabilisierung in Heparin oder EDTA weder beim Vergleich des Konzentrationsverlaufs noch bei den Absolutwerten signifikante Unterschiede (s. Abbildung 10).

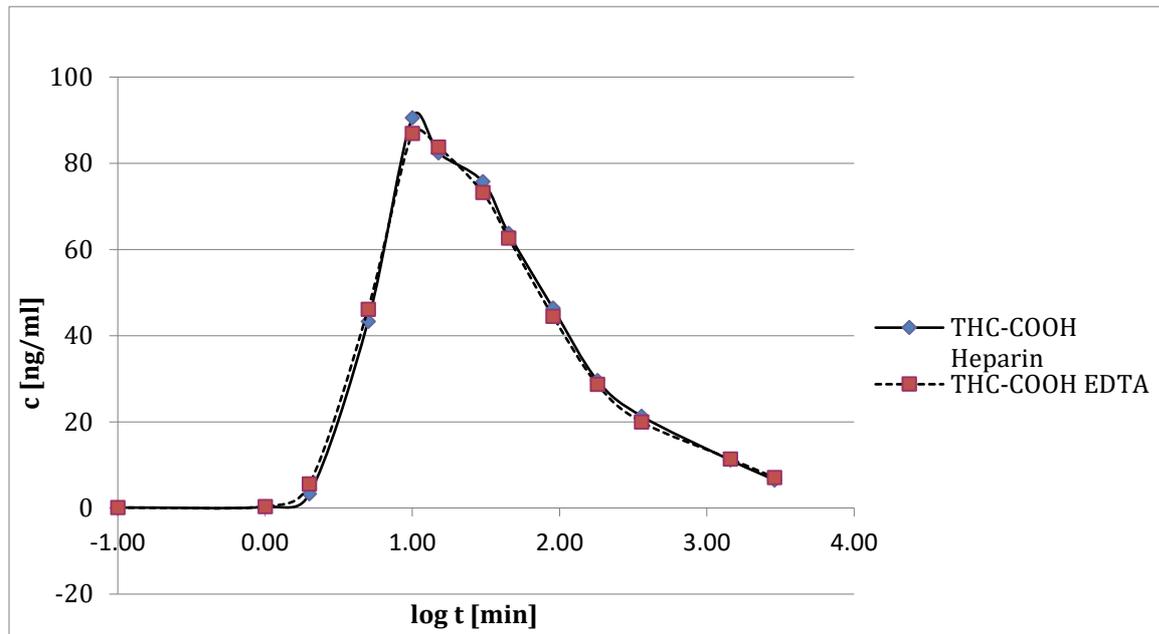


Abbildung 10: Vergleich Mittelwerte von THC-COOH in Heparin und EDTA

Die Konzentrationen an THC und THC-OH zeigen eine sehr rasche Abnahme, entsprechende Halbwertszeiten liegen in der initialen Phase bei nur wenigen Minuten (s. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Das ist für THC wenig überraschend, da neben der metabolischen Oxydation auch eine Umverteilung der sehr lipophilen Substanz in periphere (adipöse) Gewebe erfolgt. Bemerkenswert ist die extrem schnelle Oxydation zu OH-THC, das nach kurzer Bildungsphase mit einem Konzentrationsmaximum nach ca. 5 Minuten eine ähnliche Eliminationskinetik zeigt wie THC. Lediglich bei THC-COOH erfolgt die Bildung leicht verzögert und auch die Elimination erfolgt bei etwa doppelten Halbwertszeiten etwas langsamer als bei THC und OH-THC. Der Vergleich der Plasmahalbwertszeiten von THC, THC-OH und THC-COOH zeigt bei allen drei Substanzen einen ungefähr linearen Anstieg der Plasmahalbwertszeiten über den gesamten Messzeitraum. Während viele biochemische Eliminationsreaktionen eine exponentielle Abnahme mit konstanter Halbwertszeit zeigen, weist eine indirekte Proportionalität zwischen Konzentration und Halbwertszeit auf einen beschleunigten Abbau (2. Ordnung) hin.

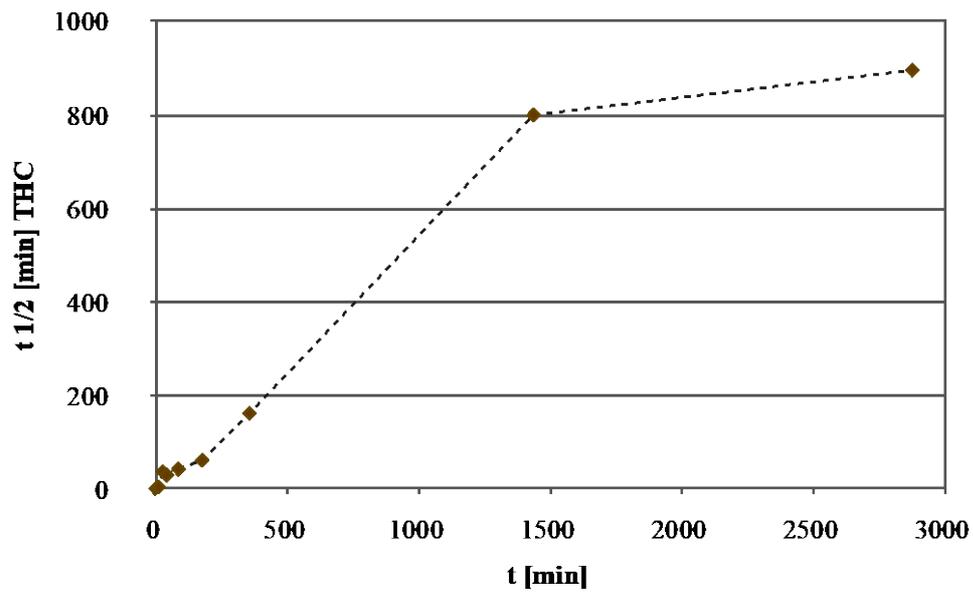


Abbildung 11: Plasmahalbwertszeiten von THC

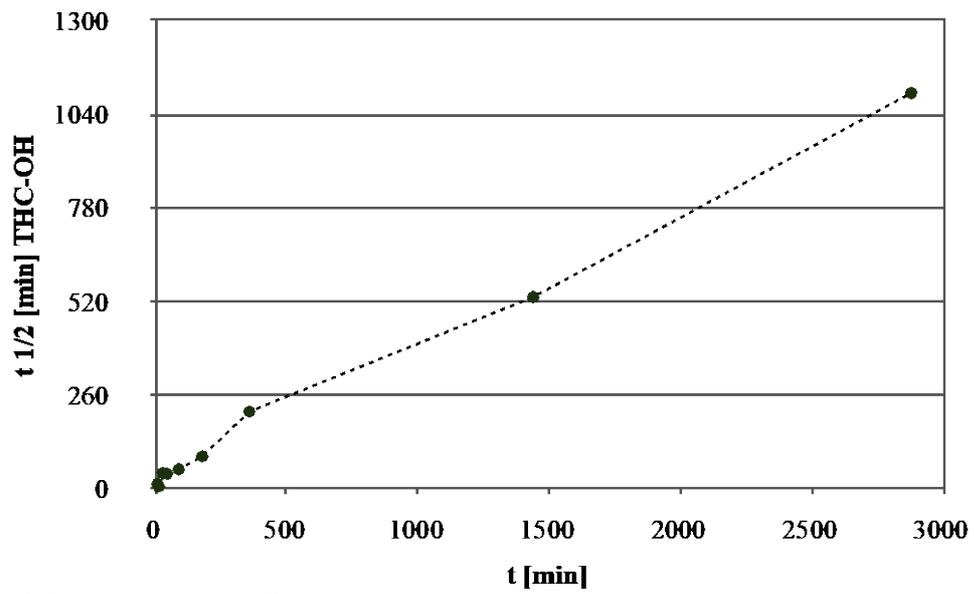


Abbildung 12: Plasmahalbwertszeiten von Hydroxy-THC

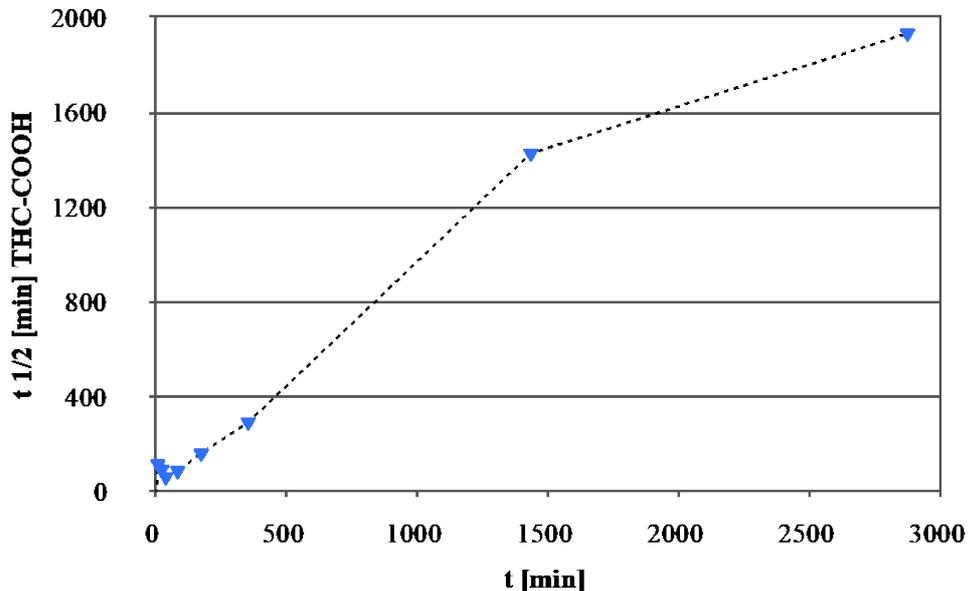


Abbildung 13: Plasmahalbwertszeiten von Carboxy-THC

Endocannabinoide AEA und 2-AG

Die durchschnittlichen Serumkonzentrationen beider EC's erreichten maximale Werte nach 30 min nach THC Applikation. Der Wilcoxon t-Test zeigte hier einen signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Ausgangswerte von 2-AG von 7,6 ng/ml (SD 4,3 ng/ml) auf 9,5 ng/ml (SD 5,9 ng/ml) (s. Abbildung 6) mit $P=0,003$. Im weiteren Verlauf fielen die Konzentrationen von 2-AG signifikant auf einen minimalen durchschnittlichen Wert von 5,5 ng/ml (SD 3,0 ng/ml) am Ende der akuten Phase. In der Langzeitanalyse kehrten die Werte für 2-AG nach 24h auf das Ausgangsniveau zurück und zeigten in den folgenden 24h keine weitere Veränderung (s. Abbildung 14).

Des Weiteren zeigte One Way Anova einen nicht signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Konzentrationen von AEA nach 30 min nach THC Applikation vom Ausgangswert 0,58 ng/ml (SD 0.21 ng/ml) auf 0,64 ng/ml (SD 0.24 ng/ml) mit $P>5$. Am Ende der akuten Phase wiederum war ein signifikanter Abfall der AEA Konzentrationen auf 0.32 ng/ml (SD 0.15 ng/ml) mit $P<5$ zu verzeichnen. Ähnlich wie bei 2-AG kehrten die Werte für AEA nach 24h und 48h ungefähr auf das Niveau der Ausgangswerte zurück (s. Abbildung 14). Interessanterweise war durch Anwendung von One Way Anova ein signifikanter Unterschied der AEA Konzentrationen nach 0 min und nach 24h nachweisbar. Weiterführend zeigte One Way Anova beim Vergleich der maximalen AEA Konzentrationen nach 30 min und denen nach 24h einen signifikanten

Unterschied mit $P < 5$ zwischen diesen Zeitpunkten nachzuweisen, während, wie bereits erwähnt, kein signifikanter Unterschied der Ausgangswerte und der maximalen AEA Werte abgebildet werden konnte.

Der direkte Vergleich der AEA und 2-AG Plasmakonzentrationen je nach Einbettung der Proben in EDTA oder Heparin ergab für AEA keine signifikanten Unterschieden in Bezug auf die Absolutwerte, deren Schwankungen oder den gesamten Konzentrationsverlauf (s. Abbildung 15).

Im Gegensatz dazu waren die Absolutwerte von 2-AG in den Proben nach Stabilisierung mit Heparin um durchschnittlich ungefähr 46% höher als in denen vergleichbarer EDTA-Blute. Der Konzentrationsverlauf von 2-AG nach Verwendung von EDTA bildete sich im Vergleich deutlich flacher und schwankender ab. Im Vergleich der 2-AG Ausgangswerte mit den maximalen Werten nach 30 min ließ sich im Wilcoxon's paired t-Test, wie auch nach Stabilisierung mit Heparin, ein signifikanter Anstieg der 2-AG Konzentrationen nachweisen. Allerdings fehlte der in Heparin beschriebene signifikante Konzentrationsabfall nach 6h (s. Abbildung 16) in EDTA gänzlich.

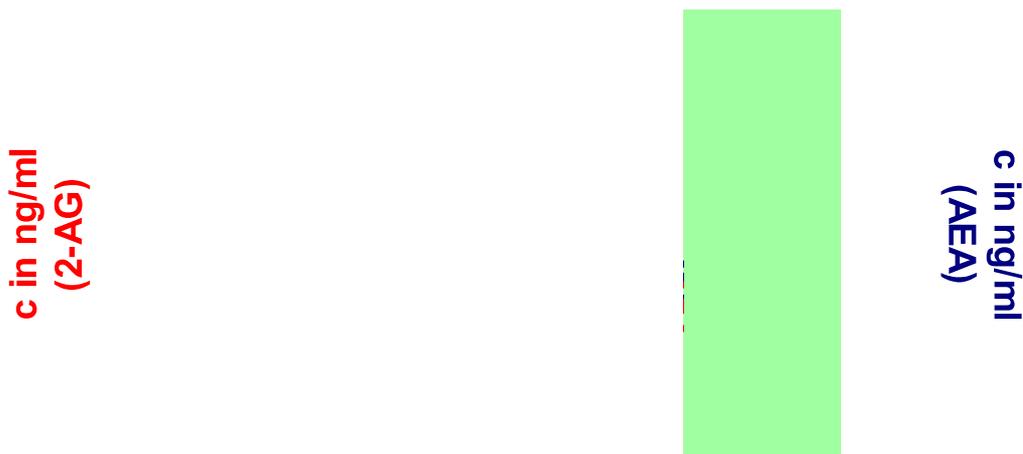
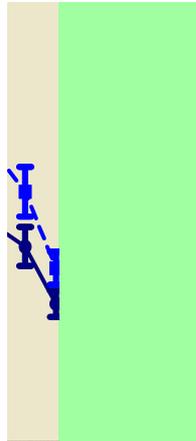


Abbildung 14: Vergleich Mean AEA und 2-AG in Heparin

c (AEA in EDTA) in ng/ml



c (AEA in Heparin) in ng/ml

Abbildung 15: Vergleich Mean AEA in Heparin und EDTA

c in ng/ml (2-AG EDTA)

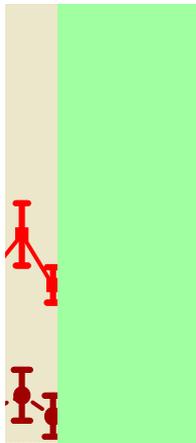


Abbildung 16: Vergleich Mean 2-AG in Heparin und EDTA

5. Diskussion

THC

Wie zu erwarten war, wurden direkt nach Applikation die höchsten THC Konzentrationen gemessen. Mit geringer, zeitlicher Verzögerung erreichten zunächst THC- OH und dann THC-

COOH das zugehörige Konzentrationsmaximum. THC zeigte nach Erreichen des Konzentrationsmaximums einen rapiden Abfall, was einerseits auf eine Umverteilung vom Blut ins Fettgewebe hinweist (29), als auch auf einen schnellen Abbau zurückzuführen. Hinweisend für einen raschen enzymatischen Abbau von THC war, dass bereits 1 Minute nach THC-Gabe signifikante Konzentrationsanstiege der Metabolite messbar waren (33). Die Verläufe stimmten bei Vergleich mit bisherigen Studien, welche die Konzentrationsverläufe nach intravenöser THC-Gabe untersuchten überein und zeigten große Ähnlichkeiten mit denen nach inhalativer Applikation (29, 33, 58). Plasmakonzentrationen nach oraler THC-Gabe bleiben wiederum in niedrigen Bereichen und zeigen einen irregulären zeitlichen Verlauf aufgrund von langsamer und unregelmäßiger intestinaler Absorption. Ein Vergleich der Daten erbrachte daher keine nennenswerten Erkenntnisse.

Ein weiterer Aspekt, der in der vorgestellten Arbeit dargestellt werden konnte, ist die Eliminationskinetik, der Abbau und Ausscheidung der untersuchten Cannabinoide unterliegen. Statt des häufig beobachteten exponentiellen Konzentrationsverlaufes mit konstanter Halbwertszeit zeigen THC, OH-THC und THC-COOH eine beschleunigte Elimination zweiter Ordnung. Die Tatsache, dass die -im Vergleich zum THC- deutlich hydrophilere Carbonsäure (THC-COOH) eine etwa doppelt so große Eliminationshalbwertszeit aufweist, wie die lipophilen Ausgangssubstanzen, belegt die unterschiedlichen Eliminationsmechanismen. Während THC offenbar nur geringfügig zu OH-THC oxydiert wird (Konzentrationen an OH-THC liegen erheblich – ca. 30fach- niedriger als korrespondierende THC Level) sind Umverteilung und biliäre Elimination als wesentliche Mechanismen des schnellen Abbaus zu vermuten. Des Weiteren wurden beim Vergleich der Werte je nach Stabilisierung in verschiedenen Antikoagulanzen (EDTA und Heparin) nur marginale Unterschiede in hohen Dosisbereichen bei THC und THC-OH nachgewiesen. Diese lagen jedoch innerhalb der Messunsicherheit, so dass abschließend keine Unregelmäßigkeiten in den beiden Gruppen nachgewiesen werden konnten.

Endocannabinoide

Primär zeigte sich bei den untersuchten Probanden ein biphasischer Verlauf der Endocannabinoidkonzentrationen nach THC Gabe. Nach THC Administration kam es initial zu einem Konzentrationsanstieg der untersuchten Endocannabinoide bis zu einem Maximum nach 30 min, gefolgt von einem Konzentrationsabfall bis unterhalb der Ausgangswerte mit einem Minimum nach 6h. Auch in der Langzeitanalyse nach 24 h waren die durchschnittlichen

EC Konzentrationen im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikant niedriger, erreichten diesen Bereich jedoch im weiteren Verlauf nach insgesamt 48 h.

Eine mögliche Erklärung für den frühen Konzentrationsanstieg der EC's können spezifische, pharmakologische Wirkungen von THC auf die Synthese und den Abbau von Endocannabinoiden sein. Alternativ oder ergänzend kann die Ausschüttung von Katecholaminen und Glucocorticoiden durch THC Administration zu einer sekundär vermehrten Bildung von Endocannabinoiden führen und den Konzentrationsanstieg nach 30 min erklären.

Hierzu passend ist die Aktivierung des sympatiko-adrenergen (59) und glucocorticoiden (60) Systems durch THC bereits vorbeschrieben. Ursächlich hierfür können die Stimulation von zentralen dopaminergen Signalwegen (61) oder die direkte Aktivierung von adrenergen Drüsen, welche bekanntermaßen CB Rezeptoren exprimieren (60, 62) sein. Eine weitere mögliche Erklärung für die Aktivierung des EC Systems, sowie von sympatiko- adrenergen und glucocorticoiden Systemen sind psychomimetische Wirkungen von THC selbst, wie z.B. Halluzinationen, oder eine Kombination der genannten Aktivierungsmechanismen.

Eine ausschließlich durch Stress ausgelöste Aktivierung von katecholaminergen und glucocorticoiden Signalkaskaden ist ebenfalls bekanntermaßen in der Lage das EC System beim Menschen zu aktivieren. In bisherigen Untersuchungen waren in verschiedenen Stresssituationen, wie im Rahmen des Trier Social Stress Test (63), bei Parabelflügen und Weltraumflügen (13, 64), oder nach erschöpfendem körperlichen Training (65, 66), ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentrationen von verschiedenen EC's nachweisbar. In diesem Zusammenhang erscheinen die erhöhten Plasmakonzentrationen von AEA und 2-AG nach 30 min gut mit vermehrt aktiven katecholaminergen und glucocorticoiden Systemen vereinbar zu sein. Allerdings kann auch eine direkte pharmakologische Wirkung von THC auf die Synthese und den Abbau von Endocannabinoiden nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen oder dessen potentiell Ausmaß genauer bewertet werden.

Der beschriebene signifikante Konzentrationsabfall im weiteren zeitlichen Verlauf wiederum kann als Ausdruck der sedativen Wirkung von THC gewertet werden. Auch ein Zusammenhang mit dem Abfall der Konzentrationen von THC und den THC- Metaboliten in Bereiche in denen eine direkte adrenerge Stimulation fehlt wäre denkbar. Diese Vermutungen würde einem, ähnlich dem abgebildetem, biphasischen Konzentrationsverlauf mit einem frühen Anstieg der EC-Plasmakonzentrationen durch sympathiko-adrenerge und

glukokortikoide Stimulation und anschließender Phase der Entspannung mit verminderten EC-Plasmakonzentrationen entsprechen.

Langzeitanalysen im Mausmodell konnten eine Down Regulation der AEA Signalisierung durch wiederholte Applikation niedriger THC Dosen nachweisen (67). Auch wurde beim Menschen in post mortalen Untersuchungen bei Konsumenten mit hohem THC Gebrauch im Vergleich zu jenen mit geringem Konsum niedrigere Anandamid Konzentrationen im Liquor (68) nachgewiesen. Dieser Umstand lässt dosisabhängige Auswirkungen von THC auf das EC System vermuten. Vergleichbare entspannende Wirkungen mit Nachweis einer signifikanten Reduktion der EC Plasmakonzentrationen wurde an gesunden Probanden nach raschem Alkoholkonsum (250 ml Rotwein innerhalb von 10 Minuten) nachgewiesen. Die Auswirkungen auf das EC System durch Alkoholkonsum waren jedoch im Vergleich denen nach THC Applikation kürzer und im Vergleich nur über einen verkürzten Zeitraum nachweisbar. Auch gelang es nicht einen initialen Anstieg der EC Konzentrationen innerhalb der Akutphase nach Alkoholkonsum nachzuweisen (69).

Weitere Untersuchungen hierzu zeigten bei Narkoseeinleitung unter Verwendung von Inhalationsanästhetika einen Bewusstseinsverlust und eine Reduktion des präoperativen Stresses bei orthopädischen (70) und herzchirurgischen (71) Eingriffen herbeizuführen. Die Analyse der EC Plasmakonzentrationen zeigte einen dadurch hervorgerufenen signifikanten Konzentrationsabfall.

Dem gegenüber zeigten Patienten mit chronischen sympathisch vermittelten Schmerzsyndromen (72), sowie Stress bedingten Störungen wie Fibromyalgie (73) oder Post-Traumatischer Belastungsstörung (PTSD) (74) erhöhte Plasmakonzentrationen von EC's und den verwandten N-Acyl-Ethanolamiden. Interessanterweise führt eine Gabe von niedrigdosierten Cannabinoiden häufig zu einer Symptombesserung bei diesen Patienten (75-77).

Die Arbeit umfasste verschiedene Einschränkungen. Zuerst gelang es aus organisatorischen und finanziellen Gründen nicht eine geeignete Placebo-Gruppe zu generieren. Durch die fehlende Vergleichsmöglichkeit gelingt es daher nicht mit ausreichender Sicherheit Effekte wie Stressreaktionen auf die erwartete THC-Injektion, welche wiederum einen Anstieg der EC Plasmakonzentrationen erwarten lässt, auszuschließen oder zu bewerten. Jedoch war die beobachtete Reduktion der EC Konzentrationen direkt nach THC Injektion gering und nicht signifikant, so dass eine

Verfälschung der Ausgangswerte durch Antizipation und Stress wenig wahrscheinlich erscheint.

Der dargestellte Abfall der EC Konzentration nach dem Konzentrationsmaximum bei 30 min ist möglicherweise durch zirkadiane Einflüsse zu erklären. Derartige Veränderungen der EC Konzentrationen mit einem Maximum am Morgen und minimalen Werten am Abend wurden bereits in einer unabhängigen Studie beschrieben (78). Allerdings ist demgegenüber zu bemerken, dass in der aktuellen Untersuchung die morgendlichen EC Werte nach 24 h bei weiterhin erhöhten THC und THC-OH Konzentrationen noch vermindert waren und erst nach 48h auf das Niveau der Ausgangswerte zurückkehrten. Ergänzend erfolgte daher die Messung von 2-AG und AEA bei verschiedenen Individuen um 7 Uhr und um 15 Uhr innerhalb eines Tages. Hierbei gelang es wiederum nicht eine zirkadiane Beeinflussung der Werte nachzuweisen. Zusammenfassend kann daher ein pharmakologischer Langzeiteffekt von THC auf das Endocannabinoidsystem vermutet werden, wobei zusätzliche zirkadiane Fluktuationen der EC Plasmakonzentrationen nicht sicher ausgeschlossen werden können (78).

Trotz der genannten Einschränkungen ist es anhand der Studie wahrscheinlich, dass das Endocannabinoidsystem durch hohe Dosen von THC beeinflusst werden kann. Die Effekte können eine Rolle bei eigenständiger Einnahme/Medikation von Cannabinoiden bei gestressten Individuen (79) oder möglichen vorteilhaften Wirkungen von Cannabinoiden bei Individuen, welche an stressbedingten Störungen leiden, sein. Weiterhin können die Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei der Cannabis Abhängigkeit und deren Entzugssymptome (80) diskutiert werden, oder Anteile des Endocannabinoidsystems an dem erhöhten Risiko für schwerwiegende psychiatrische Krankheitsbilder wie z.B. Schizophrenie bei starken Cannabinoid Konsumenten (81-83) vermutet werden. Um diese Annahmen zu untermauern müsste die Ergebnisse jedoch zunächst in größeren, kontrollierten Gruppen reproduziert werden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentrationsverläufe von von Cannabinoiden (THC, THC-OH und THC-COOH) dargestellt mit der Fragstellung, ob die Gabe von hochdosiertem THC zu einer anhaltenden Down-Regulation des Endocannabinoidsystems führt und somit eine Entwicklung von Entzugssymptomen und einer Substanzabhängigkeit erklärt. Die Ergebnisse

stimmt mit den bisherigen Datenlagen nach intravenöser und inhalativer THC-Applikation überein (29) und konnten keine fortwährende Beeinflussung des ECS nach Beendigung der Cannabinoidwirkung nachweisen. Es wurde gezeigt, dass Abbau und Ausscheidung von THC einer beschleunigten Eliminationskinetik 2. Ordnung unterliegen, mit einem vermutlich wesentlichen Anteil an biliärer Elimination und Umverteilung. Im Gegensatz zu den Endocannabinoiden konnten keine Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Stabilisierung in EDTA oder Heparin nachgewiesen werden. Wodurch die signifikant reduzierten Plasmakonzentrationen von 2-AG in EDTA bedingt sind, konnte im Rahmen der Arbeit jedoch nicht ausreichend geklärt werden.

Durch THC Applikation konnte eine signifikante Erhöhung der EC- Plasmakonzentrationen von AEA und 2-AG nach 30 min. nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf zeigten AEA und 2-AG eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentrationen, so dass ein biphasischer Verlauf abgebildet wurde. Auch nach 24h war eine weiterhin signifikante Reduktion der Konzentrationen von 2-AG und AEA messbar. Der nachgewiesene frühe Anstieg der EC-Plasmakonzentrationen kann auf pharmakologische Wirkungen von THC auf die Synthese und den Abbau von Endocannabinoiden hinweisen. Auch ein Anstieg durch eine THC-induzierte Freisetzung von Katecholaminen und Glucocorticoiden erscheint möglich. Eine nach THC-Applikation aufgetretene Aktivierung des sympatiko-adrenergen Systems und Glucocorticoidsystems wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen (59). Hierfür ursächlich können sowohl eine Stimulation dopaminerger Neurotransmission (61), als auch eine direkte Stimulation adrenerger Drüsen welche CB- Rezeptoren exprimieren (60, 62) sein. Auch ist eine Aktivierung der genannten Systeme durch psychomimetische Effekte von THC denkbar, bzw. eine Kombination dieser drei möglichen Erklärungen. Des Weiteren wurde ein Anstieg von EC Plasmakonzentrationen durch Ausschüttung von Katecholaminen und Glucocorticoiden in Stresssituationen mehrfach belegt (65, 66). In diesem Zusammenhang kann die Erhöhung der EC Plasmakonzentrationen nach THC Applikation auf die Ausschüttung von Katecholaminen und Glucocorticoiden zurückgeführt werden. Eine direkte pharmokologische Wirkung von THC auf die EC Synthese oder den EC Abbau konnte anhand der Studie weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

Eine wie im weiteren Verlauf nachgewiesene Reduktion der EC-Plasmakonzentrationen ist möglicherweise durch die durch THC-Applikation induzierte Sedierung ausreichend erklärt. Hieraus resultiert letztlich ein biphasischer Konzentrationsverlauf mit einem Maximum nach

sympathico-adrenergen Aktivierung und Ausschüttung von Glucocorticoiden, gefolgt von einem Minimum als Ausdruck der Relaxation. Eine nach Entspannung signifikante Verminderung von EC Konzentrationen wurde bereits mehrfach in verschiedenen Studien nachgewiesen. So gelang es z.B. 2013 eine deutliche Verminderung der AEA Konzentrationen im Liquor bei THC Konsumenten mit starkem Gebrauch im Vergleich zu Konsumenten leichtem THC Gebrauch nachzuweisen, wodurch ein dosisabhängiger THC- Effekt auf das ECS möglich scheint (68). Weiterhin wurde auch eine Verminderung von EC Konzentrationen nach Alkoholkonsum beschrieben, wobei im Vergleich zur vorgestellten Studie die Reduktion der EC Konzentrationen früher eintrat, kürzer anhielt und der initiale Anstieg der EC-Konzentrationen gänzlich fehlte (69). Durch das Fehlen einer Placebo-Gruppe ist es leider nicht möglich verfälschende Faktoren wie Stressreaktion auf die erwartete THC- Applikation zu beurteilen. Eine solche Stressreaktion kann eine erhöhte EC-Plasmakonzentration zur Folge haben. Die nachgewiesene Reduktion der EC- Plasmakonzentrationen direkt nach THC-Applikation, lässt dies jedoch weniger wahrscheinlich erscheinen. Des Weiteren kann eine Beeinflussung der EC-Plasmakonzentrationen durch eine zirkadiane Rhythmik nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da eine die bisherige Untersuchungen tageszeitabhängige Veränderungen von EC-Konzentrationen mit einem Maximum morgens und Minimum abends nachweisen konnten (78). In der vorgestellten Studie war jedoch auch nach 24h noch eine signifikante Reduktion der EC- Plasmakonzentrationen nachweisbar, wobei zu diesem Zeitpunkt auch Konzentrationen von THC und THC-OH noch signifikant erhöht waren. Auch gelang es nicht die Reduktion von EC-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Tageszeit bei exemplarisch untersuchten Probanden nachzuweisen. Hierbei erfolgten an einem Tag Probenentnahmen an 2 Zeitpunkten mit einem Unterschied von 7h.

Trotz der genannten Einschränkungen weisen die Ergebnisse auf eine Beeinflussung hoher THC-Dosen auf das ECS hin. Hierdurch ist es gegebenenfalls möglich Zusammenhänge von THC-Konsum bei gestressten Probanden (79), positive Wirkungen von Cannabinoiden bei Patienten mit stressabhängigen Störungen (75), Cannabisabhängigkeit und Entzugssymptome (80) oder das erhöhte Risiko für schwere psychiatrische Störungen z.B. aus dem schizophrenen Formenkreis bei starkem THC-Konsum (81-83) künftig besser zu erklären. Eine Reproduktion der Ergebnisse in einem größeren und optimierten Studiendesign wäre hierfür jedoch erforderlich.

7. Literaturverzeichnis

1. 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(6284):561-4. Epub 1990/08/09.
2. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2002;66(2-3):101-21. Epub 2002/06/08.
3. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5. Epub 1993/09/02.
4. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):161-202. Epub 2002/05/31.
5. Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(14):1411-29. Epub 2010/02/20.
6. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9. Epub 1992/12/18.
7. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology*. 1995;50(1):83-90. Epub 1995/06/29.
8. Kearn CS, Greenberg MJ, DiCamelli R, Kurzawa K, Hillard CJ. Relationships between ligand affinities for the cerebellar cannabinoid receptor CB1 and the induction of GDP/GTP exchange. *Journal of neurochemistry*. 1999;72(6):2379-87. Epub 1999/06/01.
9. Lynn AB, Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268(3):1612-23. Epub 1994/03/01.
10. Vellani V, Petrosino S, De Petrocellis L, Valenti M, Prandini M, Magherini PC, et al. Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1274-9. Epub 2008/03/11.
11. Kaczocha M, Glaser ST, Chae J, Brown DA, Deutsch DG. Lipid droplets are novel sites of N-acyl ethanolamine inactivation by fatty acid amide hydrolase-2. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(4):2796-806. Epub 2009/11/21.
12. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*. 2004;141(5):765-74. Epub 2004/01/28.
13. Chouker A, Kaufmann I, Kreth S, Hauer D, Feurecker M, Thieme D, et al. Motion sickness, stress and the endocannabinoid system. *PloS one*. 2010;5(5):e10752. Epub 2010/05/28.
14. Patel S, Hillard CJ. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *The European journal of neuroscience*. 2008;27(11):2821-9. Epub 2008/07/01.
15. Racz I, Bilkei-Gorzo A, Toth ZE, Michel K, Palkovits M, Zimmer A. A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(6):2453-8. Epub 2003/03/27.

16. Coddington E, Lewis C, Rose JD, Moore FL. Endocannabinoids mediate the effects of acute stress and corticosterone on sex behavior. *Endocrinology*. 2007;148(2):493-500. Epub 2006/11/11.
17. Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 2004;145(12):5431-8. Epub 2004/08/28.
18. Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(8):1257-62. Epub 2009/04/28.
19. Hirvonen J, Goodwin RS, Li CT, Terry GE, Zoghbi SS, Morse C, et al. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Molecular psychiatry*. 2012;17(6):642-9. Epub 2011/07/13.
20. Sim-Selley LJ. Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Critical reviews in neurobiology*. 2003;15(2):91-119. Epub 2004/02/24.
21. Villares J. Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain. *Neuroscience*. 2007;145(1):323-34. Epub 2007/01/16.
22. Rubino T, Vigano D, Massi P, Spinello M, Zagato E, Giagnoni G, et al. Chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. *Neuropharmacology*. 2000;39(7):1331-6. Epub 2000/04/13.
23. Burston JJ, Wiley JL, Craig AA, Selley DE, Sim-Selley LJ. Regional enhancement of cannabinoid CB1 receptor desensitization in female adolescent rats following repeated Delta-tetrahydrocannabinol exposure. *Br J Pharmacol*. 2010;161(1):103-12. Epub 2010/08/20.
24. Budney AJ, Hughes JR, Moore BA, Vandrey R. Review of the validity and significance of cannabis withdrawal syndrome. *The American journal of psychiatry*. 2004;161(11):1967-77. Epub 2004/10/30.
25. Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of natural products*. 1980;43(2):169-234. Epub 1980/03/01.
26. Huestis MA. Cannabis (Marijuana) — Effects on Human Behavior and Performance. *Forensic Sci Rev*. 2002(14:15):17-60.
27. Mechoulam R. Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2002;66(2-3):93-9. Epub 2002/06/08.
28. Agurell S, Leander K. Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of cannabis (hashish) during smoking. *Acta pharmaceutica Suecica*. 1971;8(4):391-402. Epub 1971/09/01.
29. Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & biodiversity*. 2007;4(8):1770-804. Epub 2007/08/23.
30. Huestis MA. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):657-90. Epub 2006/04/07.
31. Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol*. 1992;16(5):276-82. Epub 1992/09/01.

32. Lindgren JE, Ohlsson A, Agurell S, Hollister L, Gillespie H. Clinical effects and plasma levels of delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology*. 1981;74(3):208-12. Epub 1981/01/01.
33. Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1980;28(3):409-16. Epub 1980/09/01.
34. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics*. 2003;42(4):327-60. Epub 2003/03/22.
35. Harvey DJ, Brown NK. Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;40(3):533-40. Epub 1991/11/01.
36. Lowe RH, Abraham TT, Darwin WD, Herning R, Cadet JL, Huestis MA. Extended urinary Delta9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug and alcohol dependence*. 2009;105(1-2):24-32. Epub 2009/07/28.
37. Thieme D, Sachs H, Uhl M. Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography- tandem and multistage mass spectrometry. *Drug testing and analysis*. 2014;6(1-2):112-8. Epub 2014/01/16.
38. Huffman JW. The search for selective ligands for the CB2 receptor. *Current pharmaceutical design*. 2000;6(13):1323-37. Epub 2000/07/21.
39. Wiley JL, Marusich JA, Huffman JW. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life sciences*. 2014;97(1):55-63. Epub 2013/09/28.
40. Atwood BK, Huffman J, Straiker A, Mackie K. JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB receptor agonist. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):585-93. Epub 2010/01/27.
41. Grotenhermen F, Muller-Vahl K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Arzteblatt international*. 2012;109(29-30):495-501. Epub 2012/09/26.
42. Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften vom 6. März 2017, Nr 11 (2017).
43. Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, et al. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*. 2007;370(9584):319-28. Epub 2007/07/31.
44. Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry*. 2001;178:101-6. Epub 2001/02/07.
45. Gastpar M. T. KS, Linden M. *Psychiatrie und Psychotherapie*: Springer Verlag; 2002.
46. Fergusson DM, Poulton R, Smith PF, Boden JM. Cannabis and psychosis. *Bmj*. 2006;332(7534):172-5. Epub 2006/01/21.
47. Thieme U, Schelling G, Hauer D, Greif R, Dame T, Laubender RP, et al. Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. *Drug testing and analysis*. 2014;6(1-2):17-23. Epub 2014/01/16.
48. Naef M, Russmann S, Petersen-Felix S, Brenneisen R. Development and pharmacokinetic characterization of pulmonary and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004;93(5):1176-84. Epub 2004/04/07.

49. Balvers MG, Verhoeckx KC, Witkamp RF. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(14-15):1583-90. Epub 2009/04/28.
50. Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(3):969-82. Epub 2005/11/15.
51. Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, et al. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2009;34(3):593-606. Epub 2008/06/27.
52. Vogeser M, Hauer D, Christina Azad S, Huber E, Storr M, Schelling G. Release of anandamide from blood cells. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2006;44(4):488-91. Epub 2006/04/08.
53. Marrs W, Stella N. Measuring endocannabinoid hydrolysis: refining our tools and understanding. *The AAPS journal.* 2009;11(2):307-11. Epub 2009/05/09.
54. Ghafouri N, Tiger G, Razdan RK, Mahadevan A, Pertwee RG, Martin BR, et al. Inhibition of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase by analogues of 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol.* 2004;143(6):774-84. Epub 2004/10/20.
55. Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF. Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chemistry & biology.* 2009;16(7):744-53. Epub 2009/07/29.
56. Long JZ, Nomura DK, Vann RE, Walentiny DM, Booker L, Jin X, et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(48):20270-5. Epub 2009/11/18.
57. Obata T, Sakurai Y, Kase Y, Tanifuji Y, Horiguchi T. Simultaneous determination of endocannabinoids (arachidonylethanolamide and 2-arachidonoylglycerol) and isoprostane (8-epiprostaglandin F2alpha) by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring for medical samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;792(1):131-40.
58. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol.* 2008;32(7):470-7. Epub 2008/08/21.
59. Gash A, Karliner JS, Janowsky D, Lake CR. Effects of smoking marijuana on left ventricular performance and plasma norepinephrine: studies in normal men. *Annals of internal medicine.* 1978;89(4):448-52. Epub 1978/10/01.
60. Ranganathan M, Braley G, Pittman B, Cooper T, Perry E, Krystal J, et al. The effects of cannabinoids on serum cortisol and prolactin in humans. *Psychopharmacology.* 2009;203(4):737-44. Epub 2008/12/17.
61. Kuepper R, Morrison PD, van Os J, Murray RM, Kenis G, Henquet C. Does dopamine mediate the psychosis-inducing effects of cannabis? A review and integration of findings across disciplines. *Schizophr Res.* 2010;121(1-3):107-17. Epub 2010/06/29.
62. Zhukov OD, Artamonov MV, Klimashevs'kyii VM, Hoseieva NM, Marhitych VM, Hula NM. [N-acylethanolamine--a new class of natural adrenotropic modulators].

- Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal. 2000;72(2):24-7. Epub 2000/09/09. N-atsyletanolaminy--novyi klas pryrodnykh adrenotropnykh modulatoriv.
63. Dlugos A, Childs E, Stuhr KL, Hillard CJ, de Wit H. Acute stress increases circulating anandamide and other N-acylethanolamines in healthy humans. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2012;37(11):2416-27. Epub 2012/07/06.
64. Strewe C, Feuerecker M, Nichiporuk I, Kaufmann I, Hauer D, Morukov B, et al. Effects of parabolic flight and spaceflight on the endocannabinoid system in humans. *Reviews in the neurosciences*. 2012;23(5-6):673-80. Epub 2012/10/02.
65. Feuerecker M, Hauer D, Toth M, Demetz F, Hölzl J, Thiel M, et al. Effects of exercise stress on the endocannabinoid system in humans under field conditions. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(7):2777-81.
66. Heyman E, Gamelin FX, Goekint M, Piscitelli F, Roelands B, Leclair E, et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(6):844-51. Epub 2011/10/28.
67. Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, et al. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(4):1627-35. Epub 2000/03/29.
68. Morgan CJ, Page E, Schaefer C, Chatten K, Manocha A, Gulati S, et al. Cerebrospinal fluid anandamide levels, cannabis use and psychotic-like symptoms. *Br J Psychiatry*. 2013;202(5):381-2. Epub 2013/04/13.
69. Feuerecker M, Hauer D, Gresset T, Lassas S, Kaufmann I, Vogeser M, et al. Effect of an acute consumption of a moderate amount of ethanol on plasma endocannabinoid levels in humans. *Alcohol and alcoholism*. 2012;47(3):226-32. Epub 2012/01/27.
70. Schelling G, Hauer D, Azad SC, Schmoelz M, Chouker A, Schmidt M, et al. Effects of general anesthesia on anandamide blood levels in humans. *Anesthesiology*. 2006;104(2):273-7. Epub 2006/01/27.
71. Weis F, Beiras-Fernandez A, Hauer D, Hornuss C, Sodian R, Kreth S, et al. Effect of anaesthesia and cardiopulmonary bypass on blood endocannabinoid concentrations during cardiac surgery. *British journal of anaesthesia*. 2010;105(2):139-44. Epub 2010/06/08.
72. Kaufmann I, Hauer D, Hüge V, Vogeser M, Campolongo P, Chouker A, et al. Enhanced anandamide plasma levels in patients with complex regional pain syndrome following traumatic injury: a preliminary report. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*. 2009;43(4):325-9. Epub 2009/09/05.
73. Kaufmann I, Schelling G, Eisner C, Richter HP, Krauseneck T, Vogeser M, et al. Anandamide and neutrophil function in patients with fibromyalgia. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(5):676-85. Epub 2008/04/09.
74. Hauer D, Schelling G, Gola H, Campolongo P, Morath J, Roozendaal B, et al. Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PloS one*. 2013;8(5):e62741. Epub 2013/05/15.
75. Fraser GA. The use of a synthetic cannabinoid in the management of treatment-resistant nightmares in posttraumatic stress disorder (PTSD). *CNS neuroscience & therapeutics*. 2009;15(1):84-8. Epub 2009/02/21.
76. Fiz J, Duran M, Capella D, Carbonell J, Farre M. Cannabis use in patients with fibromyalgia: effect on symptoms relief and health-related quality of life. *PloS one*. 2011;6(4):e18440. Epub 2011/05/03.

77. Jarzinski C, Karst M, Zoerner AA, Rakers C, May M, Suchy MT, et al. Changes of blood endocannabinoids during anaesthesia: a special case for fatty acid amide hydrolase inhibition by propofol? *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(1):54-9. Epub 2012/01/17.
78. Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):530-43. Epub 2010/07/02.
79. Calhoun PS, Sampson WS, Bosworth HB, Feldman ME, Kirby AC, Hertzberg MA, et al. Drug use and validity of substance use self-reports in veterans seeking help for posttraumatic stress disorder. *Journal of consulting and clinical psychology*. 2000;68(5):923-7. Epub 2000/11/09.
80. Clapper JR, Mangieri RA, Piomelli D. The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence. *Neuropharmacology*. 2009;56 Suppl 1:235-43. Epub 2008/08/12.
81. Leweke FM, Giuffrida A, Koethe D, Schreiber D, Nolden BM, Kranaster L, et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: impact of cannabis use. *Schizophr Res*. 2007;94(1-3):29-36. Epub 2007/06/15.
82. Bossong MG, Niesink RJ. Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Progress in neurobiology*. 2010;92(3):370-85. Epub 2010/07/14.
83. Schwarz E, Whitfield P, Nahnsen S, Wang L, Major H, Leweke FM, et al. Alterations of primary fatty acid amides in serum of patients with severe mental illness. *Frontiers in bioscience*. 2011;3:308-14. Epub 2011/01/05.

8. Anhang

I Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2- Arachidonylglycerol
AEA	Anandamide
API	Ionisierung unter Atmosphärendruck
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabinoid Rezeptor 1
CB2	Cannabinoid Rezeptor 2
CBD	Cannabidiol
CRM	Charged-Residue Model
ESI	Elektrosprayionisation
EC	Endocannabinoid
FAAH	Fettsäureamid Hydrolase
FTC	Forensisch Toxikologisches Centrum
HPA-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenachse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
IEM	Ion-Evaporation Model
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit nachgeschalteter Tandem Massenspektrometrie
MAGL	Monoacylglycerol Lipase
Mean	Mittelwert
MTBE	Methyl- tert- Butylether
NO	Stickstoffmonoxid
OEA	Oleylethanolamid
PEA	Palmitoylethanolamid
RT	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
THC-OH	11-Hydroxy- Δ^9 -THC
THC-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -THC
ZNS	zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Anandamid (aus: www.chemspider.com)	Seite
7	
Abbildung 2: Strukturformel 2-AG (aus: www.chemspider.com)	Seite
7	
Abbildung 3: Umwandlung, Abbau und Ausscheidung von THC (37)	Seite 13
Abbildung 4: Strukturformeln d9-THC und JWH-133 im Vergleich	Seite 14
Abbildung 5: synthetisches, psychoaktives Cannabinoid JWH-018, aus: www.chemspider.com	Seite 14
Abbildung 6: Extraktionsprotokoll	Seite 19
Abbildung 7: THC, THC-OH, THC-COOH	Seite 25
Abbildung 8: Vergleich Mittelwerte THC in Heparin und EDTA	Seite 26
Abbildung 9: Vergleich Mittelwerte von THC- OH in Heparin und EDTA	Seite 26
Abbildung 10: Vergleich Mittelwerte von THC-COOH in Heparin und EDTA	Seite 27
Abbildung 11: Plasmahalbwertszeiten von THC	Seite 28
Abbildung 12: Plasmahalbwertszeiten von Hydroxy-THC	Seite 28
Abbildung 13: Plasmahalbwertszeiten von Carboxy-THC	Seite 29
Abbildung 14: Vergleich Mean AEA und 2-AG in Heparin	Seite 30
Abbildung 15: Vergleich Mean AEA in Heparin und EDTA	Seite 31
Abbildung 16: Vergleich Mean 2-AG in Heparin und EDTA	Seite 31

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Endocannabinoide

Seite 7

Tabelle 2: MS/MS Parameter der Analyten

Seite 23

Tabelle 3: Quellenparameter

Seite 23

IV zugrundeliegende Originaldaten

Heparin

Probanden	Anandamid (ng/ml)												
	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,845	0,747	0,67	0,755	0,809	0,881	0,923	0,928	0,672	0,464	0,702	0,745	0,945
2	0,84	0,734	0,719	0,797	0,808	0,853	0,931	1,11	0,832	0,445	0,406	0,44	0,636
3	0,504	0,421	0,443	0,478	0,494	0,561	0,478	0,569	0,461	0,221	0,288	0,56	0,584
4	0,443	0,486	0,48	0,493	0,417	0,477	0,469	0,427	0,296	0,483	0,276	0,37	0,395
5	0,563	0,564	0,492	0,52	0,618	0,659	0,554	0,495	0,43	0,14	0,36	0,541	0,594
6	0,252	0,21	0,253	0,215	0,26	0,268	0,228	0,259	0,349	0,404	0,103	0,289	0,307
7	0,305	0,291	0,335	0,292	0,349	0,406	0,37	0,42	0,41	0,306	0,272	0,218	0,211
8	0,445	0,466	0,412	0,384	0,386	0,403	0,372	0,463	0,638	0,552	0,28	0,391	0,244
9	0,424	0,317	0,347	0,232	0,438	0,518	0,516	0,493	0,404	0,127	0,194	0,174	0,159
10	0,457	0,427	0,516	0,492	0,486	0,479	0,501	0,518	0,433	0,241	0,325	0,316	0,296
11	0,624	0,544	0,55	0,58	0,685	0,686	0,704	0,584	0,305	0,589	0,309	0,664	0,632
12	0,543	0,508	0,55	0,537	0,464	0,456	0,493	0,483	0,449	0,491	0,241	0,457	0,494
13	0,403	0,363	0,295	0,338	0,339	0,328	0,409	0,378	0,343	0,341	0,185	0,391	0,374
14	0,527	0,413	0,277	0,332	0,378	0,359	1,18	0,337	0,351	0,427	0,334	0,479	0,473
15	0,42	0,458	0,472	0,465	0,506	0,568	0,585	0,529	0,535	0,458	0,117	0,588	0,33
16	0,49	0,448	0,429	0,458	0,48	0,513	0,562	0,565	0,465	0,429	0,187	0,2	0,184
17	0,566	0,498	0,584	0,502	0,63	0,57	0,663	0,548	0,568	0,229	0,448	0,302	0,7
18	0,389	0,387	0,424	0,443	0,407	0,434	0,478	0,468	0,393	0,408	0,304	0,516	0,597
19	0,478	0,536	0,428	0,419	0,446	0,612	0,761	0,755	0,544	0,525	0,263	0,519	0,56
20	0,593	0,45	0,384	0,464	0,464	0,485	0,53	0,607	0,697	0,412	0,275	0,263	0,302
21	0,941	0,651	0,51	0,503	0,674	1,09	0,811	0,918	0,499	0,563	0,681	0,563	0,358
22	0,563	0,906	0,573	0,673	0,612	0,91	1,16	1,2	0,477	0,495	0,208	0,437	0,587
23	0,894	0,841	0,884	0,664	0,625	0,819	0,941	0,642	0,926	1,17	0,551	0,382	0,505
24	0,836	0,573	0,552	0,52	0,798	0,76	0,686	0,797	0,46	0,43	0,274	0,208	0,415
25	1,1	0,977	0,743	1,06	0,974	1,05	0,804	0,72	0,531	0,92	0,411	0,575	0,594

Heparin

Probanden	2-AG (ng/ml)												
	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	15,9	21,8	21,3	26,4	17,6	19,5	37,4	34,7	24,9	20,1	13,4	11,5	9,66
2	12,2	14,2	15	17,3	16,7	14,9	19,1	12,1	17,2	12,2	6,38	7,3	6,53
3	4,65	4,23	4,95	4,88	4,52	5,53	5,71	5,65	4,2	3,15	2,78	4,82	4,93
4	4,31	5,02	4,18	3,64	3,82	4,02	4,1	3,42	2,87	3,03	2,45	3,55	4,28

5	8,95	9,84	10	12,1	13,2	12,8	12,5	8,72	7,03	8,86	5,53	3,63	4,21
6	6,32	8,16	6,46	9,32	7,72	7,74	8,16	7,37	4,11	3,6	2,27	6,93	3,15
7	6,99	8,85	8,92	10,8	16,2	15,4	12,6	13,5	9,07	6,76	6,93	2,17	3,11
8	7,69	7,26	10,7	10,8	11,6	6,73	13,3	7,53	10,5	14	7,77	5,85	6,16
9	3,69	3,91	4,58	3,94	6,32	6,78	6,5	5,29	5,43	5,23	4,95	8,12	8,82
10	5,15	5,15	4,79	5,47	6,75	5,45	6,06	4,49	2,73	5,99	6,21	7,28	8,71
11	5,21	4,96	7,05	6,72	9,3	5,8	4,69	2,92	4,36	7,97	4,37	4,88	20,6
12	5,8	4,52	2,63	3,37	4,75	4,64	4,03	3,7	2,25	3,36	3,11	4,84	3,39
13	4,65	2,85	2,33	4,02	4,11	3,07	3,41	3,16	3,59	2,41	3,88	5,71	3,88
14	7,46	5,72	4,52	5,05	6,43	5,38	15,4	3,72	3,59	6,79	4,03	8,93	10,8
15	8,67	7,17	6,64	9,1	10,7	10,1	12,3	8,08	6,78	7,12	5,61	12,5	16,5
16	19	22	17,4	23	21,8	20,5	24,8	20,2	17,8	21,1	21,9	28,9	17
17	3,23	3,69	3,42	3,44	3,97	3,67	3,88	2,78	3,35	2,87	4,81	8,58	8,96
18	2,27	2,02	2,77	2,4	2,47	2,82	2,75	1,94	1,73	1,29	2,22	2,38	2,93
19	3,52	3,9	4,05	3,83	2,69	5,12	5,04	3,48	2,3	3,01	2,57	1,77	2,33
20	7,17	3,97	4,98	6,25	6,28	8,02	5,74	4,72	3,3	2,77	3,25	5,57	4,23
21	13,2	8,86	7,16	6,54	9,62	19,5	13,4	15,7	3,4	9,83	9,05	14,2	14,9
22	5,74	7,59	6,22	4,18	5,93	11,1	10,8	8,94	4,63	4,45	6,37	3,78	5,55
23	15,1	16,7	16,2	11,2	12,9	13,3	19,2	10,6	11,8	12,3	11,5	14,3	16,9
24	6,39	5,47	4,45	5,45	6,55	4,03	7,34	5,05	2,07	2,86	3,28	3,76	8,4
25	7,42	10,7	5,3	10,2	6,9	7,35	6,56	6,04	8,27	9,68	9,55	28,6	16,7

Heparin

THC (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,02	775,00	551,00	255,00	94,30	43,80	37,20	26,00	17,10	7,14	3,60	0,76	0,22
2	0,03	811,00	638,00	281,00	119,00	67,70	43,40	29,30	18,10	6,03	1,44	0,37	0,50
3	0,00	737,00	516,00	181,00	71,40	41,00	26,60	24,50	10,40	2,21	0,84	0,37	0,26
4	0,02	731,00	511,00	201,00	79,30	39,20	32,30	24,90	13,10	4,52	2,15	0,50	0,29
5	0,00	756,00	512,00	207,00	75,00	34,80	29,40	25,40	9,35	2,95	1,84	0,53	0,18
6	0,00	652,00	482,00	215,00	79,90	37,00	28,70	20,10	7,58	2,51	1,15	0,37	0,21
7	0,00	800,00	614,00	238,00	127,00	64,30	45,50	29,90	13,20	3,78	6,46	0,24	0,15
8	0,00	748,00	621,00	262,00	91,90	42,20	56,00	39,00	19,30	7,38	2,56	0,59	0,12
9	0,00	766,00	560,00	146,00	126,00	53,70	34,60	28,50	13,10	4,04	1,84	0,33	0,27
10	0,01	1130,00	645,00	218,00	82,70	48,90	32,60	22,90	12,20	4,46	2,56	0,32	0,34
11	0,11	1340,00	600,00	208,00	96,10	46,50	38,10	31,30	16,90	6,85	2,16	1,19	0,86
12	0,13	1250,00	710,00	222,00	106,00	52,20	43,60	25,50	11,20	4,81	2,70	0,44	0,24
13	0,20	1190,00	640,00	219,00	88,00	37,20	27,40	15,70	7,75	2,10	1,17	0,42	0,18
14	0,13	1930,00	545,00	240,00	79,50	50,30	36,30	16,30	9,78	4,82	1,89	0,42	0,17
15	0,03	1060,00	707,00	281,00	115,00	48,80	40,30	30,60	14,80	5,75	2,14	0,31	0,22
16	0,03	1050,00	712,00	276,00	132,00	66,60	51,00	40,10	18,80	8,67	2,88	0,59	0,22
17	0,02	1320,00	800,00	267,00	163,00	73,30	46,80	32,70	17,30	4,25	1,81	0,50	0,29
18	0,01	1050,00	738,00	149,00	86,50	52,50	40,50	24,70	9,73	2,39	1,24	0,44	0,23
19	0,00	937,00	458,00	122,00	37,60	23,70	20,00	11,70	4,61	1,78	0,83	0,29	0,19
20	0,01	904,00	505,00	192,00	73,80	31,70	26,40	22,00	8,67	3,50	1,24	0,24	0,13
21	0,02	623,00	89,60	317,00	45,30	39,00	23,30	18,90	5,82	3,10	0,87	0,24	0,10
22	0,00	809,00	233,00	84,70	30,70	20,40	15,40	12,50	4,57	1,89	0,67	8,31	0,21
23	0,02	666,00	361,00	119,00	38,20	22,70	19,70	11,60	6,38	3,15	1,21	0,20	0,17

24	0,02	924,00	437,00	184,00	97,00	32,20	19,50	15,40	6,23	2,16	1,48	0,41	0,19
25	0,03	766,00	363,00	164,00	50,10	24,70	15,50	9,42	7,29	3,01	1,08	0,37	0,21

Heparin

THC-OH (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,00	3,19	23,40	48,80	36,30	19,20	15,30	12,10	6,92	3,01	1,43	0,46	0,19
2	0,00	2,15	11,30	23,00	15,90	14,30	11,10	9,83	6,96	3,65	1,65	0,57	0,10
3	0,00	3,36	25,50	43,20	26,90	16,70	10,40	8,84	4,57	1,92	1,13	0,25	0,07
4	0,00	5,05	23,50	32,90	24,40	12,40	10,10	8,66	5,34	2,82	1,80	0,38	0,19
5	0,00	11,00	29,40	45,00	30,90	17,30	12,90	8,97	5,52	2,68	1,76	0,43	0,15
6	0,00	4,95	27,10	46,90	34,20	18,60	14,80	10,70	5,39	2,07	1,08	0,29	0,06
7	0,00	3,53	16,00	25,00	25,50	19,00	14,40	11,60	5,62	2,41	0,79	0,26	0,13
8	0,00	8,19	39,90	60,90	36,20	19,60	19,10	13,90	8,12	3,98	1,90	0,31	0,07
9	0,00	5,42	30,70	26,50	41,90	20,30	18,90	12,20	6,58	2,89	2,25	0,33	0,12
10	0,04	2,74	14,80	35,20	23,80	15,80	13,20	10,50	7,43	3,03	1,78	0,14	0,08
11	0,00	0,15	6,63	17,20	15,40	10,80	9,54	8,09	5,26	3,87	1,56	0,44	0,30
12	0,01	7,53	28,20	44,80	35,10	22,50	19,40	15,00	7,76	3,66	2,64	0,65	0,19
13	0,00	1,65	19,50	38,40	34,40	17,50	12,20	8,87	5,31	1,81	1,32	0,32	0,09
14	0,03	14,30	31,60	67,60	46,10	28,90	26,10	13,60	8,61	4,55	2,12	0,73	0,22
15	0,00	0,70	7,21	20,60	23,60	13,30	11,70	9,19	5,39	2,78	1,49	0,30	0,13
16	0,00	0,55	7,79	24,20	12,70	7,44	6,35	5,67	3,86	2,41	1,28	0,32	0,10
17	0,00	0,40	5,35	15,30	22,50	16,60	12,70	10,10	6,53	2,25	1,22	0,42	0,15
18	0,00	1,14	16,50	28,90	29,80	18,30	14,90	10,10	5,32	1,80	1,32	0,32	0,13
19	0,00	6,99	30,30	38,30	16,80	11,40	9,44	5,86	2,79	1,21	0,60	0,22	0,06
20	0,00	7,17	22,50	33,60	22,60	10,70	9,69	8,22	3,40	1,85	1,00	0,20	0,07
21	0,00	0,54	19,80	7,08	14,40	13,80	8,24	8,40	3,32	2,62	1,18	0,30	0,05
22	0,00	0,99	8,10	16,30	9,89	7,94	7,28	5,90	2,25	1,45	0,53	0,03	0,17
23	0,01	7,97	19,30	15,10	11,30	8,76	7,67	5,15	3,43	2,35	1,17	0,24	0,11
24	0,00	0,23	5,64	20,70	27,10	12,00	7,69	6,60	2,84	1,38	1,34	0,25	0,15
25	0,00	1,53	6,10	36,60	30,90	14,40	11,30	7,65	5,98	3,91	2,12	0,76	0,21

Heparin

THC-COOH (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,04	0,14	5,26	94,10	187,00	163,00	139,00	129,00	84,50	52,20	41,10	33,10	23,30
2	0,62	0,56	0,66	16,90	40,20	67,00	68,40	71,10	55,10	31,50	19,80	14,30	6,00
3	0,06	0,19	5,24	67,90	118,00	97,40	74,40	65,60	37,60	19,10	11,70	11,60	5,98
4	0,10	0,31	5,06	51,80	90,40	71,00	62,20	53,40	33,40	20,90	12,40	7,66	5,28
5	0,07	0,46	2,53	24,50	52,40	48,40	35,90	21,80	17,00	9,34	7,09	4,33	2,57
6	0,00	0,20	3,06	32,70	70,20	52,30	46,50	40,10	22,80	11,40	6,05	5,59	2,97
7	0,00	0,00	1,19	16,10	46,00	58,30	46,30	42,30	26,10	14,90	6,81	2,76	1,38
8	0,00	0,00	6,32	70,50	149,00	163,00	172,00	152,00	146,00	132,00	96,00	30,80	13,90
9	0,22	0,25	4,90	47,00	171,00	129,00	128,00	101,00	70,80	32,50	23,70	7,02	2,66
10	0,04	0,18	4,83	68,60	129,00	96,70	102,00	88,90	73,50	36,90	25,30	7,36	5,31
11	0,14	0,33	0,55	16,80	50,90	58,80	52,30	42,60	27,60	23,70	12,50	9,09	5,00
12	0,02	0,58	7,06	71,30	141,00	140,00	123,00	104,00	79,00	59,80	40,90	33,00	20,70
13	0,07	0,52	2,94	57,10	146,00	115,00	93,10	83,70	60,40	29,30	21,10	11,40	6,63
14	0,38	0,28	2,65	50,10	99,80	104,00	93,80	52,40	49,80	36,10	23,10	15,10	5,24

15	0,00	0,02	0,12	3,44	11,00	10,30	8,31	7,52	4,48	2,34	0,99	0,70	0,37
16	0,00	0,02	0,96	40,20	74,60	77,80	68,40	59,20	42,60	32,00	18,40	9,01	4,38
17	0,00	0,04	0,06	1,53	6,29	7,73	7,15	6,74	6,05	3,24	2,51	1,50	1,39
18	0,00	0,08	1,07	20,70	54,90	66,40	61,50	48,90	38,50	14,90	14,30	8,70	5,17
19	0,03	0,16	5,97	49,30	80,20	76,80	67,40	41,70	21,90	11,50	5,25	4,63	2,48
20	0,06	0,21	5,04	56,20	102,00	70,60	65,40	57,20	31,30	18,80	12,80	2,41	3,31
21	0,02	0,05	32,50	1,67	79,70	132,00	81,10	81,00	34,90	37,40	22,40	16,00	5,08
22	0,17	0,37	4,45	41,90	80,00	107,00	107,00	103,00	44,70	44,30	17,60	7,07	20,00
23	0,58	1,09	10,40	43,30	77,00	77,80	78,60	50,70	39,30	34,50	21,30	17,90	6,14
24	0,07	0,05	0,33	6,42	22,70	20,70	16,00	16,00	7,86	4,28	3,49	2,08	1,77
25	0,01	0,27	0,35	18,80	59,90	64,60	55,90	43,90	37,20	27,90	16,50	22,60	13,40

EDTA

Anandamid (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,73	0,69	0,69	0,72	0,70	0,80	0,80	0,79	0,61	0,48	0,55	0,64	0,77
2	0,67	0,60	0,62	0,70	0,81	0,83	0,85	0,80	0,77	0,31	0,35	0,38	0,58
3	0,44	0,40	0,43	0,40	0,48	0,51	0,58	0,56	0,42	0,25	0,25	0,52	0,55
4	0,45	0,47	0,47	0,44	0,47	0,46	0,50	0,41	0,33	0,42	0,26	0,39	0,36
5	0,53	0,52	0,52	0,52	0,58	0,60	0,58	0,49	0,41	0,19	0,32	0,48	0,54
6	0,24	0,22	0,23	0,19	0,18	0,24	0,26	0,27	0,36	0,36	0,10	0,24	0,32
7	0,30	0,30	0,29	0,34	0,39	0,36	0,37	0,40	0,37	0,25	0,21	0,33	0,23
8	0,35	0,39	0,37	0,30	0,34	0,40	0,33	0,33	0,58	0,44	0,23	0,31	0,23
9	0,32	0,31	0,33	0,35	0,41	0,45	0,45	0,42	0,32	0,10	0,16	0,22	0,15
10	0,44	0,41	0,43	0,42	0,46	0,48	0,49	0,48	0,43	0,23	0,29	0,32	0,27
11	0,51	0,53	0,45	0,59	0,55	0,56	0,65	0,58	0,30	0,48	0,26	0,63	0,74
12	0,45	0,47	0,54	0,54	0,52	0,46	0,50	0,48	0,47	0,48	0,27	0,45	0,54
13	0,41	0,33	0,37	0,36	0,29	0,34	0,40	0,38	0,28	0,36	0,12	0,32	0,41
14	0,46	0,37	0,33	0,35	0,35	0,43	0,45	0,38	0,45	0,33	0,28	0,61	0,46
15	0,44	0,48	0,43	0,44	0,48	0,55	0,55	0,50	0,47	0,40	0,11	0,58	0,32
16	0,42	0,42	0,44	0,36	0,45	0,48	0,51	0,48	0,42	0,73	0,21	0,14	0,18
17	0,62	0,56	0,54	0,62	0,54	0,63	0,57	0,55	0,50	0,28	0,41	0,30	0,60
18	0,41	0,41	0,47	0,47	0,48	0,53	0,49	0,56	0,39	0,51	0,35	0,52	0,59
19	0,65	0,57	0,50	0,50	0,55	0,66	0,79	0,78	0,58	0,63	0,43	1,42	0,53
20	0,64	0,52	0,52	0,51	0,54	0,59	0,70	0,65	0,75	0,48	0,36	0,30	0,37
21	0,93	1,02	0,88	0,96	1,00	1,08	1,08	1,06	0,81	0,53	0,68	0,67	0,55
22	0,87	0,80	0,89	0,95	0,90	1,01	1,07	1,00	0,73	0,56	0,34	0,51	0,56
23	1,04	0,87	0,99	1,02	1,08	1,12	1,17	0,89	1,30	1,10	0,55	0,59	0,76
24	0,79	0,64	0,63	0,62	0,64	0,76	0,83	0,77	0,65	0,73	0,36	0,29	0,54
25	1,09	1,13	1,14	1,10	0,98	0,99	1,11	1,02	0,64	0,90	0,58	0,51	0,75

EDTA

2-AG (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	4,81	4,37	4,04	4,57	3,91	8,65	5,47	5,09	3,88	3,63	6,16	5,63	4,87
2	5,11	4,02	4,58	3,71	2,89	4,43	5,45	5,42	3,20	4,68	2,68	2,60	3,58

3	1,73	2,53	3,66	2,70	2,37	2,48	2,51	2,52	1,72	2,11	1,65	1,28	1,21
4	2,63	2,45	2,35	2,57	3,09	2,68	3,15	2,52	2,67	2,08	1,59	1,99	2,79
5	3,68	4,68	4,80	5,54	5,21	6,78	6,58	5,07	3,44	3,77	2,33	2,87	2,33
6	2,92	3,26	4,81	3,65	5,78	4,70	4,14	4,60	2,44	2,25	1,61	2,95	2,41
7	2,26	2,97	3,51	4,42	2,96	4,65	5,28	3,95	3,58	2,61	1,84	1,21	1,58
8	3,38	3,85	6,21	5,41	4,82	4,74	5,96	5,13	2,62	2,98	2,21	3,56	1,99
9	1,60	2,26	2,19	2,41	2,31	3,82	2,47	2,28	3,14	1,79	3,60	1,83	2,18
10	3,43	4,01	3,72	3,01	4,05	4,85	3,17	4,07	2,88	4,09	4,02	3,91	2,56
11	4,35	4,09	4,74	4,20	5,59	5,86	3,99	3,85	3,83	3,99	3,39	3,65	13,50
12	3,08	2,68	2,19	2,46	2,95	2,24	2,18	3,16	2,25	3,34	1,96	3,36	2,46
13	2,93	2,06	2,63	2,14	2,22	1,91	2,24	2,45	2,02	2,54	2,32	2,61	1,71
14	5,31	3,90	3,83	3,30	3,70	4,98	5,18	3,83	4,83	4,38	4,46	2,97	5,81
15	7,21	2,99	6,93	15,10	5,59	6,53	7,43	7,01	5,95	7,87	4,80	7,59	6,98
16	6,80	6,98	12,30	5,35	7,08	9,07	9,50	5,50	5,69	27,90	15,70	12,10	5,71
17	2,49	3,00	3,24	2,72	2,80	3,10	2,78	2,75	3,17	3,11	3,72	5,16	4,70
18	2,55	1,88	2,26	2,12	2,47	2,68	2,07	1,88	1,60	1,32	2,46	1,66	1,66
19	2,20	2,73	2,61	2,91	3,94	4,16	3,54	2,99	2,28	2,70	2,58	3,40	2,20
20	3,35	3,66	4,00	4,33	3,53	4,18	3,88	3,13	2,52	1,98	2,83	3,89	3,23
21	6,65	6,92	4,51	5,95	6,73	5,97	9,81	6,49	6,58	7,73	5,88	8,98	7,13
22	4,96	4,51	5,75	4,93	5,04	6,58	5,66	5,33	4,27	7,86	4,20	5,21	4,48
23	9,49	11,10	11,20	11,10	13,50	12,30	12,80	8,59	7,07	7,05	6,06	9,15	11,30
24	2,77	3,54	6,75	3,74	3,90	3,63	3,35	3,47	3,09	2,60	4,21	2,44	4,28
25	5,90	4,47	5,48	4,89	7,95	5,48	4,69	5,84	4,14	5,09	6,98	8,58	10,40

EDTA

THC (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,00	705,00	512,00	219,00	82,60	39,10	29,60	22,50	15,30	8,17	3,96	0,73	0,23
2	0,03	658,00	482,00	202,00	119,00	62,40	25,90	29,90	14,90	4,53	1,61	0,24	0,49
3	0,00	618,00	419,00	143,00	61,40	35,60	26,00	21,50	8,61	2,07	0,68	0,37	0,25
4	0,00	618,00	445,00	166,00	63,60	36,70	26,00	19,90	10,20	3,88	2,10	0,44	0,24
5	0,00	641,00	439,00	203,00	66,70	35,20	27,70	21,90	9,27	2,95	1,44	0,39	0,19
6	0,00	652,00	482,00	215,00	79,90	25,80	18,90	20,00	7,66	3,16	1,33	0,44	0,30
7	0,00	788,00	550,00	273,00	128,00	56,70	48,80	32,20	11,40	3,47	11,20	0,28	0,17
8	0,00	692,00	460,00	160,00	81,90	53,10	52,90	37,60	17,50	6,38	2,14	0,25	0,12
9	0,00	750,00	520,00	149,00	90,70	47,10	28,60	23,20	9,80	3,78	1,49	0,33	0,18
10	0,04	876,00	497,00	150,00	69,20	39,80	28,80	22,20	10,70	4,32	1,92	0,29	0,28
11	0,05	883,00	505,00	175,00	83,20	43,50	33,60	28,40	15,80	4,50	6,64	0,81	0,51
12	0,05	1030,00	585,00	192,00	99,30	51,30	46,50	25,40	11,00	4,76	1,88	0,40	0,23
13	0,06	932,00	598,00	205,00	68,00	32,40	22,40	15,90	6,94	2,25	1,35	0,92	0,39
14	0,21	821,00	645,00	214,00	75,80	46,90	32,60	21,00	8,63	4,90	2,01	0,57	0,24
15	0,01	996,00	556,00	240,00	104,00	45,30	34,20	22,30	14,60	4,90	1,50	0,35	0,24
16	0,02	971,00	678,00	208,00	115,00	58,80	46,00	34,50	18,80	8,78	2,33	0,47	0,23
17	0,11	1220,00	669,00	271,00	137,00	64,30	47,20	31,30	14,40	4,13	1,78	0,53	0,27
18	0,02	1150,00	722,00	155,00	85,10	53,60	40,20	24,70	9,50	2,70	1,10	0,39	0,18
19	0,02	863,00	495,00	138,00	45,20	24,50	19,20	13,90	4,77	1,68	1,08	0,42	0,24
20	0,00	977,00	568,00	183,00	78,40	24,10	19,90	21,50	10,70	3,67	1,72	0,20	0,01
21	0,00	825,00	479,00	121,00	66,00	28,30	25,20	14,80	7,54	3,03	0,92	0,21	0,08

22	0,01	627,00	313,00	143,00	41,30	19,90	14,60	10,50	5,74	2,20	1,00	0,07	0,21
23	0,02	641,00	308,00	150,00	53,30	31,00	21,30	14,40	8,83	2,76	1,29	0,25	0,15
24	0,01	820,00	377,00	166,00	71,00	33,90	20,10	14,80	8,18	3,47	1,88	0,50	0,25
25	0,01	727,00	425,00	150,00	55,70	27,50	16,50	12,00	8,22	3,23	1,42	0,43	0,25

EDTA

THC-OH (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,00	7,30	27,90	48,60	34,60	17,80	14,30	10,60	6,50	3,22	1,89	0,47	0,14
2	0,00	3,03	11,00	18,40	15,30	15,30	8,38	11,00	6,32	3,30	1,62	0,53	0,12
3	0,00	6,60	23,00	38,40	27,00	15,70	11,60	8,91	4,29	1,91	1,07	0,21	0,06
4	0,00	7,46	26,30	30,80	22,60	14,70	9,43	7,82	5,10	3,17	1,87	0,40	0,17
5	0,00	11,10	35,00	45,90	28,60	16,20	13,00	10,60	5,33	2,75	1,50	0,34	0,16
6	3,57*	27,80	52,10	32,80	18,00	17,20	12,60	4,51	2,27	1,25	0,32	0,09	0,12
7	0,00	5,90	17,50	26,50	28,80	16,70	14,50	12,10	5,27	2,20	1,23	0,38	0,17
8	0,00	12,00	36,20	50,50	35,70	20,70	18,20	14,40	8,21	4,21	2,00	0,28	0,09
9	0,00	8,45	31,50	32,50	33,90	20,90	15,80	11,00	6,43	2,64	1,96	0,47	0,12
10	0,00	4,11	16,90	31,20	23,30	14,90	13,20	10,80	6,79	3,25	1,61	0,16	0,08
11	0,00	0,65	6,89	18,50	14,50	11,40	9,20	7,94	5,72	3,08	1,82	0,42	0,23
12	0,01	10,70	29,00	46,40	37,00	23,70	18,90	15,50	7,90	3,76	1,98	0,60	0,19
13	0,00	3,05	22,60	40,50	30,40	15,70	12,50	9,28	5,10	1,94	1,36	0,39	0,11
14	0,03	10,30	42,40	65,40	49,30	30,10	24,70	17,80	8,54	4,18	2,20	0,82	0,40
15	0,00	1,12	6,30	19,70	24,50	14,20	11,00	7,12	5,53	2,63	1,14	0,29	0,13
16	0,00	0,17	8,62	19,40	13,00	7,26	6,52	5,46	3,82	2,51	1,26	0,29	0,10
17	0,00	0,70	5,35	18,10	22,00	15,60	13,60	10,70	6,00	2,74	1,39	0,43	0,15
18	0,00	3,63	20,50	38,00	31,80	19,20	15,90	12,40	5,80	2,51	1,43	0,30	0,13
19	0,00	11,00	38,10	43,70	23,70	13,10	9,71	7,39	3,31	1,44	0,96	0,40	0,08
20	0,00	12,60	31,70	37,70	25,10	11,00	9,58	8,06	4,48	2,12	1,45	0,27	0,09
21	0,00	2,53	15,50	30,60	24,50	12,50	11,60	10,50	5,14	3,26	1,55	0,36	0,08
22	0,00	1,62	13,80	26,60	15,70	9,17	6,94	5,37	3,09	1,45	0,91	0,04	0,17
23	0,02	14,50	21,50	23,70	16,50	11,60	9,25	7,44	5,17	2,42	1,32	0,36	0,17
24	0,00	0,72	13,80	20,90	24,70	12,80	8,67	6,84	4,17	2,51	1,68	0,37	0,20
25	0,00	3,17	16,10	37,80	34,20	19,30	14,00	10,00	7,46	4,38	2,97	0,76	0,34

* als Messfehler zu werten, korrelierender Heparin Wert und THC Werte =0

EDTA

THC-COOH (ng/ml)

Probanden	0 Min.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.	90 Min.	180 Min.	360 Min.	24 h	48 h
1	0,01	0,31	6,62	92,30	168,00	158,00	124,00	111,00	70,70	58,10	51,40	32,50	21,00
2	0,43	0,06	1,02	13,80	39,10	69,90	63,40	68,80	43,80	25,70	17,80	13,20	6,85
3	0,38	0,29	4,35	60,40	108,00	85,80	75,60	62,20	33,90	17,20	10,80	9,09	5,37
4	0,05	0,42	6,74	52,90	83,40	75,10	55,70	47,60	31,80	19,50	12,40	7,72	4,73
5	0,00	0,26	3,30	24,90	50,40	47,10	35,20	23,60	15,80	8,84	6,49	3,83	2,53
6	0,00	2,61	33,60	64,00	54,60	62,50	48,90	19,80	15,40	6,64	5,76	3,56	5,71
7	0,00	0,00	1,59	18,50	49,90	46,50	46,50	42,70	23,30	14,40	11,00	4,52	1,99
8	0,00	0,47	6,47	67,10	150,00	147,00	162,00	152,00	146,00	111,00	96,50	33,90	14,10
9	0,00	0,23	5,16	64,70	129,00	136,00	101,00	87,90	62,00	28,80	20,30	8,19	2,95
10	0,06	0,31	6,39	65,00	120,00	109,00	98,80	88,60	70,80	35,30	22,30	9,57	5,08

11	0,10	0,21	0,53	18,20	48,40	59,90	48,30	44,50	28,30	20,80	12,20	8,32	3,92
12	0,25	0,81	7,66	72,60	140,00	137,00	122,00	113,00	86,30	65,70	32,90	31,80	21,80
13	0,02	0,08	3,42	57,10	128,00	106,00	100,00	88,80	59,40	34,10	21,70	11,50	7,98
14	0,27	0,20	4,14	52,00	104,00	103,00	89,60	72,60	48,50	32,50	23,00	15,90	9,97
15	0,00	0,01	0,22	3,49	10,40	10,80	8,51	5,63	4,53	2,22	0,85	0,69	0,39
16	0,01	0,02	1,33	32,60	72,90	74,20	68,80	54,80	39,40	31,60	16,30	7,85	4,36
17	0,03	0,00	0,12	1,98	5,89	7,50	7,92	6,81	5,65	3,62	2,57	1,39	1,03
18	0,00	0,00	1,35	29,30	64,10	74,80	66,80	57,90	41,90	19,70	14,90	9,31	4,66
19	0,01	0,29	9,65	65,30	128,00	85,50	67,60	51,20	25,80	13,40	7,81	7,33	2,95
20	0,04	0,46	7,79	64,90	111,00	82,80	75,40	55,50	37,00	22,60	14,90	7,43	3,87
21	0,00	0,13	4,67	65,30	143,00	111,00	118,00	98,50	55,50	45,10	30,80	19,50	7,78
22	0,28	0,31	8,17	72,30	124,00	124,00	104,00	89,90	58,70	43,20	28,70	8,96	21,80
23	0,78	2,46	19,40	70,10	117,00	107,00	93,20	70,00	60,10	35,70	22,00	25,90	8,81
24	0,03	0,11	1,80	7,59	23,20	22,60	18,30	17,00	10,30	7,50	4,15	3,30	2,55
25	0,14	0,07	1,34	25,50	66,60	76,70	65,00	55,00	46,80	30,80	23,80	23,70	21,10

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich abschließend zuallererst Professor Dr. Alexander Choukèr, Oberarzt an der Klinik für Anästhesiologie im Klinikum Großhadern, danken, unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit entstanden ist. Die Zusammenarbeit mit ihm und dem Mitbetreuer, Herrn Prof. Dr. Gustav Schelling aus der gleichen Einrichtung, zeichneten sich durch ein hohes Maß an Freundlichkeit aus und er und Prof Schelling standen stets mit wertvollen Ratschlägen zur Verfügung.

Des Weiteren gilt ein großer Dank meinem Vater Dr. Detlef Thieme, Direktor des Institutes für Dopinganalytik und Sportbiochemie, welcher ein wichtiger Ansprechpartner für die vielen anfallenden analytischen Fragen war und diese immer gewissenhaft, professionell und insbesondere mit viel Geduld beantwortete.

Einen besonderen Dank möchte ich an Dr. Hans Sachs, dem ehemaligen Direktor des Forensisch Toxikologischen Centrums (FTC) in München, richten, der die analytischen Geräte und Substanzen zur Verfügung stellte und es mir ermöglichte einen großen Teil meiner Arbeit in seinem Labor zu absolvieren. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Sabrina Mayet, Mitarbeiterin im FTC danken, die mir bei der praktischen Arbeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Die gleiche Dankbarkeit gilt den weiteren Mitarbeitern des FTC, die mich freundlich in ihr Labor aufnahmen und ebenfalls immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Großen Dank möchte ich an die Mitarbeiter des Universitätsklinikums für Anästhesiologie und Schmerztherapie Inselspital Bern aussprechen, welche die Applikationsstudie planten und durchführten und so diese Arbeit erst möglich machten.

Letztendlich möchte ich auch meinen Eltern für ihre Geduld, Motivation und ihr immerwährendes Vertrauen in mich danken.